

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

光化学オキシダントの健康影響に関する動物実験知見の抄録集 (案)

目次

1. O ₃ の影響に関する知見.....	2
1.1. 呼吸器系への影響に関する知見	2
1.1.1. 上皮傷害及び形態学的変化に関する知見	2
1.1.2. 呼吸器発達への影響に関する知見.....	15
1.1.3. 炎症・傷害・酸化ストレスに関する知見	21
1.1.4. 呼吸機能に関する知見	73
1.1.5. 気道反応性に関する知見.....	79
1.1.6. 宿主防御及びアレルギー反応に関する知見	102
1.1.7. その他の呼吸器影響に関する知見.....	121
1.1.8. 呼吸器影響における感受性要因に関する知見.....	122
1.1.9. 複合曝露による呼吸器影響に関する知見	146
1.2. 循環器系への影響に関する知見	157
1.3. 内分泌系及び代謝系への影響に関する知見	170
1.4. 神経系への影響に関する知見.....	174
1.5. 変異原性・遺伝子傷害性及び発がん影響に関する知見.....	187
1.6. 生殖及び成長発達への影響に関する知見	190
1.7. その他の影響に関する知見	195
2. PANの影響に関する知見.....	198

1 1. O₃の影響に関する知見

2 1.1. 呼吸器系への影響に関する知見

3 1.1.1. 上皮傷害及び形態学的変化に関する知見

4 Ishii *et al.* (1998)は、ラットへの O₃ 急性曝露により、肺炎症および好酸球浸潤におけるエ
5 オタキシンの関与について調べた。ラット (Brown Norway、雄、n=4/群) に、1.2 ppm O₃
6 を6時間曝露させ、O₃ 曝露前、曝露直後、曝露20時間後にエオタキシン mRNA の発現お
7 よび BALF 成分の変化について評価した。またエオタキシンタンパク質を用いた *in vitro*
8 アッセイを行った。エオタキシンのリコンビナントタンパク質は、化学走性チャンバーを
9 用いた *in vitro* 解析において、好酸球に対する走化性活性を示した。O₃ を曝露したマウス
10 では、肺組織におけるエオタキシン mRNA の発現は曝露直後に約 1.6 倍増加し、20 時間後
11 には 4 倍に増加した。また、BALF 中の好酸球数は、対照群と比較して、それぞれ 3 倍お
12 よび 15 倍増加した。また、エオタキシン陽性の肺泡マクロファージおよび気管支上皮細胞
13 が増加した。これらの結果は、ラットの O₃ 誘発性炎症において、エオタキシンが好酸球
14 の動員に関与することを示唆している。

15
16 Laskin *et al.* (1998a)は、O₃ の急性曝露が組織の損傷部位へのマクロファージの蓄積によ
17 って特徴付けられる炎症反応に関連しており、これらの細胞は、肺泡上皮細胞とともに活
18 性化され、一酸化窒素 (NO) などの細胞毒性を示す炎症性メディエーターを放出すること
19 から、O₃ 吸入後に増大する肺マクロファージおよび II 型上皮細胞の NO シンターゼの調節
20 機構について解析した。雌の Sprague-Dawley (specific pathogen-free) ラットに 2 ppm の O₃
21 を 3 時間吸入曝露させ、曝露から 24 時間後に単離した肺泡マクロファージおよび II 型上皮
22 細胞の NO 産生能力を評価した。炎症性メディエーターであるリポ多糖およびインターフ
23 ェロンガンマに応答して、肺泡マクロファージおよび II 型上皮細胞による NO 産生量が増
24 加した。O₃ 曝露は肺泡マクロファージおよび II 型上皮細胞における誘導性 NO シンターゼ
25 (iNOS) タンパク質および mRNA の発現を増加させるとともに、転写因子 NF-κB 活性を
26 亢進させた。O₃ 曝露による肺泡マクロファージと II 型上皮細胞の NO 産生および iNOS タ
27 ンパク質の発現増加は、NF-κB の活性を抑制するピロリジンジチオカルバメート (PDTC)
28 によって阻害されたが、O₃ 曝露群から単離したラットの細胞では、対照群と比較して PDTC
29 に対する感受性が低かった。ゲルシフトアッセイを使用した細胞核抽出物における NF-κB
30 結合活性の測定では、O₃ 曝露は肺泡マクロファージおよび II 型上皮細胞における NF-κB
31 結合活性を時間依存的に増加させ、O₃ 曝露後 12~24 時間で分離された場合に最大に達し
32 た。これらのデータから、著者らは NF-κB シグナル伝達の活性の変化が、O₃ 吸入後の起炎
33 刺激に対する肺マクロファージおよび II 型上皮細胞の応答において重要であることを示唆
34 しているとした。

35
36 Bhalla *et al.* (1999)は、肺における O₃ の有害作用は曝露の量、持続時間、及び曝露後の時

1 間に依存的に進展することから、主に O₃ 曝露によるラットの上皮の傷害と肺組織でのフィ
2 ブロネクチンの発現について経時的に検討した。雄の Sprague-Dawley ラット (6~8 週齢、
3 1 週間馴化) に清浄空気又は 1 ppm の O₃ を 3 時間鼻部吸入曝露させた (各群 5 匹)。曝露
4 終了の直後、4、8、12、16、20、24 時間後に BALF を採取し、総タンパク質濃度、アルカ
5 リホスファターゼ、フィブロネクチンの活性を観察した。総タンパク質の濃度は曝露 12
6 時間後にピークを示したが、24 時間後も対照群と比較し高かった。同様に、BALF 中のア
7 ルカリホスファターゼとフィブロネクチンの活性も時間依存的に上昇を示した。アルカリ
8 ホスファターゼは肺の II 型上皮細胞と BALF 中の多形核白血球で測定されたが、マクロフ
9 ージでは測定されなかった。多形核白血球は O₃ 曝露後の傷害プロセスにおいて、アルカ
10 リホスファターゼ濃度に寄与し、マクロファージはフィブロネクチンの産生に重要な役割
11 を果たしていることが示唆された。

12

13 Longphre *et al.* (1999) は、6~8 週齢の雄の C57BL/6J マウスにろ過空気又は 2 ppm の O₃
14 を 3 時間吸入曝露させた。曝露の 30 分前、又は 10 分後に血小板活性化因子受容体拮抗剤
15 又は溶媒を投与し、O₃ 曝露の 6、24 時間後に BALF を採取し、肺の透過性の指標として総
16 タンパク質量、マクロファージ、リンパ球、多形核白血球数を調べた。また、BrdU ラベル
17 による上皮細胞増殖、肺組織中の ICAM-1 発現を調べ、上皮傷害の評価のため形態変化を
18 観察した。O₃ 曝露により、BALF 中の多形核白血球やタンパク質、肺上皮細胞の増殖、
19 ICAM-1 発現量が、ろ過空気曝露溶媒投与群と比較して増大した。これらの反応は血小板
20 活性化因子受容体拮抗剤の曝露前投与により抑制され、炎症が軽減した。血小板活性化因
21 子受容体拮抗剤の曝露後投与でもほとんど同様の反応を示した。これらの結果からにより、
22 O₃ 曝露による気道の炎症や上皮損傷には血小板活性化因子受容体の活性化が、おそらく細
23 胞間接着物質 (ICAM-1) の発現を介して関与していることが裏付けられる。

24

25 Matsumoto *et al.* (1999) は、モルモットに O₃ を急性吸入曝露し、気道反応性の変化におけ
26 る好中球エラスターゼの関与について調べた。モルモット (Hartley、雄、n=5/群) に生理
27 食塩水または ONO-5046 (好中球エラスターゼ阻害剤、200mg/kg) を腹腔内投与した後、3
28 ppm O₃ を 2 時間吸入曝露し、O₃ 曝露の 0、3、5 時間後にアセチルコリン (ACh) への気道反
29 応性の測定、BALF 成分の解析を実施した。O₃ 曝露は、ACh の吸入および静脈内投与に対
30 する気道反応性を増強させるとともに、BALF における NE-PI (NE- α -1-protease inhibitor
31 complex) 濃度、好中球数、気道上皮細胞数、マクロファージ数を増加させた。ONO-5046
32 の前処置は、O₃ 曝露による BALF 中の好中球数および上皮細胞数の増加、および吸入 ACh
33 に対する気道反応性の向上を抑制したが、ACh の静脈内投与に対する気道反応性には影響
34 は示さなかった。これらの結果は、好中球エラスターゼが上皮傷害を誘発することで、
35 O₃ 誘導性の気道反応に寄与していることを示唆している。

36

1 Vesely *et al.* (1999a) は、好中球が O₃ により傷害された上皮細胞の修復に関与するという
2 仮説を証明するため、抗ラット好中球ウサギ血清を腹腔内投与して好中球を減少させた雄
3 の Wistar ラット (43 日齢) にろ過空気又は 1.0 ppm の O₃ を 8 時間吸入曝露させ、曝露中
4 及び曝露 8 時間後の呼吸機能変化と組織傷害を検討した。好中球非減少群として、正常ウ
5 サギ血清を投与し、ろ過空気又は 1.0 ppm の O₃ を 8 時間吸入曝露させた。呼吸機能につい
6 ては分時換気量、一回換気量、呼吸回数を測定した。また、肺組織を採取し、組織像の観
7 察と BrdU を用いた細胞増殖を測定した。好中球減少群も非減少群も O₃ 曝露開始後 8 時間
8 をピークに一回換気量が減少し、呼吸回数が増加したが、好中球減少群で呼吸回数の回復
9 が顕著に遅かった。また、好中球減少群では鼻腔、気管支、細気管支で O₃ 曝露による上皮
10 細胞の壊死が多かった。この時、上皮細胞の増殖に伴う BrdU の取り込みは好中球減少群
11 で顕著に少なかった。以上 の結果から、好中球が O₃ 曝露による上皮傷害の修復に関与し
12 ていることが示された。

13

14 Sterner-Kock *et al.* (2000) は、O₃ 曝露による影響の哺乳類動物種間の差異について調べる
15 ため、フェレット (雄、月齢 18 か月)、アカゲサル (雄、4 歳) 、Sprague-Dawley ラッ
16 ト (10 週齢) に 1 ppm の O₃ 又はろ過空気を 8 時間、吸入曝露させ、曝露終了後、1 時間
17 ろ過空気に曝露させてから屠殺し、BALF、肺組織を採取した。全ての動物種で BALF 中
18 の好中球数が増加したが、特にサルとフェレットで顕著であった。また、組織病理学的観
19 察においても、サルとフェレットで、壊死を起こした上皮細胞に一致して好中球の浸潤が
20 観察された。以上 の結果から、フェレットの O₃ に対する呼吸器における感受性はサルと
21 極めて類似していることが示唆された。

22 Jang *et al.* (2002) は、O₃ は細胞の壊死と、それに伴う細胞増殖の促進を誘発することから、
23 急性の O₃ 吸入が細胞増殖及び気道閉塞に及ぼす影響を検討するため、雌の BALB/c マウス
24 (5~6 週齢) にろ過空気又は 0.12 ppm (0.11±0.02)、0.5 ppm (0.48±0.05)、1 ppm
25 (0.98±0.032ppm)、2 ppm (1.95±0.06) の O₃ を 3 時間全身吸入曝露させた (各 6 匹)。O₃
26 曝露終了の直後、24、48、72 時間後に気道閉塞の指標として Penh を測定した。さらに、
27 Penh の最終測定直後に BALF を採取し、好中球比率を調べた。また、PCNA (増殖性細胞
28 核抗原: Proliferating cell nuclear antigen) は細胞増殖中にみられるタンパク質複合体を構成
29 する成分であることから、免疫組織化学染色により PCNA の発現を調べた。対照群 (ろ過
30 空気曝露群) と比較すると、O₃ 曝露群では肺胞上皮細胞内の PCNA 発現量が増加した。
31 PCNA 指標 (平均±標準誤差) は 2 ppm の O₃ 曝露群では 16.83±0.57%、0.12 ppm の O₃ 曝露
32 群では 4.25±0.5%、0.5 ppm の O₃ 曝露群では 6.83±0.60%、1 ppm の O₃ 曝露群では
33 12.16±0.48% となり、2 ppm の O₃ 曝露群で最も高かった。Penh は、O₃ 曝露後に用量依存的
34 に増加した。肺胞中の PCNA 指標と Penh との間に相関が認められた。以上 のデータから、
35 O₃ が用量依存的に肺胞上皮細胞増殖を誘発する可能性があること、肺胞上皮細胞増殖は気
36 道閉塞と相関があることが示唆された。

1
2 Wagner *et al.* (2002)は、O₃への反復曝露によって実験動物の鼻粘膜では炎症及び粘液細胞
3 異形成が起き、ヒトにおいても、アレルギー性鼻炎の場合には同様の反応が起こることか
4 ら、O₃曝露がアレルギー性鼻炎に関連する炎症反応及び上皮反応を亢進する、という仮説
5 を検証するため、10~12週齢の雄の Brown Norway ラットにろ過空気又は0.5 ppmのO₃を
6 8時間全身吸入曝露させ、その直後に生理食塩水又は1%のOVAを50 µL 鼻腔に投与する
7 手続きを1回のみ実施、あるいは連続3日間反復した。処理終了の24時間後に屠殺、鼻組
8 織を採取し、上皮細胞、好中球、好酸球の数及び上皮（上顎甲介鼻部移行上皮、鼻部隔膜
9 気道上皮）細胞間における粘液物質の体積密度の光学顕微鏡検査及び形態計測解析を行っ
10 た。また、屠殺2時間前にBrdUを腹腔内投与し、上皮BrdU標識化細胞数を調べた。1回
11 のOVA投与により、好中球及び好酸球がすべての鼻組織の粘膜下組織へと浸潤した。O₃
12 曝露は、OVA投与マウスの顎骨鼻甲介において更に好酸球性を増加させたが、その他の鼻
13 組織では炎症を促進しなかった。O₃及びOVAの3日間曝露の後には、通常、粘液分泌細
14 胞を含まない領域に粘液を含む細胞（すなわち粘液細胞化生）が出現すると共に、顎骨鼻
15 甲介に沿って並んでいる鼻の移行上皮で上皮細胞数が増加した。OVAの複数回投与では、
16 中隔に沿う呼吸上皮中で上皮粘液物質が増加したが、上皮細胞数は増加しなかった。また、
17 O₃及びOVAの3日間曝露により、中隔における上皮内粘液物質はOVA単独曝露よりも大
18 大きく増加した。以上の結果は、O₃曝露がアレルゲン投与と関連する上皮反応及び炎症反
19 応を増悪させることを明らかにした。さらに、O₃及びアレルゲンの複合曝露により、いず
20 れか一方の物質のみの曝露によって誘導された鼻の粘液物質産生が促進された。

21
22 Wagner *et al.* (2009)は、O₃曝露によるアレルギー性副鼻腔炎の増悪におけるγ-トコフェ
23 ールの効果について検討した。実験第1日に10~12週齢の雄の Brown Norway ラットを
24 OVA感作させ、第14、15日に生理食塩水又はOVAの鼻腔内投与によるチャレンジを行い、
25 第15~18の4日間、0、100mg/kgのγ-トコフェロールを経口投与し、第17、18日にろ過
26 空気又は1 ppmのO₃を8時間/日（午前7時30分~午後3時30分）の全身吸入曝露した
27 （各群7匹、合計56匹）。実験第19日に鼻部組織試料を採取し、病理組織、ムチン糖蛋白
28 5AC mRNAを観察した。鼻腔粘膜への軽度から中程度の好酸球浸潤がOVA感作ラットで
29 認められ、OVA感作ラットにO₃を曝露することで、上顎洞、鼻涙管、近位中隔における
30 更なる好酸球増加を誘導した。アレルギーモデル動物へのO₃曝露により、中隔、上顎洞で
31 の上皮内粘液物質の増加もみられた。γ-トコフェロール投与は、O₃とアレルゲンの相乗効
32 果による粘液物質や好酸球の増加を抑制するとともに、ムチン遺伝子 rMuc5AC 発現増加
33 も抑制した。

34
35 Johnston *et al.* (2005b)は、8週齢以上の野生型 C57BL/6 マウス及びIL-6欠損マウスに室
36 内空気又は0.3、2 ppmのO₃を3時間（急性曝露）、室内空気又は0.3 ppmのO₃を72時間

1 (亜急性曝露)、全身吸入曝露させた。ボディプレチスモグラフで測定した気道反応性は、
2 曝露前日、及び急性曝露、亜急性曝露終了直後にメサコリンを投与して Penh (enhanced pause)
3 を用いて比較した。BALF 中の総細胞数、細胞分画、総タンパク質、IL-6、KC、MIP-2、sTNFR1、
4 sTNFR2、エオタキシンを調べた。肺における IL-6 mRNA 発現については、野生型マウス
5 において、0.3 ppm の O₃ の急性、亜急性曝露により空気曝露と比較して上昇した。BALF に
6 ついては、0.3 ppm の O₃ の急性、亜急性曝露により、野生型、IL-6 欠損の両マウスにおい
7 て総タンパク質、sTNFR1、sTNFR2 が空気曝露と比較して増加した。野生型マウスと IL-6
8 欠損マウスを比較すると、空気、0.3 ppm の O₃ 急性曝露後の総タンパク質量は同程度であ
9 ったが、空気、0.3 ppm の O₃ 急性曝露後の sTNFR2 量、空気曝露後の sTNFR1 量は IL-6 欠
10 損マウスにおいて野生型マウスよりも低かった。O₃ 亜急性曝露後の総タンパク質、sTNFR1、
11 sTNFR2 量、好中球比率は、IL-6 欠損マウスにおいて野生型マウスよりも低かった。2 ppm
12 の O₃ 急性曝露により、野生型マウスでは全ての BALF 炎症パラメーターが空気曝露時と
13 比較して上昇した。一方、IL-6 欠損マウスでは、タンパク質、エオタキシン、KC、sTNFR
14 1 は空気曝露と比較し、上昇したが、sTNFR2、MIP-2 の上昇はみられなかった。タンパク
15 質、エオタキシン、KC、sTNFR 1 の上昇の程度は、野生型マウスと IL-6 欠損マウスで相
16 違はなかった。また、野生型マウス、IL-6 欠損マウスとも 2 ppm の O₃ 急性曝露は、BALF
17 中総細胞数に顕著な差をもたらさなかったが、好中球、上皮細胞、好酸球の割合は変化した。
18 2 ppm の O₃ 急性曝露後の BALF 中の好中球、上皮細胞、好中球の割合は、室内空気を
19 曝露された対象群と比較し野生型のマウスで増加し、O₃ 曝露に伴って、BALF 中の好中球
20 数は野生型マウスと比較し IL 欠損マウスで低下を認めた。一方、上皮細胞と好中球におけ
21 る増加の程度は、野生型マウスと IL 欠損マウス間で差がみられなかった。0.3 ppm の O₃
22 急性曝露により野生型、IL-6 欠損の両マウスとも気道過敏性が生じたが、遺伝子型の違い
23 による気道過敏性の重症度に差はなかった。また、亜急性曝露ではどちらの遺伝子型にも
24 変化は生じなかった。Penh のベースライン値は、野生型、IL-6 欠損の両マウスとも 2 ppm
25 の O₃ 曝露により増加したが、0.3 ppm の O₃ 曝露では、このような変化はみられなかった。
26 以上の結果から、IL-6 欠損は高濃度の O₃ 曝露や低濃度の亜急性曝露後の気道における好
27 中球増加を抑制し、sTNFR1、sTNFR2 の両方あるいはどちらか発現を低下させるが、少な
28 くとも 0.3 ppm の O₃ 曝露では、O₃ 誘導による気道過敏性の亢進に IL-6 欠損が影響しないこ
29 とを示唆している。

30

31 Plopper *et al.* (2006)は、47~71 日齢の雄の野生型 strain129 マウス及び 51~56 日齢の雄の
32 クララ細胞分泌タンパク質欠損マウスにろ過空気又は 0.2、1.0 ppm の O₃ を 8 時間、全身吸
33 入曝露させた。曝露後 15 分以内に屠殺し、近位気道、気道中間部、終末細気管支の組織を
34 採取し、組織傷害及び壊死、繊毛細胞、非繊毛細胞数について観察を行った。また、1.0 ppm
35 の ¹⁸O₃ を 4 時間曝露させた後、BALF、肺組織を採取し、肺実質及び間質への O₃ の残存量
36 を調べた。クララ細胞分泌タンパク質欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、O₃ 曝露後

1 の BALF、肺組織中の O₃ 残存量は減少したが、1.0 ppm の O₃ 曝露後、近位気道、気道中間
2 部、終末細気管支における組織傷害が増悪し、壊死細胞数の増加、繊毛細胞、非繊毛細胞
3 の減少が認められた。以上 の結果から、クララ細胞分泌タンパク質は O₃ 曝露による気道・
4 気管支傷害に保護的に働いていることが示唆された。

5 Oslund *et al.* (2008)は、NK-1 (ニューロキニン-1: neurokinin-1) 受容体拮抗薬又は生理食
6 塩水で処理した雄の Wistar ラットに 1 ppm の O₃ を 8 時間、全身吸入曝露させた。対照群
7 として、生理食塩水による前処理を行ったラットにろ過空気を曝露させた (各群 8 匹)。曝
8 露終了の 8 時間後、BALF、肺組織を採取し、気管支の上皮・間質に遊走・浸潤する好中
9 球数、気管支上皮細胞の細胞死及び増殖 (修復) の程度、終末細気管支におけるカスパー
10 ゼ (caspase) 3 活性化等について調べた。その結果、O₃ 曝露により、気道上皮に傷害が認
11 められ、それは NK-1 受容体を介したものであった。O₃ 曝露によるカスパーゼ 3 の活性化
12 は認められなかったことから、O₃ 曝露によって生じた気管支上皮細胞の細胞死は非アポト
13 ーシス型のプログラム細胞死であることが示された。NK-1 受容体拮抗薬による前処理を
14 行うことで、上皮の傷害を防ぐことができたが、気道上皮に浸潤する好中球数には変化が
15 みられなかった。

16
17 Bao *et al.* (2013)は、急性オゾン曝露が、最も悪化したアレルギー性気道炎症の発症を前
18 提とした喘息モデルの病態生理学的特徴に及ぼす影響について検討した。6~8 週齢の雌の
19 BALB/c マウスに OVA 感作を行い喘息モデルとした後、2ppm の O₃ を 3 時間曝露させ、マ
20 ウスにおけるエンハンスドポーズ (Penh)、総細胞数および細胞百分率、可溶性メディショ
21 ナー濃度、病理組織、および Muc5ac mRNA 発現を観察した。解析の結果、オゾンは、コ
22 ントロールにおける気道過敏性(AHR)を誘導し、喘息マウスにおける既存の AHR をさらに
23 増幅させる可能性があることが示された。オゾンへの曝露により、喘息マウスは、コント
24 ロールよりも気管支肺胞洗浄において好中球、TNF- α 、IL-13、およびヒアルロン酸をより
25 発現した。喘息マウスとコントロールマウスは、いずれも近位気道および遠位気道におけ
26 る上皮細胞密度の低下を示した。オゾンは、喘息を有するマウスにおける粘液産生および
27 ムチン遺伝子発現の増加を悪化させた。これら結果は、喘息を有する個体が高レベルの大
28 気中オゾンに曝露された場合、健常個体とは違った病態を引き起こし悪化に向かう可能性
29 を示唆している。

30
31 Sunil *et al.* (2013)は、細気管支上皮に対するオゾンの影響を分析した。ラットをオゾン (2
32 ppm、3 時間) に曝露すると、細気管支上皮において急速 (3 時間以内) および持続的 (最
33 大 72 時間) に、細胞過多、繊毛の喪失、細気管支炎の壊死などを含む組織学的変化が生じ
34 た。血管周囲の浮腫および血管のうっ血も明らかであり、加えて気管支肺胞洗浄液中では
35 クララ細胞分泌タンパク質の減少が認められ、これは曝露後 24 時間で最大になった。オゾ
36 ンはまた、細気管支上皮において 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン、Yml およびヘム

1 オキシゲナーゼ-1 の発現を誘導した。これは切断されたカスパーゼ-9 とベクリン-1 の発現
2 増加に付随しており、アポトーシスとオートファジーの開始を示す。上皮細胞アポトーシ
3 スの調節因子であるガレクチン-3 の急速かつ持続的な増加も認められた。オゾン曝露後 (3
4 ~24 時間)、シクロオキシゲナーゼ-2、誘導型一酸化窒素シンターゼおよびアルギナーゼ-1
5 の発現の増加が細気管支上皮に認められた。細気管支上皮におけるオゾン誘発性損傷およ
6 び酸化ストレスは、呼吸力学におけるメタコリン誘発性変化に関連していた。それゆえに、
7 高用量のメタコリンでは、肺コンプライアンスおよび一回換気量の減少とともに、肺抵抗
8 およびエラスタンスの増加が認められた。これは気道の変化の結果として、オゾンが肺の
9 剛性の増加を引き起こすことを示している。本研究は、細気管支上皮が、オゾンへの急性
10 曝露によって誘発される傷害および酸化ストレスに非常に感受性が高いことを示している。
11 さらに、これは肺機能の変化を伴う。

12

13 Fanucchi *et al.* (1998)は、環境汚染物質の組み合わせによる影響を調べるため、O₃ とエン
14 ドトキシンの複合曝露影響について研究を行った。O₃ への繰り返し曝露が鼻腔移行上皮に
15 おける粘液細胞化生を生じさせることが報告されていることから、エンドトキシンへの曝
16 露が O₃ 誘発性の粘液細胞化生を増強するという仮説について検証した。ラット
17 (FISHER344/N、雄、10-12 週齢、n = 6/群) に 0 または 0.5 ppm の O₃ を 1 日 8 時間、3 日
18 間曝露した後、鼻腔内に 0 または 50 µg のエンドトキシンを含む生理食塩水を鼻腔に 1 日
19 1 回、2 日間投与し、エンドトキシン投与の 6 時間後または 3 日後にラットを屠殺して、鼻
20 腔移行上皮組織の病理組織解析およびムチン特異的 mRNA (rMuc-5AC) の定量を行った。
21 ラットは各群 6 匹ずつを使用した。鼻腔移行上皮における上皮細胞密度は、エンドトキシ
22 ン投与 3 日後の O₃/生理食塩水群および O₃/エンドトキシン群において、空気/生理食塩水群
23 と比較して上昇していた。粘液細胞密度については、エンドトキシン投与 6 時間後および
24 3 日後の O₃/エンドトキシン群において、空気/生理食塩水群と比較して上昇していた。鼻
25 腔移行上皮内の粘液物質量は、エンドトキシン投与 6 時間後では空気/生理食塩水群と比較
26 して O₃/エンドトキシン群でのみ増加したが、エンドトキシン投与 3 日後では O₃/生理食塩
27 水群においても増加が見られた。rMuc-5AC mRNA レベルは、エンドトキシン投与 6 時間
28 後では空気/生理食塩水群と比較して空気曝露/エンドトキシン投与群および O₃ 曝露/エン
29 ドトキシン投与群で増加したが、3 日後では O₃ 曝露/エンドトキシン投与群でのみ増加が認
30 められた。以上の結果より、エンドトキシンへの曝露が O₃ 曝露による鼻腔における粘液細
31 胞化生を増強させることが示唆された。

32

33 Cho *et al.* (1999b)は、10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラットに清浄空気又は 0.5 ppm の
34 O₃ を 8 時間/日 (午前 6 時~午後 2 時) で、1、2、3 日間連続で全身吸入曝露させ (各群
35 8 匹)、免疫組織化学的解析、遺伝子発現解析 (RT-PCR) を行った。1、2 日間曝露のラッ
36 トについては曝露終了の 2 時間後、3 日間曝露のラットについては曝露終了の 2 時間後又

(案)

1 は1、2、4 日後に屠殺し、前部鼻腔、上顎甲介の組織を採取した。全てのラットは屠殺2 時
2 間前に BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) を腹腔内投与した。組織化学的に鼻腔の上皮細胞、
3 好中球、粘液細胞数及び粘液物質量を調べ、上顎甲介については気道のムチン遺伝子であ
4 る rMuc-5AC mRNA の検出を行った。上皮細胞及び粘液細胞数、粘液物質の蓄積について
5 は、O₃ の曝露期間による大きな変化は無かったが、O₃ 曝露後 1~4 日には、増加がみら
6 れた。一方、鼻腔移行上皮における好中球数は、O₃ 曝露 2 日までは顕著に増加したが、
7 O₃ 曝露後 1~4 日後に減少した。BrdU を取り込んだ増殖性の上皮細胞も好中球数と同様
8 の変化を示した。rMuc-5AC mRNA の発現は O₃ 曝露によって速やかに増加し、曝露後に
9 おいても発現の増加を維持していた。

10
11 Cho *et al.* (2000)は、O₃ 曝露 14 時間前にウサギ抗ラット好中球抗血清又はウサギ正常血
12 清で処置した 10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラットに清浄空気又は 0.5 ppm の O₃ を 8 時
13 間/日 (午前 6 時~午後 2 時) で 1 日、又は 3 日、全身吸入曝露させた (各群 6 匹)。O₃ を
14 1 日曝露したラットからは、曝露終了直後に上顎甲介から mRNA を抽出し、気道粘液であ
15 るムチン遺伝子の rMuc-5AC の検出を行った。3 日間曝露したラットは、2 時間又は 4 日間、
16 清浄空気中で飼育後、鼻腔移行上皮における好中球数や、粘液細胞化生の指標となる粘液
17 細胞数、粘液物質の蓄積について、病理組織学的に解析した。鼻腔移行上皮における好中
18 球数は、3 日間の O₃ 曝露の 2 時間後において著明に増加したが、好中球に対する抗体処置
19 により顕著に低下した。また、鼻腔移行上皮における粘液細胞数及び粘液物質の蓄積は、
20 O₃ 曝露の 4 日後において増加したが、好中球に対する抗体処置により低下した。一方で、
21 ムチン遺伝子である rMuc-5AC mRNA の発現は O₃ 曝露後に増加したが、好中球に対する抗
22 体処置の効果は認められなかった。

23
24 Wagner *et al.* (2001a)は、O₃ 及びエンドトキシンの複合曝露が、それぞれの単独曝露にお
25 いて認められる炎症等の生体影響にどのように影響するか、また、その機構に好中球が関
26 与するかを検討するため、ウサギ抗ラット好中球抗血清を腹腔内投与し、好中球を排除し
27 た 10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラット及び正常ラットにろ過空気又は 0.5 ppm の O₃
28 を 8 時間/日で 3 日間吸入曝露させ、一部は曝露終了の 2 時間後又は 4 日後に屠殺した。
29 残りは O₃ 曝露の後、生理食塩水又は 20 µg のエンドトキシン (エンドトキシンとして LPS
30 を使用) を 1 回/日で 2 日間、鼻部投与し、投与の 6 時間後又は 3 日後に屠殺した。鼻部、
31 肺の組織を採取し、好中球数、粘液物質密度、ムチン遺伝子 rMuc5AC mRNA の解析、及
32 び組織形態学的検討を行った結果、上皮や炎症性の反応は、O₃ あるいはエンドトキシン
33 を単独で曝露するよりも複合曝露する方が大きくなること、その機構に好中球が関わる場
34 合と関わらない場合があることが示された。

35
36 Wagner *et al.* (2001b)は、O₃ 曝露による粘液細胞への影響に対するエンドトキシンの増強

1 効果に好中球が関与しているかを検討するため、10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラット
2 にろ過空気又は 0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日で 3 日間吸入曝露させ（実験第 1~3 日）、曝露
3 終了直後にウサギ抗ラット好中球抗血清又はウサギ正常血清で処置し（第 3 日）、翌日から
4 生理食塩水又は 100µg のエンドトキシン（LPS）を 1 回/日で 2 日間鼻部投与した（実験第
5 4~5 日）。エンドトキシン又は生理食塩水の 2 日目の投与の 6 時間後又は 3 日後に鼻部組
6 織を採取し、鼻移行上皮の好中球数と粘液物質量、ムチン遺伝子 rMuc-5AC mRNA の発現
7 の解析及び病理組織学的解析を行った。O₃ 曝露の有無に関わらず、エンドトキシン曝露に
8 よる好中球の一時的浸潤がみられ、また、O₃ 曝露による粘液物質の増加反応をエンドトキ
9 シンが増強させたが、好中球を欠損させたラットでは、これらの影響は抑制された。O₃ 曝
10 露により鼻移行上皮における rMuc-5AC mRNA 発現は増加し、エンドトキシンはこれを増
11 強させたが、エンドトキシンによる rMuc-5AC mRNA 発現の増加に対し、好中球欠損は影
12 響しなかった。

13
14 Wagner *et al.* (2003)は、大気中汚染物質への複合曝露は、単一汚染物質の吸入曝露よりも
15 気道上皮への中毒性が高くなる可能性があり、既報において O₃ 及びアレルギーや細菌のエ
16 ンドトキシン等、生物由来の炎症性物質への経鼻吸入による複合曝露によってラットの上
17 皮反応及び炎症反応が増大していたことから、げっ歯類の肺気道中の呼吸上皮に及ぼす O₃
18 及びエンドトキシンの毒性相互作用を検討した。10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラット
19 に 0、2、20 µg のエンドトキシン（LPS）を鼻腔に投与し、6 時間後にろ過空気又は 1.0 ppm
20 の O₃ を 8 時間/日で全身吸入曝露させる手続きを 2 日間反復した。実験第 5 日目に BALF
21 を採取し、BALF 中のマクロファージ数、リンパ球数、好中球数、粘液物質分泌量及びエ
22 ラスターゼ量を調べ、さらに、肺組織を処理し、上皮内粘液物質密度、上皮細胞密度の光
23 学顕鏡検査及び形態計測解析を行った。また、誘導気管支を顕微解剖し定量的 RT-PCR
24 により分析し、呼吸上皮に存在する定常状態のムチン遺伝子 rMuc-5AC mRNA 濃度を定量
25 した。エンドトキシン投与によって BALF 中の好中球数が用量依存的に増加し、20 µg の
26 エンドトキシンを投与された O₃ 曝露ラットでは 2 倍に増加した。20 µg のエンドトキシン
27 を投与されたラットの BALF 中に含まれる rMuc-5AC mRNA は増加したが、2 µg のエンド
28 トキシン投与ラットでは増加しなかった。O₃ への曝露のみでは粘液過分泌が起こらなかつ
29 したが、20 µg 又は 2 µg のエンドトキシンを投与されたラットでは O₃ 曝露によって粘液分泌
30 が促進された。空気又は O₃ のみに曝露させたラットの気道中上皮内粘液物質量は少なかつ
31 したが、エンドトキシン投与により気道上皮内粘液物質量は用量依存的に増加し、エンドト
32 キシン投与後に O₃ 曝露させたラットでは 2 倍に増加した。2、20 µg のエンドトキシン投
33 与によって軸性の肺気道中で rMuc5AC の形質発現が誘導され、20µg のエンドトキシン投
34 与ラットでは O₃ への曝露によって更に発現が増加した。以上の結果から、ラット肺気道
35 中では O₃ への曝露によって生物由来物質に起因する好中球性の炎症、粘液産生と分泌が促
36 進されることが示された。

1
2 van Bree *et al.* (2001)は、O₃曝露による曝露時間依存性を調べるため、特定病原体未感染
3 の雄の Wistar RIV: Tox ラットにろ過空気又は0.4 ppmのO₃を23.5~24時間/日で1、3、7、
4 28、56日間、全身吸入曝露させた。3、7、28、56日曝露の後、それぞれ実験第7、14、28
5 日目、実験第14、28、56日目、実験第35、56日目、実験第136日目に、炎症反応、肺構
6 造変化、コラーゲン変化に関し、生化学的、形態学的手法によって観察し、回復状況を検
7 討した。BALF中の多形核白血球及び血漿タンパク質は実験第1日目に最大になり、曝露
8 中6日以内に回復した。肺泡マクロファージは曝露56日まで増加を続け、曝露終了後はゆ
9 っくり回復した。O₃曝露中、肺小葉部の炎症が認められた。曝露7日目には肺小葉部中核
10 部分の肥厚がみられた。細気管支の分岐部中隔の肥厚が7、28、56日間の曝露で進行的に
11 認められ、28日間の曝露で認められたコラーゲンの増加は56日間の曝露でより増強した。
12 O₃曝露中は、細気管支炎が進行し、曝露終了後の回復期にも継続してみられた。以上の
13 結果より、O₃曝露初期にみられたBALF中のタンパク質、好中球の浸潤は曝露を継続する
14 と、みられなくなるが、肺泡マクロファージの増加や細気管支の肥厚、呼吸細気管支の形
15 成、コラーゲン形成等の構造変化は、曝露中継続しており、曝露終了後の回復期に一部の
16 慢性的反応は収まるが、その他の影響は消失しないことが示された。

17
18 Gohil *et al.* (2003)は、C57BL/6マウスにろ過空気又は1 ppmのO₃を夜間8時間/日（午前
19 0時~午前8時）で連続3日間吸入曝露させた。曝露終了後、肺を取り出し、肺組織 mRNA
20 による遺伝子チップ解析 (transcriptome analysis) を行った。解析した約4000遺伝子のうち
21 約260がO₃曝露の影響を受け、そのうち80%はO₃曝露群で対照群と比較して抑制され、
22 20%は誘導された。炎症性サイトカインであるNF (nuclear factor) -kBの活性化を示唆す
23 る血清アミロイドA3 mRNAの誘導が20倍になり、DNA合成や細胞増殖に関わる12遺伝
24 子が最大14倍まで上昇した。CD44 mRNAの約7倍の増加は、O₃による過形成及び肺のリ
25 モデリングを示唆している。その一方で、異物代謝系や免疫系の遺伝子発現は抑制された。

26
27 Oyarzun *et al.* (2005)は、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いてO₃の慢性曝露によ
28 る呼吸器への影響を検討した。30日齢のSprague-Dawleyラットに生理食塩水又は1 U/100 g
29 のブレオマイシンを気管内投与し、30日後に室内空気又は0.25 ppmのO₃を4時間/日、5
30 日/週で5日間又は60日間、全身吸入曝露させた。O₃曝露終了の20時間後にラットを屠殺
31 し、肺の病理組織変化を観察し、炎症、線維化、気腫化をスコア化した。ブレオマイシン
32 気管内投与とO₃曝露は両者ともに肺の炎症と線維化を形成し、ブレオマイシン誘発の肺の
33 炎症及び線維化は、60日間のO₃曝露では変化しなかったが、5日間のO₃曝露により悪化
34 した。これらの結果から、あらかじめ傷害を受けた肺では、O₃の短期曝露が傷害悪化のリ
35 スク因子になることが示唆される。

(案)

1 Muramatsu *et al.* (2006)は、ヒスタミン吸入が気道上皮細胞の膨張に与える影響を調べる
2 ため、モルモットを用いて O₃ の急性吸入曝露実験を行った。Dunkin Hartley モルモット(雄、
3 n= 8~10/群) に 3 ppm の O₃ を 2 時間曝露した後、ヒスタミンを吸入させて肺抵抗を測定す
4 ると共に組織学的な解析を行った。空気曝露群と比較して、O₃ 曝露群ではヒスタミン吸入
5 による肺抵抗上昇の閾値 (PC200) に低下が認められた。ヒスタミン吸入は気道上皮の繊
6 毛上皮細胞及び杯細胞を肥大させ、上皮組織を肥厚化させたが、その変化は空気/ヒスタミ
7 ン群よりも O₃/ヒスタミン群でより顕著であり、O₃/ヒスタミン群でのみ、内周 1.0mm 以上
8 又は 2.0mm 以上 の気道における上皮組織の肥厚化が認められた。これらの結果は、特に
9 気道炎症が生じている状況下において、気道上皮細胞の肥大がヒスタミン吸入による肺抵
10 抗の上昇に寄与していることを示唆している。

11

12 Kumagai *et al.*(2016)は、C57BL/6 マウス、T 細胞および B 細胞欠損 Rag2^{-/-}マウス、およ
13 び ILCs を含む全てのリンパ球を欠損した Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}マウスを用いて、オゾン誘導好酸
14 球性鼻炎の病因における自然リンパ球(ILCs)の役割を調べた。マウスは、9 連続日(平日、4
15 時間/日)で 0 または 0.8 ppm のオゾンに曝露した。曝露後 24 時間後、組織病理学的観察お
16 よび遺伝子発現解析のための鼻腔組織を採取した。オゾンに曝露した C57BL/6 および
17 Rag2^{-/-}マウスでは、顕著な好酸球性鼻炎および上皮リモデリング(例えば、上皮性過形成お
18 よび粘液性細胞転移)が認められた。キチナーゼ様タンパク質およびアラミン(IL-33、
19 IL-25、および胸腺間質性リンパ球新生因子)も、オゾン曝露 C57BL/6 および Rag2^{-/-}マウス
20 の鼻腔上皮において形態的に増加した。オゾン曝露により、C57BL/6 および Rag2^{-/-}マウス
21 において、Il4、Il5、Il13、St2、エオタキシン、MCP-2、Gob5、Arg1、Fizz1、および Ym2mRNAIN
22 の発現が増加した。他方、オゾンに曝露された ILC 欠乏型 Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}マウスにおいて
23 は、鼻腔病変や Th2 あるいは ILC2 関連転写物の過剰発現がみられなかった。これらの結
24 果は、オゾン誘導性好酸球性鼻炎、鼻腔上皮リモデリング、および 2 型免疫活性化が ILC
25 に依存していることを示している。これは ILCs がオゾンへの繰り返し曝露によって誘発さ
26 れる鼻腔病理学において重要な役割を果たしていることを実証する最初の研究であると思
27 える。

28

29 Pinkerton *et al.* (1998)は、雄の FISHER344/N ラットに清浄空気又は 0.12、1 ppm の O₃ を 6
30 時間/日、5 日/週で 3 か月間、全身吸入曝露させた。曝露終了の翌日、肺組織を採取し、電
31 子顕微鏡下の形態学的観察、AB/PAS 染色による観察、免疫染色による抗酸化作用を有す
32 る Cu/Zn SOD 及び Mn SOD の局在を調べた。1 ppm の O₃ 曝露により、Cu/Zn SOD は終末
33 気管支及び中心小葉で発現が低下し、Mn SOD は中心小葉で増加した。特に Mn SOD は II
34 型肺胞上皮細胞で増加した。形態的には、1 ppm の O₃ 曝露で、気管、気管後部、近位気管
35 支、終末気管支において非繊毛上皮細胞が増加した。O₃ 曝露による中心小葉での肺リモデ
36 リングは、特に前部において顕著であった。1 ppm の O₃ 曝露でみられたこれらの影響は、

1 0.12 ppm の O₃ 曝露では認められなかった。以上 の結果は 20 か月間の O₃ 慢性曝露による
2 結果と同様であった。

3
4 Tesfaigzi *et al.* (1998)は、O₃ 曝露はラットの気道上皮において粘液細胞化生を誘発する。
5 再生の過程において、アポトーシス機構が化生粘液細胞の除去を担っている可能性がある
6 ことから、O₃ 誘発化生粘液細胞におけるアポトーシス調整遺伝子 Bcl-2 の発現を調べた。
7 Fischer FISHER344/N ラット (雄、n=3 以上 /群) に 0.5ppm の O₃ を 8 時間/日で 1～6 か月
8 曝露させた後、各種解析を行った。ラット鼻腔上皮において、O₃ 曝露により粘液細胞にお
9 ける Bcl-2 の発現が増加した。Western Blot による分析では、1 か月の O₃ 曝露によりラッ
10 トの鼻腔上皮において Bcl-2 が検出されたが、ろ過空気に曝露された対照ラットでは検出
11 されなかった。ラット鼻腔上皮における粘液細胞数は、1 ヶ月以上 の O₃ 曝露により、鼻
12 中隔を除いて増加が認められた。鼻腔における Bcl-2 陽性粘液細胞数は、1 ヶ月の O₃ 曝露
13 により増加したが、3 か月以上 では増加は大きく低下した。これらの結果は、Bcl-2 が粘
14 液細胞化生の発生および解消に役割を果たすことを示唆している。

15
16 Dormans *et al.* (1999)は、肺傷害及び修復の程度と時間経過をげっ歯類 3 種間で比較する
17 ために、7 週齢の雄の Wistar RIV: Tox ラット、NIH マウス、Hartley Crl: (HA) BR モル
18 モットに清浄空気又は 400、800 µg/m³ (0.2、0.4 ppm) の O₃ を 3、7、28、56 日間連続で全
19 身吸入曝露させた。各曝露期間の終了直後、又は 28 日間連続曝露の後、3、7、28 日の回
20 復期間において、肺を採取し、小葉中心性マクロファージ数、小葉中心性隔膜厚、細気管
21 支上皮肥厚など組織病理学的変化、形態計測的变化の観察及び生化学アッセイによる抗酸
22 化酵素の発現の観察を行った。また、肺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、胸腺の重量測定を実
23 施した。げっ歯類 3 種のすべてにおいて、O₃ 濃度と関連する小葉中心性の炎症が起こり、
24 3 日間の曝露後に最大となった。肺泡マクロファージ数及び小葉中心部の肺細胞密度は曝
25 露 56 日目まで進行的に増加し、もっとも感受性が高い種はモルモットであった。マウスの
26 みにおいて、濃度及び曝露時間依存性の細気管支上皮の肥厚が示された。ラット及びモル
27 モットでは、800 µg/m³ の O₃ への 56 日間曝露後にタイプII細胞中で巨大な層状体が認めら
28 れた。環境濃度に近い濃度の O₃ への 3 日間、及び 7 日間の曝露により、マウスでは肺酵素
29 活性が増加し、げっ歯類 3 種のすべてにおいて組織学的及び形態計測的变化が認められた。
30 ラット及びモルモットでは、56 日間の曝露後に肺胞管の線維形成が認められた。マウスで
31 は生化学反応が最も高く、O₃ 曝露からの回復が最も遅かった。組織学的検査、形態計測及
32 び生化学検査から、ラットは 28 日間の曝露から 28 日後には完全に回復したが、モルモッ
33 トでは管隔膜は肥厚したままであり、マウスではすべての酵素活性が対照値と比較して上
34 昇したままであった。結論として、O₃ への反応が最も激しく上昇したのはマウスで、その
35 次がモルモットであり、ラットにおける反応が最小であった。

36

1 Harkema *et al.* (1999)は、雄の FISHER344/N ラット (10~14 週齢) に清浄空気又は 0.25、
2 0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日、7 日/週で 13 週間、全身吸入曝露させた (各群 23 匹)。曝露後
3 の粘液細胞化生の持続性を調べるため、曝露終了の 8 時間後、4、13 週間後に鼻腔を 4 部
4 位に分けて組織切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色及び AB/PAS 染色により粘液
5 物質の蓄積を解析した。0.5 ppm の O₃ を曝露したラットの近位上顎甲介及び遠位上顎甲介
6 部位において、曝露終了 8 時間後に上皮過形成及び粘液物質の蓄積が顕著に増加し、4 及
7 び 13 週間後には徐々に減少していったものの、清浄空気曝露群よりも高い値であった。
8 O₃ 曝露後、13 週間回復させた後に急性的に 0.5 ppm の O₃ を 8 時間曝露したところ、BrdU
9 を取り込んだ細胞として示される増殖細胞数は清浄空気曝露群及び 0.25 ppm の O₃ 曝露群
10 でのみ増加し、近位上顎甲介及び遠位上顎甲介部位における粘液物質の蓄積は、0.5 ppm の
11 O₃ を慢性的に曝露したラットでのみ増加した。

12
13 van Bree *et al.* (2002)は、O₃ 反復曝露による炎症細胞浸潤、透過性亢進、上皮細胞組織の
14 増殖と、これらの反応に対する耐性獲得や回復の時間的進行を検討するために、雄の Wistar
15 ラットに 0.4 ppm の O₃ を夜間 12 時間/日で単回又は連続 5 日間、吸入曝露させ、さらに、
16 一部のラットに対してはろ過空気曝露による回復期間において O₃ 夜間 12 時間曝露を実施
17 した。これにより、ラットは、I: ろ過空気 5、10、15、20、25 日間曝露の群、II: ろ過空
18 気曝露後、実験第 5、10、15、20、25 日に O₃ 単回曝露の群、III: O₃ 5 日間連続曝露の群、
19 IV: O₃ 5 日間連続曝露後、回復期間をおき、実験第 10、15、20、25 日に O₃ 曝露の群、に分
20 けられる。曝露終了の 12 時間後に BALF を採取し、総タンパク質量、アルブミン量、フ
21 イブロネクチン量、IL-6、PGE₂、15-HETE (hydroxy-eicosatetraenoic acid)、好中球数、マ
22 クロファージ数等を観察した。また、解剖 2 時間前に BrdU を投与し、肺組織を採取し、
23 細胞増殖測定、マクロファージ数等を観察した。O₃ 1 日曝露では BALF 中の総タンパク、
24 アルブミン、フィブロネクチン、IL-6、好中球数が増加したが、5 日間の反復曝露ではこ
25 れらの反応は消失した。回復実験では、5 日間の反復曝露後、炎症感受性が元来のレベル
26 まで回復するのに 15~20 日を要した。上皮細胞の増殖については、5 日間反復曝露の後に
27 5~10 日間の回復期間をおいた群で単回曝露群と同程度の増殖を示した。以上 の結果から、
28 O₃ 反復曝露中に O₃ に対する炎症性細胞浸潤などには耐性が獲得され、O₃ の短期曝露や反
29 復曝露によって生じた下部気道の炎症からの完全な回復には、従来考えられたよりも長期
30 間を要することが示された。【亜急性~慢性、炎症、経時的变化】

31 Schelegle *et al.* (2003b)は、O₃ 反復曝露による、生理学的適応、上皮傷害/修復、気管のサ
32 プスタンス P レベルの経時的な変化について調べた。Harlan Sprague-Dawley ラット (77 日
33 齢以上、全 63 匹) に 1 ppm O₃ を 8 時間/日で 5 日間曝露した後、ろ過空気を 9 日間曝露
34 するサイクルを 4 回繰り返し、各サイクルの第 1、5 日目および第 1、2、4 サイクルの第
35 14 日目に安楽死させて解析を実施した。なお、各ラットの安楽死 1 時間前に増殖細胞標識
36 として 5-bromo-2'-deoxyuridine を注射した。O₃ 曝露により、浅く早い呼吸が誘導された。

1 中位気管支、細気管支、肺胞管の炎症および上皮傷害が見られ、その影響の程度は曝露の
2 反復ごとに小さくなる傾向が見られた。BALF 中の好中球、白血球、好酸球、マクロファ
3 ージ数および上皮と間質の細胞増殖が増加したが、曝露の反復に伴い影響が弱くなった。
4 逆に、終末細気管支におけるリモデリングについては、サイクルごとに影響の増加が認め
5 られた。これらの結果は、 O_3 曝露による累積性の末梢気道病変が、気道傷害に対する細
6 胞増殖応答の低下によるものであることを示唆している。また、細胞増殖応答の低下は、
7 O_3 誘発傷害に応答した好中球炎症および/または分裂促進性神経ペプチドの放出の減少の
8 結果であることが示唆された。

9
10 Katre *et al.* (2011)は、C57BL/6 マウス (雄、6~8 週齢、 $n=6\sim 10$) に対し、 O_3 を曝露す
11 る実験を行った。曝露群の構成は、(1) 生理食塩水 100 μL 腹腔内投与 + 清浄空気 (FA)
12 曝露、(2) 生理食塩水 100 μL 投与 + O_3 曝露、(3) IN-1233 (TGF- β タイプ I レセプター
13 阻害剤) 20mg/kg 投与 + FA 曝露、(4) IN-1233 投与 + O_3 曝露である。 O_3 曝露を受ける
14 群では、FA 2 日間曝露のち 8 時間/日の O_3 吸入曝露を 5 日間で 1 サイクルとし、これを 5
15 または 10 サイクル繰り返して、呼吸器への影響を調べた。気道壁コラーゲン、ELF 中 TGF- β
16 量、肺 PAI-1 タンパク量、肺 α -SMA 蓄積、Smad2/3 のリン酸化を測定し、影響を評価した。
17 O_3 曝露により ELF 中 TGF- β は増加し、線維症の発達に関わる PAI-1 発現も関連して増加
18 していた。コラーゲンおよび α -SMA の気道壁への蓄積も起こり、線維化は 10 サイクルの
19 O_3 曝露で顕著であった。TGF- β シグナル経路を IN-1233 でブロックしたところ線維化が阻
20 害された。 O_3 曝露は TGF- β シグナル経路を活性化して TGF- β 発現量を増加させ、肺の線
21 維化を促進することが示された。

22 23 1. 1. 2. 呼吸器発達への影響に関する知見

24 Evans *et al.* (2003)は、ハウスダストダニアレルゲン (HDMA) と O_3 曝露が気道基底膜領
25 域 (BMZ) の発達プロセスにどのような影響を与えるかを調べた。30 日齢のアカゲザルを
26 HDMA および/または 0.5 ppm O_3 に 6 ヶ月間曝露した後、BMZ の構造変化を検出するた
27 めコラーゲン I の免疫反応性を測定した。また、BMZ の機能変化を検出するため、パーレ
28 カンおよび線維芽細胞増殖因子-2(FGF-2)、線維芽細胞増殖因子受容体-1 (FGFR-1) および
29 シンデカン-4 を測定した。HDMA+ O_3 曝露群では HDMA 単独曝露群と比較して、①基底
30 膜領域におけるコラーゲン層の薄化、②基底膜領域におけるパーレカンおよび FGF-2 の減
31 少、③基底細胞と線維芽細胞の FGF-2 発現増加、④基底細胞における syndecan-4 発現増加
32 と FGFR-1 発現減少、が認められた。これらの結果は、 O_3 曝露が BMZ におけるパーレカ
33 ンの取り込みをもたらし、BMZ の非定型発達をもたらすことを示している。また、気道上
34 皮における FGF-2、FGFR-1、およびシンデカン-4 の調節変化に関与することで、肺気道の
35 発達上の問題を生じさせる可能性がある。

36

1 Schelegle *et al.* (2003a)は、O₃曝露がサル呼吸器神経の発達に及ぼす影響を調べるため、
2 HMDA (House dust mite allergen, ハウスダストダニ抗原) 感作によるぜん息様病態発症モ
3 デルとしたアカゲサルと、非感作のアカゲサル (30日齢) にろ過空気又は 0.5 ppm の O₃
4 を 8 時間/日で 5 日間全身吸入曝露させ、その後 9 日間ろ過空気回復させるサイクルを 11
5 回反復した(各群 6 匹)。ぜん息様病態発症モデルのアカゲサルは、生後 14 日及び 28 日に
6 HMDA を皮下投与することにより感作させ、曝露サイクル中のろ過空気又は O₃ 曝露第 3
7 ~5 日に HMDA エアロゾルを 2 時間/日、曝露させた。血清 IgE、ヒスタミン、気道抵抗性、
8 気道反応性、及び肺組織の病理組織学的検索による構造のリモデリングについて調べた。
9 また、BALF を採取し、好酸球の浸潤を調べた。O₃ 曝露、HMDA 感作それぞれ単独の処置
10 では、好酸球の上気道、終末気管支への浸潤が顕著な増加を示したが、それ以外の気道へ
11 の影響は軽度のものしか認められなかった。一方、O₃ 曝露と HMDA 感作処置を両方実施
12 したサルでは血清 IgE、血清ヒスタミン量、気道への好酸球の浸潤など、アレルギー症状
13 の指標が増加し、気道抵抗性や反応性に関連して気道構造の変化が認められた。

14
15 Evans *et al.* (2004)は、生後 14、28 日に HMDA (House dust mite allergen, ハウスダストダ
16 ニ抗原: *Dermatophagoides farinae*) による感作を行った 1 か月齢の雄のアカゲサルに (1)
17 抗原エアロゾルを 2 時間/日で第 3~5 日の 3 日間曝露させ、残りの 11 日間休息させるサイ
18 クル、(2) 0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日で 5 日間、そのうち最後の 3 日間は抗原エアロゾル
19 も曝露させ、9 日間休息させるサイクル、のいずれかの全身吸入曝露サイクル、HMDA 感
20 作を行わないサルに (3) ろ過空気を曝露させるサイクル、(4) O₃ を 5 日間曝露させて、
21 9 日間休息させるサイクル、のいずれかの曝露サイクルを 11 回反復した (各群 4 匹)。そ
22 の後 6 か月間をろ過空気曝露による回復期間とし、HMDA 群及び O₃+HMDA 群については
23 感作維持のため、回復期間中、1 か月に 1 回、HMDA エアロゾルの 2 時間曝露を行った。
24 回復期間終了後、抗原エアロゾルを 2 時間/日で 3 日間曝露させた。曝露直後及び回復期間
25 後、肺機能、気道上皮の基底膜の構造変化 (コラーゲン I、パーレカンの発現) を検討し
26 た。O₃ 曝露により基底膜は増生し、6 か月の回復期においても持続した。HMDA と O₃ の
27 複合曝露では、基底膜の肥厚化と薄層化が不規則に生じていたが、6 か月の回復期により
28 薄層化のみ回復し、肥厚化は継続した。

29
30 Larson *et al.* (2004)は、O₃ 曝露がサル呼吸器神経の発達に及ぼす影響を調べるため、ハ
31 ウスダストダニ抗原 (HMDA) 感作によるぜん息様病態発症モデル又は非感作のアカゲサ
32 ル (30日齢) に清浄空気又は 0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日で 5 日間全身吸入曝露させ、その
33 後 9 日間ろ過空気回復させるサイクルを 11 回反復した。ぜん息様病態発症モデルのサル
34 は、生後 14 日及び 28 日に HMDA を皮下投与することにより感作させ、曝露サイクル中
35 のろ過空気又は O₃ 曝露第 3~5 日に HMDA エアロゾルを 2 時間/日、曝露させた。処置終
36 了後、肺内気道組織の薄切切片を作成し、免疫組織化学的に神経に対する影響を調べた結

1 果、第 6~7 肺内気道部位において、上皮中の神経密度は O₃ 曝露又は HDMA 感作それぞ
2 れ単独の処置で低下し、O₃ 曝露と HDMA 感作の併用により顕著に低下した。また、上皮
3 単位辺りの神経細胞数は O₃ 曝露単独及び O₃ 曝露と HDMA 感作の併用で顕著に増大した。

4
5 Fanucchi *et al.* (2006)は、O₃ のエピソード曝露の反復による傷害と修復の繰り返しが正常
6 肺の成熟に影響し、慢性気道疾患及び肺機能低下を誘発することを確認するため、1 か月
7 齢の雄のアカゲサルに 0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日で 5 日間全身吸入曝露させ、ろ過空気を 9
8 日間吸入曝露させるサイクルを 11 回反復した。対照群にはろ過空気のみ曝露した (各群 6
9 匹)。曝露終了後、肺の発育 (肺重量など)、末梢気道の気道構造、気道上皮の構成、気道
10 平滑筋束の直径、長さ、向きについて評価した。O₃ 曝露群では対照群と比較し、終末細気
11 管支、呼吸細気管支において、肺胞化されていない気道の形成の減少、気道上皮の過形成、
12 平滑筋束の向きの変化などがみられた。以上 の結果から、環境中の O₃ のエピソード曝露
13 が出生後の気管気管支の形態形成を障害する可能性が示唆された。

14
15 Joad *et al.* (2006)は、抗原により感作した動物の抗原反復吸入曝露による気管支、呼吸細
16 気管支におけるアレルギー反応惹起に対する O₃ 曝露の影響を検討するため、生後 14、28
17 日に HDMA (ハウスダストダニ抗原) による感作を行った生後 1 か月のアカゲサル 23 匹
18 に対し、(1) ろ過空気曝露、(2) 抗原エアロゾルを 2 時間/日で 3 日間(第 3~5 日)曝露させ、
19 残りの 11 日間休息させるサイクル、(3) 0.5 ppm の O₃ を 6 時間/日で 5 日間曝露させ、9
20 日間休息させるサイクル、(4) O₃ を 5 日間、そのうち最後の 3 日間は抗原エアロゾルも
21 曝露させ、9 日間休息させるサイクル、のいずれかの全身吸入曝露サイクルを 11 回反復し
22 た。最終曝露の 3~5 日後、気管支、呼吸細気管支を採取し、メサコリンに対する反応性、
23 好酸球数、肺神経内分泌細胞について観察した。メサコリンに対する反応性については、
24 気管支では抗原曝露により、呼吸細気管支では O₃ 及び抗原の曝露により亢進した。好酸球
25 については、気管支では抗原単独あるいは O₃ 及び抗原の曝露により、呼吸細気管支では抗
26 原曝露により増加した。気道反応性は、気管支では好酸球数、肺神経内分泌細胞数と相関
27 したが、呼吸細気管支では相関しなかった。以上 の結果から、抗原曝露によるアレルギー
28 反応に伴う気道反応性への影響に及ぼす O₃ の影響が、気道の部位により異なることが示さ
29 れた。

30
31 Carey *et al.* (2007)は、90、180 日齢の雄のアカゲサルに 0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日で連続
32 5 日間全身吸入曝露 (急性曝露)、又はろ過空気の 9 日間曝露と O₃ の連続 5 日間曝露から
33 成る 2 週間のサイクルを 5 回反復 (エピソード曝露) させた。対照群にはろ過空気を曝露
34 させた。曝露終了直後に鼻腔粘膜の組織学的変化、鼻腔の MRI (磁気共鳴画像法: magnetic
35 resonance imaging) 画像から鼻腔の傷害について検討した結果、O₃ の急性曝露、エピソード
36 曝露によって好中球浸潤を伴う壊死性鼻炎、鼻上皮の萎縮がみられ、この反応は中鼻道

1 で強かった。

2
3 Kajekar *et al.* (2007)は、30日齢の雄のアカゲサルに (1) ろ過空気14日間全身吸入曝露
4 (対照群)するサイクル、(2) 0.5 ppm の O₃ を8時間/日で5日間全身吸入曝露させ、9
5 日間ろ過空気曝露 (O₃群)するサイクルのいずれか、HDMA (ハウスダストダニ抗原)に
6 による感作を行ったサルに (3) 抗原エアロゾルを2.5時間/日で1サイクルの第3~5日の3
7 日間全身吸入曝露させ、残りの11日間ろ過空気曝露 (HDMA群)というサイクル、(4)
8 O₃を5日間、そのうち最後の3日間は抗原エアロゾルも全身吸入曝露させ、9日間ろ過空
9 気曝露 (HDMA+O₃群)するサイクルのうち、いずれかの曝露サイクルを11回反復した(各
10 群4匹、計16匹)。曝露後6か月間を回復期間として、1歳時に気管内の神経密度、神経
11 分布を調べた結果、対照群と比較して、HDMA群では2.5倍、O₃群では3倍、HDMA+O₃
12 群では4倍、神経密度が上昇した。HDMA群、O₃群、HDMA+O₃群の間で神経密度に差は
13 なかったが、HDMA+O₃群における神経密度の上昇が最も顕著であった。また、神経分布
14 に関しても各群間で差があった。神経分布において対照群と最も顕著な差があったのは、
15 HDMA+O₃群であり、続いてO₃群、HDMA群であった。

16
17 Plopper *et al.* (2007)は、アカゲザル(性別記載なし、生後期間、匹数記載なし)に対し、O₃
18 を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、清浄空気群、ダニ抗原曝露群、O₃曝露群、ダ
19 ニ抗原 + O₃曝露群である。曝露濃度はメキシコシティの大気に基づき0.05 ppmに設定し
20 た。吸入による曝露を8時間/日、5日間O₃曝露、9日間フィルター空気曝露を11サイク
21 ル行い、呼吸器への慢性影響を調べた。生後12か月までの免疫応答、気道の発達、気道平
22 滑筋、気道の免疫機構を観察し、影響を評価した。生後~発達期のアカゲザルにO₃反復
23 曝露によるアレルギー性ぜん息発症への影響を検討したところ、気道過敏性の亢進や、好
24 酸球数の増加、気道壁の肥厚や内腔の狭小化を認め(EMTU) (気道のリモデリング)、アレ
25 ルギー反応を増長させた。肺の発達期間に有害物質の曝露により障害を生じると、その後
26 曝露を止めても障害は残るか成長とともに悪化していく。

27
28 Miller *et al.* (2009)は、O₃がアレルギー性ぜん息を増悪させる機構を解明する目的で、生
29 後14、28日にHDMA (ハウスダストダニ抗原)による感作を行った生後1か月の雄のア
30 カゲサルに対し、(1) 抗原エアロゾルを2時間/日で1サイクルの第3~5日の3日間全身
31 吸入曝露させ、残りの11日間は休息 (HDMA群)させるサイクル、(2) O₃を8時間/日で
32 1サイクルの第1~5日の5日間、第3~5日の3日間はO₃及び抗原エアロゾルを全身吸入
33 曝露させ、9日間休息 (HDMA+O₃群)させるサイクル、非感作のサルに対しては(3) ろ
34 過空気曝露 (FA群)、又は(4) 0.5 ppm の O₃を1サイクルの第1~5日の5日間全身吸入
35 曝露させ、9日間休息 (O₃群)させるサイクルを設定し、11回反復した(各群6匹)。各
36 サイクルの第5日に血液を採取し、最終曝露の3~5日後にBALF、血液を採取し、末梢血

(案)

1 中の白血球数、リンパ球数の計測、末梢血、BALF 及び気道組織（気道上皮、間質）中の
2 CD4+細胞、CD8+細胞、CD25+細胞等の免疫組織学的、形態学的検討を行った。生後 3 か
3 月の HDMA+O₃ 群で末梢血中の CD4+/CD25+リンパ球の増加、生後 6 か月の HDMA+O₃
4 群で末梢血及び BALF 中の CD4+/CD25+、CD8+/CD25+リンパ球の増加が認められた。
5 HDMA 曝露による気道粘膜中の CD25+細胞の総体積の増加が認められ、O₃はこの反応に
6 影響しなかったが、CD25+細胞の分布を末梢から主気道側に移行させた。以上の結果から、
7 出生後の O₃ や抗原への曝露は末梢血や気道のリンパ球亜群の数や分布に影響を与えるこ
8 とが明らかになった。

9
10 Hunter *et al.* (2011)は、ラットモデルを用いて、発達期（生後(PD)6日）の重要な時期の
11 オゾン(O₃)誘発性神経過反応性のメカニズムを調べた。O₃誘発性神経過反応性は、神経成
12 長因子(NGF)を介し、気道神経からの炎症性神経のサブスタンス P(SP)の放出が増強すると
13 考えられる。PD6-PD28間の仔ラットは、O₃(2ppm、3時間)または濾過空気(FA)への曝露の
14 24時間後に測定、あるいはNGF合成のタイムラインを確立するために、PD6もしくはPD21
15 に、O₃あるいはNGFに曝露し、PD28には再度O₃曝露し、PD29の検査に供された。測定
16 には、気管上皮細胞のNGF mRNA、気管支肺胞洗浄液中のNGFタンパク質、気道SP-神
17 経線維密度(NFD)、および迷走神経節におけるSPポジティブ気道ニューロンが含まれた。
18 解析の結果、FAと比較し、O₃への急性曝露は、PD10およびPD15における気管支肺胞洗
19 浄液のNGF量およびPD6における上皮細胞のNGF mRNA発現量を増加させた。
20 O₃-PD6/O₃-PD28群におけるNGFタンパク質量およびmRNA発現量は、O₃-PD21/O₃-PD28
21 およびO₃-PD6/FA-PD28群よりも高かった。NGF-PD6/O₃-PD28は、気道平滑筋およびSP
22 ポジティブ感覚ニューロンのSP神経支配を増加させた。以上より、NGFは感覚神経支配
23 を増進することで、若年期においてO₃に対する急性反応もしくは長期感受性を仲介する可
24 能性が示唆された。この実験モデルは、幼児期のO₃応答に関連する可能性がある。

25
26 Lee *et al.*(2011)は、この研究で、若年期のラットにオゾンおよび有機画分を多く含む超微
27 細粒子を亜慢性曝露し、長い回復期の後に、成体ラット時の気道構造の変化を調べた。新
28 生児期のオスのSprague-Dawleyラットは、生後7日から25日までの肺の発達期間中に、
29 0.5 ppmのオゾンの3サイクルに曝露された。週5日曝露(Ozone52)または週2日曝露
30 (Ozone25)の2つの異なる曝露パターンが用いられ、超微細粒子への同時曝露(OPFP5252、
31 OPFP5225)も行われた。気道構造は、ろ過空気(FA)曝露期間を超えて56日間飼育した
32 後、81日齢で評価された。肺気道キャストからのCT画像を分析することにより、ほとん
33 どの誘導気道について気道直径、長さ、分岐角度、回転角度を決定した。FA対照群と比較
34 して、Ozone52群は右横隔膜葉において特に10を超える世代で気道直径の減少を、遠位世
35 代で気道長の減少を示したが、Ozone25曝露による気道構造の明らかな変化は認められな
36 かった。これらの結果は、出生後のオゾン曝露による気道の変化が遠位領域に限定されず、

1 中部から遠位の誘導気道に広範囲に発生することを示唆している。さらに、初期のオゾン
2 曝露による変化は、曝露後2か月近く回復せず、若年期におけるオゾン曝露後の持続的な
3 気道の構造変化を示している。

4
5 Zellner *et al.* (2011)は、気道ニューロン数が加齢とともに増加する可能性があり、出生後
6 早期の急性 O₃ 曝露は、感覚気道ニューロンの数と SP を含む気道ニューロンの数の両方を
7 増加させる可能性があるという仮説を立て、以下の解析を行った。年齢または急性 O₃ 曝露
8 が気道ニューロン数を変化させる可能性があるかどうかを判断するため、生後 5 日齢の
9 Fischer 344 ラットに 2ppm の O₃ を曝露させ、生後 10, 15, 21, 28 日目に下神経節および頸神
10 経節の気道ニューロンを観察した。下神経節および頸神経節の気道ニューロンは逆行的に
11 標識、除去、解離され、フローサイトメトリーを用いて評価した。ニューロン数を生後 (PD)
12 6、10、15、21、および 28 日に計測したところ、総ニューロン数と気道ニューロン数は PD6
13 と PD10 の間で大幅に増加し、その後徐々に安定した。また、ラットに PD5 で O₃ (2 ppm)
14 またはろ過空気 (FA) に曝露し、ニューロンを PD10、15、21、および 28 で計数したとこ
15 ろ、O₃ に曝露されたラットは PD21 において FA 対照群に比べて少ない総ニューロン数を
16 示した。以上の結果から、著者らは加齢に伴いニューロン数は変化し、出生後早期におけ
17 る急性 O₃ 曝露が感覚ニューロンの発達を著しく変化させることを示しているとした。

18
19 Carey *et al.* (2011)は、アカゲザル (雄、1か月齢、14匹) に対し O₃ を曝露する実験を行
20 った。清浄空気 (FA) 曝露群、O₃1 サイクル曝露群、O₃11 サイクル曝露群である。FA 曝
21 露群は FA 曝露を 5 か月間行った。O₃ 曝露濃度は 0.5 ppm とし、8 時間/日、5 日間の曝露
22 で 1 サイクルとした。O₃1 サイクル曝露群は生後 172 日から 176 日の 5 日間曝露を行い、
23 それまでは FA に曝露した。11 サイクル曝露群は生後 31 日から 35 日の 5 日間 O₃ 曝露を行
24 い、その後 9 日間 FA 曝露しこれを生後 176 日まで 11 サイクル繰返した。曝露終了直後に
25 組織病理、上皮形態計測、上皮内粘液物質形態計測、好中球性炎症の形態計測、粘膜の好
26 中球数、低分子量抗酸化物の細胞内濃度、上顎甲介 (MT) 前部 GCL-C および GCL-M の
27 mRNA 発現量、上皮細胞数密度と抗酸化物濃度の相関分析を行い、影響を評価した。O₃
28 の長期曝露によりアカゲザルに持続性の鼻炎、扁平上皮化生、上皮肥大を引き起こした。
29 上皮細胞密度は 39%増加し、GSH 濃度は 65%上昇し、両者に正の相関が認められた。若
30 年期から O₃ の長期曝露を受けるとアカゲザルに永続的な鼻上皮変化をもたらす、大気汚染
31 がもたらす子供の呼吸器疾患への感受性を高めるであろうと言える。

32
33 Avdalovic *et al.* (2012)は、アカゲザル (雄、1か月齢、n=6) に対し、O₃ を曝露する実験
34 を行った。曝露群の構成は、HDMA (コナヒョウダニ) 感作群、O₃ 曝露群、HDMA+O₃
35 曝露群である。0.5 ppm で 8 時間/日、5 日曝露したのち清浄空気 (FA) に 9 日間曝露し
36 て 1 サイクルとし、これを 5 または 11 サイクル繰返して行い、呼吸器への亜急性影響を

1 調べた。曝露終了直後に右中肺葉を固定し、肺容量、肺胞数、肺胞容量、肺胞毛細血管表
2 面密度、関連遺伝子の発現を観察して影響を評価した。幼若期のアカゲザルにアレルギー
3 症状を誘発させ、O₃曝露による影響を検討したところ、肺胞容積の増大、肺胞数の減少お
4 よび肺胞の毛細血管表面密度の減少が認められた。生後 6 か月時点での観察では、3 か月
5 のアカゲザルよりも肺胞数が増加していたが、この結果と関連遺伝子発現の変化には関連
6 性がみられなかった。幼少期に O₃を吸入曝露させることによって肺胞発達・成熟の時期と
7 外観が変わった。この肺胞成長変化のメカニズムの解明は重症のぜん息や COPD といった
8 慢性肺疾患に関わる肺実質傷害および修復過程の研究に貢献すると考えられた。

9
10 Murphy *et al.* (2012) は、O₃曝露が酸化ストレスに応答する気道の機能をリセットし、ま
11 たこれがニューロキニン-1 受容体(NK-1R)の変化によって媒介されるものと仮定し、以下
12 の実験を行った。アカゲザルの新生仔を生後 6 ヶ月から 12 ヶ月までの間、ハウスダストダ
13 ニ抗原(HDMA)の有無にかかわらず、O₃に間欠的に曝露した。同じく月齢を一致させたサル
14 を、ろ過空気(FA)に曝露した。4つの群(FA、O₃、HDMA、HDMA+O₃)でそれぞれ4~6匹
15 を曝露し、中間気道(肺内世代5~8)より摘出した気道組織を、*in vitro*で過酸化水素(1.2mM)、
16 脂質オゾニド(10mM)曝露、もしくは偽処置したときの、急性酸化ストレスによる NK-1R
17 遺伝子応答について実験を行った。気道応答は、NK-1R および IL-8 遺伝子発現をリアルタ
18 イム定量 RT-PCR を用いて測定した。解析の結果、基底 NK-1R 遺伝子発現レベルは、曝露
19 群間で差がみられなかった。オゾニドまたは過酸化水素による処理は、FA、HDMA、また
20 はHDMA+O₃にさらされた動物において、NK-1R 遺伝子発現を変化させなかった。しかし、
21 O₃曝露動物からの気道組織の脂質オゾニドによる *in vitro*試験では、NK-1R 遺伝子発現は
22 増加した。これらの結果から、過去の O₃曝露歴が気道の定常状態をリセットし、その後の
23 急性酸化ストレスに対する NK-1R 応答を増強させると著者らは結論づけた。

24 25 1.1.3. 炎症・傷害・酸化ストレスに関する知見

26 Bouthillier *et al.* (1998)は、都市の粒子状物質と O₃の吸入に対するラット肺の急性反応を
27 調べた。雄の Specific-pathogen-free Fischer 344 ラットに 0.8 ppm の O₃及び/又は 40 mg/m³
28 の EHC-93 粒子を 4 時間/日で、1 日又は 3 日吸入曝露させ、曝露から 20 時間後に肺組織お
29 よび、中央腺房の中隔細胞の形態、BALF 中成分 (タンパク質、フィブロネクチン、好中
30 球、マクロファージ) および、BAL からの洗浄細胞 (一酸化窒素、TNF- α 、MIP-2、ET-1)、
31 及び血中 ET-1 を解析した。EHC-93 粒子への曝露後に清浄空気に 20 時間曝露しても、急
32 性肺損傷は生じなかったが、EHC-93 粒子曝露により、肺胞マクロファージからの一酸化
33 窒素の産生が減少し、肺胞洗浄液中の細胞からの macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)
34 の分泌が増加した。O₃を吸入すると、肺洗浄液中の好中球とタンパク質が増加した。O₃
35 単独曝露でも肺胞マクロファージの食作用と一酸化窒素産生が減少した。肺洗浄液中の細
36 胞による ET-1 分泌は 1 日の曝露では減少したが、3 日間の曝露では増加した。MIP-2 の分

1 泌に変化はなかった。EHC-93 粒子との複合曝露は、中央腺房における O₃ 誘発性の中隔細
2 胞性 (septal cellularity) を増強したが、O₃ 曝露に関連した肺胞好中球増加および BALF 中
3 タンパク質に測定可能な相乗効果はなかった。強化された中隔肥厚の増悪は、肺洗浄細
4 胞による MIP-2 と ET-1 の両方の産生増加と関連していた。興味深いことに、EHC-93 粒子
5 の吸入は ET-1 の血漿中濃度を増加させたが、この応答は、中心窩中隔組織の変化に対す
6 る O₃ と EHC-93 粒子の相乗効果とは関連していなかった。これは、毛細血管内皮生成ある
7 いは血管収縮性物質の透過性に対して、遠位に分布している粒子状物質の量が影響してい
8 ることを示唆している。総じて、汚染物質への単回曝露または 3 日間の連続曝露後で、同
9 様の影響パターンが観察された。これらの結果は、O₃ と粒子状物質の肺への急性影響に
10 関する疫学的証拠と一致しており、EHC-93 粒子曝露によって心血管への影響が誘発され
11 るメカニズムを示唆している。

12

13 Gupta *et al.* (1998)は、O₃ 急性曝露による肺炎症の誘発とフィブロネクチンの発現の関係
14 について調べた。Sprague-Dawley ラット (雄、6-8 週齢、n = 5/群) にウサギ血清または PBS
15 を気管内投与した後、3 時間後に 0.8 ppm O₃ を 3 時間曝露させた。O₃ 曝露により BALF お
16 よび肺組織中のフィブロネクチンタンパク質が増加し、その増加は気管支内へのウサギ血
17 清投与によって増強された。O₃ 曝露後のフィブロネクチン mRNA の増加もウサギ血清投
18 与によって増強されたが、血清投与自体は肺フィブロネクチン mRNA 発現には影響を及ぼさ
19 なかった。血漿中フィブロネクチンレベルは、空気-PBS 群と O₃-PBS 群では同程度であっ
20 たが、O₃-血清群では増加した。これらの結果は、ウサギ血清の気管内投与により血漿か
21 ら肺へのフィブロネクチンの漏出が生じること、O₃ 曝露後のフィブロネクチンの発現が増
22 加することを示唆している。

23

24 Ishii *et al.* (1998)は、ラットへの O₃ 急性曝露により、肺炎症および好酸球浸潤におけるエ
25 オタキシンの関与について調べた。ラット (Brown Norway、雄、n=4/群) に、1.2 ppm O₃
26 を 6 時間曝露させ、O₃ 曝露前、曝露直後、曝露 20 時間後にエオタキシン mRNA の発現お
27 よび BALF 成分の変化について評価した。またエオタキシンタンパク質を用いた *in vitro*
28 アッセイを行った。エオタキシンのリコンビナントタンパク質は、化学走性チャンバーを
29 用いた *in vitro* 解析において、好酸球に対する走化性活性を示した。O₃ を曝露したマウス
30 では、肺組織におけるエオタキシン mRNA の発現は曝露直後に約 1.6 倍増加し、20 時間後
31 には 4 倍に増加した。また、BALF 中の好酸球数は、対照群と比較して、それぞれ 3 倍お
32 よび 15 倍増加した。また、エオタキシン陽性の肺胞マクロファージおよび気管支上皮細胞
33 が増加した。これらの結果は、ラットの O₃ 誘発性炎症において、エオタキシンが好酸球
34 の動員に関与することを示唆している。

35

36 Koike *et al.* (1998)は、肺胞マクロファージは、肺における炎症の誘導や消炎など微小環

1 境の調整役としての働きを持ち、O₃曝露の際には免疫抑制の働きを示すことから、O₃曝露
2 したラットの BALF 中の物質によるマクロファージ機能への作用について検索した。特定
3 病原体未感染の雄の Wistar ラット (8~12 週齢) にろ過空気又は 1.0 ppm の O₃ を 24 時間
4 /日で連続 3 日間全身吸入曝露させた後に BALF を採取し、ろ過空気曝露ラットから採取し
5 た肺胞マクロファージ及びリンパ節細胞と共に培養し、リンパ節細胞増殖能、NO の産生
6 を調べた。肺胞マクロファージは、コンカナバリン A が誘導するリンパ節細胞の増殖を抑
7 制し、NO を産生するが、O₃曝露ラットから回収した BALF の作用で、肺胞マクロファ
8 ジによるリンパ節細胞増殖反応の抑制作用及び NO 産生は阻害された。

9

10 Laskin *et al.* (1998a)は、O₃の急性曝露が組織の損傷部位へのマクロファージの蓄積によ
11 って特徴付けられる炎症反応に関連しており、これらの細胞は、肺胞上皮細胞とともに活
12 性化され、一酸化窒素 (NO) などの細胞毒性を示す炎症性メディエーターを放出すること
13 から、O₃吸入後に増大する肺マクロファージおよび II 型上皮細胞の NO シンターゼの調節
14 機構について解析した。雌の Sprague-Dawley (specific pathogen-free) ラットに 2 ppm の O₃
15 を 3 時間吸入曝露させ、曝露から 24 時間後に単離した肺胞マクロファージおよび II 型上皮
16 細胞の NO 産生能力を評価した。炎症性メディエーターであるリポ多糖およびインターフ
17 ェロンガンマに応答して、肺胞マクロファージおよび II 型上皮細胞による NO 産生量が増
18 加した。O₃曝露は肺胞マクロファージおよび II 型上皮細胞における誘導性 NO シンターゼ
19 (iNOS) タンパク質および mRNA の発現を増加させるとともに、転写因子 NF-κB 活性を
20 亢進させた。O₃曝露による肺胞マクロファージと II 型上皮細胞の NO 産生および iNOS タ
21 ンパク質の発現増加は、NF-κB の活性を抑制するピロリジンジチオカルバメート (PDTC)
22 によって阻害されたが、O₃曝露群から単離したラットの細胞では、対照群と比較して PDTC
23 に対する感受性が低かった。ゲルシフトアッセイを使用した細胞核抽出物における NF-κB
24 結合活性の測定では、O₃曝露は肺胞マクロファージおよび II 型上皮細胞における NF-κB
25 結合活性を時間依存的に増加させ、O₃曝露後 12~24 時間で分離された場合に最大に達し
26 た。これらのデータから、著者らは NF-κB シグナル伝達の活性の変化が、O₃吸入後の起炎
27 刺激に対する肺マクロファージおよび II 型上皮細胞の応答において重要であることを示唆
28 しているとした。

29

30 Laskin *et al.* (1998b)は、O₃曝露による肺傷害の誘導にかかわる肺胞マクロファージへの
31 影響機構について、サイトカインや NO 産生の面から検討した。特定病原体未感染の雌の
32 Sprague-Dawley ラットに 2 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露し、O₃曝露終了の 3~48 時
33 間後に、肺胞マクロファージを取り出し培養して、NO 産生、TNF-α 産生、タンパク質合
34 成について調べた。O₃曝露によって肺胞マクロファージからの NO 産生は増加し、LPS 及
35 び IFN-γ の存在下では、より増加が誘導されたが、iNOS の阻害剤である aminoguanidine
36 を加えると抑制された。TNF-α 産生については培養時間に依存的な増強がみられた。曝露

(案)

1 部位ではない肝臓における影響を調べるため、O₃曝露後に肝細胞を培養してNO産生を測
2 定したところ、増加が認められ、急性期影響も誘導していることが示された。

3
4 *Mango et al.* (1998)は、クララ細胞分泌タンパク質 (CCSP) 欠損マウスにおけるオキシダ
5 ント感受性変化のメカニズムを調べるため、O₃曝露によるストレス応答反応の変化と、上
6 皮細胞特異的遺伝子発現変化を解析した。129 マウスまたは CCSP^{-/-}マウス (雄、2-5 月齢、
7 n = 3-6/群) に、量反応関係を評価するため 0.5、1.0、2.5 ppm で 4 時間、または経時的変化
8 を評価するため 1.0 ppm で 2、4、8 時間 O₃を曝露させた。CCSP^{-/-}マウスでは、O₃曝露に
9 による肺組織の CYP2F2 mRNA 減少が 129 マウスよりも大きかった。また、MT (メタロチ
10 オネイン) mRNA の増加は、129 マウスよりも CCSP^{-/-}マウスでは早い段階で認められた。
11 また、CCSP^{-/-}マウスでは O₃曝露による肺の IL-6 増加が 129 マウスより大きかった。これ
12 らの結果は、クララ細胞およびその分泌物が持つ抗酸化機能が失われることで、酸化スト
13 レスに対する感受性に変化が生じていることを示している。

14
15 *Nishiyama et al.* (1998)は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を高分子のマーカースとして
16 て用いて、O₃急性曝露の気管粘膜浸透性への影響について調べた。モルモット (*Hartley*、
17 雄、n=6-10/群) に麻酔を施し、生理食塩水、アトロピン、プロプラノロールを静脈内投与
18 またはカプサイシンを皮下投与した 10 分後に、0.5、3 ppm の O₃または空気に 30 分吸入曝
19 露した。曝露直後に、気管の上部と下部を切開し、それぞれから 2 本のポリエチレン製カ
20 ニューレを挿入して気管をセグメンテーションし、HRP 溶液で満たした。HRP の気管内投
21 入前、および投入 10、20、30、40 分後に血液を採取し解析した。O₃に曝露したモルモッ
22 トでは、空気曝露群と比較して、血漿中 HRP 濃度が高かった。O₃曝露による血漿 HRP レ
23 ベルの上昇は、プロプラノロールおよびアトロピンの曝露前投与では影響を受けなかった
24 が、カプサイシンの曝露前投与では阻害された。これらの結果は、O₃誘導性の気管粘膜
25 透過性の増加が内因性ニューロペプチドを介して生じている可能性を示している。

26
27 *Pinkerton et al.* (1998)は、雄の FISHER344/N ラットに清浄空気又は 0.12、1 ppm の O₃を 6
28 時間/日、5 日/週で 3 か月間、全身吸入曝露させた。曝露終了の翌日、肺組織を採取し、電
29 子顕微鏡下の形態学的観察、AB/PAS 染色による観察、免疫染色による抗酸化作用を有す
30 る Cu/Zn SOD 及び Mn SOD の局在を調べた。1 ppm の O₃曝露により、Cu/Zn SOD は終末
31 気管支及び中心小葉で発現が低下し、Mn SOD は中心小葉で増加した。特に Mn SOD は II
32 型肺胞上皮細胞で増加した。形態的には、1 ppm の O₃曝露で、気管、気管後部、近位気管
33 支、終末気管支において非繊毛上皮細胞が増加した。O₃曝露による中心小葉での肺リモデ
34 リングは、特に前部において顕著であった。1 ppm の O₃曝露でみられたこれらの影響は、
35 0.12 ppm の O₃曝露では認められなかった。以上の結果は 20 か月間の O₃慢性曝露による
36 結果と同様であった。

1
2 Bhalla *et al.* (1999)は、肺における O₃ の有害作用は曝露の量、持続時間、及び曝露後の時
3 間に依存的に進展することから、主に O₃ 曝露によるラットの上皮の傷害と肺組織でのフィ
4 ブロネクチンの発現について経時的に検討した。雄の Sprague-Dawley ラット (6~8 週齢、
5 1 週間馴化) に清浄空気又は 1 ppm の O₃ を 3 時間鼻部吸入曝露させた (各群 5 匹)。曝露
6 終了の直後、4、8、12、16、20、24 時間後に BALF を採取し、総タンパク質濃度、アルカ
7 リホスファターゼ、フィブロネクチンの活性を観察した。総タンパク質の濃度は曝露 12
8 時間後にピークを示したが、24 時間後も対照群と比較し高かった。同様に、BALF 中のア
9 ルカリホスファターゼとフィブロネクチンの活性も時間依存的に上昇を示した。アルカリ
10 ホスファターゼは肺のⅡ型上皮細胞と BALF 中の多形核白血球で測定されたが、マクロフ
11 ザージでは測定されなかった。多形核白血球は O₃ 曝露後の傷害プロセスにおいて、アルカ
12 リホスファターゼ濃度に寄与し、マクロファージはフィブロネクチンの産生に重要な役割
13 を果たしていることが示唆された。

14
15 Dormans *et al.* (1999)は、肺傷害及び修復の程度と時間経過をげっ歯類 3 種間で比較する
16 ために、7 週齢の雄の Wistar RIV: Tox ラット、NIH マウス、Hartley Crl: (HA) BR モル
17 モットに清浄空気又は 400、800 µg/m³ (0.2、0.4 ppm) の O₃ を 3、7、28、56 日間連続で全
18 身吸入曝露させた。各曝露期間の終了直後、又は 28 日間連続曝露の後、3、7、28 日の回
19 復期間において、肺を採取し、小葉中心性マクロファージ数、小葉中心性隔膜厚、細気管
20 支上皮肥厚など組織病理学的変化、形態計測的変化の観察及び生化学アッセイによる抗酸
21 化酵素の発現の観察を行った。また、肺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、胸腺の重量測定を実
22 施した。げっ歯類 3 種のすべてにおいて、O₃ 濃度と関連する小葉中心性の炎症が起り、
23 3 日間の曝露後に最大となった。肺泡マクロファージ数及び小葉中心部の肺細胞密度は曝
24 露 56 日目まで進行的に増加し、もっとも感受性が高い種はモルモットであった。マウスの
25 みにおいて、濃度及び曝露時間依存性の細気管支上皮の肥厚が示された。ラット及びモル
26 モットでは、800 µg/m³ の O₃ への 56 日間曝露後にタイプⅡ細胞中で巨大な層状体が認めら
27 れた。環境濃度に近い濃度の O₃ への 3 日間、及び 7 日間の曝露により、マウスでは肺酵素
28 活性が増加し、げっ歯類 3 種のすべてにおいて組織学的及び形態計測的変化が認められた。
29 ラット及びモルモットでは、56 日間の曝露後に肺胞管の線維形成が認められた。マウスで
30 は生化学反応が最も高く、O₃ 曝露からの回復が最も遅かった。組織学的検査、形態計測及
31 び生化学検査から、ラットは 28 日間の曝露から 28 日後には完全に回復したが、モルモッ
32 トでは管隔膜は肥厚したままであり、マウスではすべての酵素活性が対照値と比較して上
33 昇したままであった。結論として、O₃ への反応が最も激しく上昇したのはマウスで、その
34 次がモルモットであり、ラットにおける反応が最小であった。

35
36 Hoffer *et al.* (1999)は、O₃ 曝露による炎症プロセスにおいて、血液中多形核白血球と肺泡

(案)

1 マクロファージでのインテグリン (CD18 で代表)、セレクチン (CD62L で代表) の接着分
2 子の発現が先導するか否かについて検討するため、雌の Sprague-Dawley ラットに清浄空気
3 又は 1 ppm の O₃ を 2 時間、又は 4 時間、全身吸入曝露させた (各群 8-12 匹)。O₃ 曝露の
4 直後及び 18 時間後に BALF と血液を採取し、BALF 中の多形核白血球、肺泡マクロファ
5 ジにおける接着分子 (CD18) の発現、血液中多形核白血球での接着分子 (CD62L、CD11b)
6 の発現を観察した。O₃ の 2 時間、4 時間曝露の 18 時間後、BALF 中の多形核白血球は、上
7 昇した。肺泡マクロファージでの接着分子 (CD18) の発現は O₃ 曝露により減少した。血
8 液中の多形核白血球での接着分子 (CD62L) の発現は O₃ の曝露による変化はみられなかつ
9 したが、CD11b の発現は減少した。O₃ を曝露していないラットの血液から分離した多形核白
10 血球を、O₃ を曝露したラットの血漿と共に培養すると、CD11b の発現が減少することが確
11 認された。この実験結果は、血液中に多形核白血球における CD11b の発現を減少させる因
12 子が存在することを示唆し、炎症変化早期のマーカーとして測定できる可能性を示した。
13

14 Hyde *et al.* (1999)は、好中球の流入は壊死の気道上皮細胞の除去に重要であるという仮説
15 を確認するため、2つの実験を行った。第1の実験では、3歳8か月~3歳10か月の雄の
16 アカゲサルにろ過空気又は 0.8 ppm の O₃ を 8 時間全身吸入曝露させた。ろ過空気又は O₃
17 曝露の 18 時間前から 24 時間毎に CD18 モノクローナル抗体又はイソタイプ対照免疫グロ
18 ブリンを投与し、ろ過空気曝露群は曝露終了の 48 時間後、O₃ 曝露群は 24、48 時間後に
19 BALF、細気管支を採取した (各群 3~4 匹)。第2の実験では、ろ過空気又は O₃ 曝露の 8
20 時間前に CD18 モノクローナル抗体又はイソタイプ対照免疫グロブリンを投与し、曝露終
21 了直後に右肺葉に補体 C5a を注入、3 時間後に BrdU を投与、曝露終了 4 時間後に BALF、
22 気管支、細気管支を採取した (ろ過空気曝露群 2 匹、O₃ 曝露群 6 匹)。BALF 中の細胞分
23 画、気道上皮での好中球とマクロファージ数及び壊死細胞数、気道上皮厚、気管支非線毛
24 細胞と線毛細胞数を調べ、呼吸細気管支の病理組織学的観察を行った。第1の実験では、
25 CD18 モノクローナル抗体投与+O₃ 曝露群では、好中球移動が抑制され、壊死した気道上
26 皮細胞の集積がみられた。第2実験では、BALF 中の好中球は、左肺葉と比較して右肺葉
27 で上昇し、したがって右肺の気道には壊死細胞が少なく、一方、左肺では壊死細胞の大き
28 な凝集が観察された。これらのデータは、O₃ により誘発された霊長類の傷害における好中
29 球の流入は CD18 に依存し、傷害された気道上皮細胞を除去することにより気道上皮の修
30 復に寄与することが示唆された。
31

32 Johnston *et al.* (1999a)は、O₃ 曝露によって生じる炎症初期の遺伝子発現が曝露濃度にかか
33 わらず同様のパターンを示すとすれば、急性曝露の検討により亜急性や慢性曝露の影響を
34 予測できるとの仮説を検証するために、O₃ に高感受性の C57BL/6J マウス (雄、8 週齢に
35 ろ過空気、又は 0.3 ppm の O₃ を 24、96 時間、1.0 ppm を 1、2、4 時間、あるいは 2.5 ppm
36 を 2、4、24 時間、吸入曝露させた。曝露終了後、肺組織を採取し、ケモカイン、サイトカ

(案)

1 イン、抗酸化剤などの mRNA 発現 (IL-12p35、IL-12p46、IL-10、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、
2 IL-6、MIF、IFN- γ 、L32、Ltn、RANTES、エオタキシン、MIP-1 β 、MIP-1 α 、MIP-2、IP-10、
3 MCP-1、TCA-3、GAPDH)、メタロチオネイン mRNA 発現について調べた。0.3 ppm の O₃
4 の 24 時間曝露によってエオタキシン、MIP-1 β 、MIP-2 遺伝子発現が増加し、96 時間曝露
5 でも増加がみられた。1.0 ppm の O₃ の 4 時間曝露ではエオタキシン、MIP-1 β 、MIP-2、IL-6、
6 メタロチオネイン遺伝子発現が増加した。2.5 ppm の O₃ の 2 時間曝露ではエオタキシン、
7 MIP-1 β 、MIP-2、IL-6、メタロチオネイン遺伝子発現が増加し、4 時間曝露でも増加がみ
8 られた。いずれの曝露濃度、曝露時間でも、IL-12、IL-10、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra には変
9 化はなかった。以上 の結果から、ケモカイン、サイトカイン、メタロチオネインの遺伝子
10 発現は、O₃ の曝露量及び曝露時間に依存し、初期の急性変化で O₃ に対する亜急性、慢性
11 の反応を予測できる可能性があることが示された。

12

13 Johnston *et al.*(1999b)は、マウスに O₃ を亜急性曝露し、肺の炎症メディエーター産生変化
14 におけるクララ細胞分泌タンパク質 (CCSP) の関与について調べた。129 マウスおよび
15 CCSP-/-マウス (雄、2-3 月齢、実験により n=3/群) に、1.0 ppm O₃ を 4 時間、または>99%
16 酸素を 68 時間曝露させ、曝露直後に屠殺して各種解析を行った。また、0.0575 μ g の LPS
17 をエアロゾルとして 10 分間吸入させ、曝露 6 時間後に屠殺して解析を行った。CCSP-/-マ
18 ウスでは、O₃ 曝露により肺組織中のエオタキシン、マクロファージ炎症性タンパク質
19 MIP-1 α および MIP-2 の mRNA の量が空気曝露群と比較して増加したが、129 マウスでは
20 変化は見られなかった。高濃度酸素曝露群では、BALF 中のエオタキシン、MIP-1 α 、MIP-1 β 、
21 MIP-2、インターフェロン- γ 誘導性 IP-10 の mRNA 量が空気曝露群と比較して増加したが、
22 129 マウスでは変化は見られなかった。LPS 吸入による影響については、129 マウスと
23 CCSP-/-マウスで差は認められなかった。これらの結果から、CCSP が O₃ 曝露による肺で
24 の炎症メディエーターの発現に関与していることが示唆された。

25

26 King *et al.* (1999)は、 $\gamma\delta$ 上皮内リンパ球の役割を調べるために、C57BL/6J-Tcrdtm1/Mom
27 ($\gamma\delta$ 欠損) マウスに *Nocardia asteroides* を接種した。また、0.0 または 1.5ppm の O₃ を 8 時
28 間吸入曝露したところ、*Nocardia asteroides* の接種に対して、対照マウスでは致死的是ではな
29 かった菌量で、 $\gamma\delta$ リンパ球欠損マウスは全匹数が 14 日以内に死亡した。肺切片において、
30 対照マウスの好中球性病変および微生物クリアランス能と比較して、 $\gamma\delta$ リンパ球欠損マウ
31 スでは重度の組織損傷と顕著な細菌増殖像を示した。同様の肺領域を標的とする O₃ 曝露は、
32 $\gamma\delta$ リンパ球欠損マウスにおいて PMNs やマクロファージの動員が抑制され、びまん性上皮
33 壊死をもたらした。これらのデータにより、著者らは、 $\gamma\delta$ 上皮内リンパ球が上皮壊死に対
34 する炎症反応をコントロールすることにより、病原性および非病原性の傷害から保護して
35 いることが示唆されたとした。

36

1
2 Koike *et al.* (1999)は、O₃を曝露したラットの BALF 中の物質による阻害作用のメカニズ
3 ムを検索するため、特定病原体未感染の雄の Wistar ラット(8~12 週齢)に空気又は 1.0 ppm
4 の O₃を 24 時間/日で連続 3 日間全身吸入曝露させた後に BALF を採取し、空気曝露ラッ
5 トから採取した肺胞マクロファージ及びリンパ節細胞と共に培養し、リンパ節細胞増殖能、
6 NO 及びサイトカインの産生を調べた。O₃曝露したラットから採取した BALF はコンカナ
7 バリン A 刺激リンパ節細胞からの IFN- γ 産生、マクロファージからの NO 産生、IL-2 誘導
8 によるリンパ節細胞の増殖を抑制した。さらに、BALF を分子量 10 kDa 以下の成分と 10 kDa
9 超の成分に分けてリンパ節細胞増殖能、肺胞マクロファージによる NO 産生への影響を調
10 べたところ、肺胞マクロファージの関与する免疫抑制には、O₃曝露ラットから採取した
11 BALF 中の 10 kDa より大きなタンパク質がかかわる可能性が示された。

12
13 Matsumoto *et al.*(1999)は、モルモットに O₃を急性吸入曝露し、気道反応性の変化におけ
14 る好中球エラスターゼの関与について調べた。モルモット (Hartley、雄、n=5/群)に生理
15 食塩水または ONO-5046(好中球エラスターゼ阻害剤、200mg/kg)を腹腔内投与した後、3
16 ppm O₃を 2 時間吸入曝露し、O₃曝露の 0、3、5 時間後にアセチルコリン(Ach)への気道反
17 応性の測定、BALF 成分の解析を実施した。O₃曝露は、ACh の吸入および静脈内投与に対
18 する気道反応性を増強させるとともに、BALF における NE-PI (NE- α -1-protease inhibitor
19 complex) 濃度、好中球数、気道上皮細胞数、マクロファージ数を増加させた。ONO-5046
20 の前処置は、O₃曝露による BALF 中の好中球数および上皮細胞数の増加、および吸入 Ach
21 に対する気道反応性の向上を抑制したが、Ach の静脈内投与に対する気道反応性には影響
22 は示さなかった。これらの結果は、好中球エラスターゼが上皮傷害を誘発することで、
23 O₃誘導性の気道反応に寄与していることを示唆している。

24
25 Noviski *et al.* (1999)は、O₃曝露が肥満細胞の脱顆粒を引き起こすか否か、また、肥満細
26 胞が O₃による生理的変化の誘発に関与するかどうかを検討するため、雄、12 週齢の
27 WBB6F1 マウスの野生型及び肥満細胞欠損マウス (WBB6F1 *kit^w/kit^{w-v}*)にろ過空気又は 1、
28 3 ppm の O₃を 4 時間吸入曝露させた。曝露終了の 4 時間後、1、2、3 日後、気道反応性
29 に関し、メサコリン静脈注射下の肺伝導度 (GL)、肺の動的コンプライアンス (C_{dyn})を測
30 定した。測定後、気管支、耳皮膚、背中皮膚、前胃、脾膜の組織を採取し、肥満細胞数、
31 多形核白血球、肥満細胞の脱顆粒について観察した。野生型マウスの気管支では O₃曝露に
32 による肥満細胞の脱顆粒の増加はなかったが、O₃の 3 ppm 曝露の 1 日後に細胞数が減少した
33 ことは脱顆粒により肥満細胞として認識されなくなったためであると考えられた。背中と
34 耳の皮膚の肥満細胞では脱顆粒の増加がみられた。肺組織への多形核白血球浸潤は O₃曝露
35 により増加したが、肥満細胞欠損マウスでは変化は少なかった。O₃曝露により両マウスと
36 も気道反応性は上昇した。以上の結果は、肥満細胞は O₃曝露により活性化して、多形核

1 白血球浸潤には関与するが、気道反応性には関与しないことを示唆するものである。

2

3 Reinhart *et al.* (1999)は、Th2 細胞が放出する抗炎症性サイトカインである IL-10 の、O₃
4 曝露による肺傷害に対する影響を明らかにするため、雄の Sprague-Dawley ラットに、1 µg
5 のラット IL-10 を気管内投与した 1 時間後、0.8 ppm の O₃ を 3 時間、鼻部吸入曝露させた。
6 曝露群は、I. 溶媒のみ気管内投与し、ろ過空気を曝露させた群、II. 溶媒のみ気管内投
7 与し、O₃ を曝露させた群、III. ラット IL-10 を気管内投与し、ろ過空気を曝露させた群、
8 IV. ラット IL-10 を気管内投与し、O₃ を曝露させた群、とした。曝露終了の 10~12 時間
9 後に BALF、肺組織を採取し、BALF 中のアルブミン量、タンパク質量、フィブロネクチ
10 ン量、多形核白血球数、肺組織中のフィブロネクチン RNA 発現について観察した。O₃ 曝
11 露は、BALF 中のアルブミン量、タンパク量、フィブロネクチン量を顕著に増加させ、IL-10
12 の気管内投与はこれらのマーカーの増加を抑制した。以上の結果から、IL-10 の気管内投
13 与が O₃ 曝露による肺傷害を低減させることが示された。

14

15 Vesely *et al.* (1999a) は、好中球が O₃ により傷害された上皮細胞の修復に関与するという
16 仮説を証明するため、抗ラット好中球ウサギ血清を腹腔内投与して好中球を減少させた雄
17 の Wistar ラット (43 日齢) にろ過空気又は 1.0 ppm の O₃ を 8 時間吸入曝露させ、曝露中
18 及び曝露 8 時間後の呼吸機能変化と組織傷害を検討した。好中球非減少群として、正常ウ
19 サギ血清を投与し、ろ過空気又は 1.0 ppm の O₃ を 8 時間吸入曝露させた。呼吸機能につい
20 ては分時換気量、一回換気量、呼吸回数を測定した。また、肺組織を採取し、組織像の観
21 察と BrdU を用いた細胞増殖を測定した。好中球減少群も非減少群も O₃ 曝露開始後 8 時間
22 をピークに一回換気量が減少し、呼吸回数が増加したが、好中球減少群で呼吸回数の回復
23 が顕著に遅かった。また、好中球減少群では鼻腔、気管支、細気管支で O₃ 曝露による上皮
24 細胞の壊死が多かった。この時、上皮細胞の増殖に伴う BrdU の取り込みは好中球減少群
25 で顕著に少なかった。以上の結果から、好中球が O₃ 曝露による上皮傷害の修復に関与し
26 ていることが示された。

27

28 Vesely *et al.* (1999b)は、O₃ の吸入中および吸入後の肺における感覚 C 繊維の役割を評価
29 した。出生直後にカプサイシンの全身投与により C 繊維を枯渇させた雄の Wistar ラットに、
30 6-9 週齢で O₃ を 1ppm、8 時間吸入曝露させ、呼吸パターンの変化と上皮傷害炎症修復を比
31 較した。カプサイシン投与ラットへの O₃ 曝露によって、気管におけるサブスタンス P(SP)
32 が減少したが、O₃ 曝露により誘発される急速な浅い呼吸はみられなかった。また、カプサ
33 イシンで処理されたラットでは、対照ラットと比較して鼻腔におけるより重度の壊死と気
34 道全体にわたる炎症を示したが、炎症と壊死の関連性については、鼻腔、気管どちらにお
35 いても、カプサイシン処理の有無で差はなかった。終末細気管支上皮細胞への BrdU の取
36 り込みは、カプサイシン処置の影響をあまり受けなかったが、各ラットに存在する上皮壊

1 死の程度に対する比で評価すると、カプサイシン処理したラットの末端細気管支では BrdU
2 の取り込みが少なかった。これらの結果は、O₃ によって誘発される神経ペプチドの放出
3 は気道炎症に測定可能なほどの寄与はしていないが、基底細胞および修復気道上皮細胞の
4 増殖調節に役割を果たしている可能性を示唆している。

5
6 Bhalla and Gupta (2000)は、6~8 週齢の雄の Sprague-Dawley ラットに清浄空気又は 1 ppm
7 の O₃ を 3 時間鼻部吸入曝露させた。曝露終了後、BALF を採取し、浸透性の指標としてア
8 ルブミン、炎症病態評価のため多形核白血球数を観察し、炎症や多形核白血球機能におけ
9 る役割を検討するため MIP-2 (マクロファージ炎症性タンパク質: macrophage inflammatory
10 protein-2)、ICAM-1 (細胞間接着分子-1)、β2 インテグリン (Integrin, CD-18) を観察した。
11 O₃ に対する気道の反応は徐々に進展することから、曝露終了から 4 時間毎、24 時間後まで
12 の影響を時間連続的に解析した。多形核白血球、MIP-2、及び ICAM-1 は経時的に上昇を
13 示し、アルブミンも同様の増加を示したが、β2 インテグリン及び LTB-4 には明らかな変化
14 はなかった。この結果は、肺における上皮の浸透性と炎症活性及び肺における多形核白血
15 球の集積の原因となる刺激の変化との時間的な関連性を確立した。MIP-2、及び ICAM-1
16 レベルの上昇は、それらの傷害及び炎症における作用と一貫していた。BALF 細胞中の
17 MIP-2_mRNA は早期、すなわち O₃ 曝露直後に発現し、4 時間後にピークとなるという結果
18 は、曝露終了の 4 時間後、12 時間後に MIP-2 が多形核白血球集積において遊走作用を持つ
19 ことを裏付けている。MIP-2 及び ICAM-1 レベルの急激な低下は、炎症細胞の集積が終結
20 し、回復が開始することを示すシグナルであると考えられる。

21
22 Inoue *et al.* (2000)は、O₃ 曝露による呼吸器への影響を NOS 阻害剤が抑制するかどうかを
23 評価するため、Hartley モルモットに NOS (一酸化窒素合成酵素: endothelial nitric oxide
24 synthase) 阻害剤、又は溶媒による前処理を行い、1 時間後、乾燥空気又は 3.0 ± 0.1 ppm の
25 O₃ を 2 時間吸入曝露させた。O₃ 曝露終了直後又は 5 時間後に気道反応性の測定及び BALF、
26 肺組織の採取を行った。気道反応性、BALF 中の好中球数、硝酸+亜硝酸量、肺組織中の IL-8
27 mRNA 発現量のいずれの評価項目においても、曝露終了 5 時間後において O₃ の影響が強
28 く出ていることを示唆する結果となった。また、曝露終了 5 時間後の O₃ の影響を NOS 阻
29 害剤が抑制している結果から、O₃ 誘発性の気道の炎症、過敏性は NOS 阻害剤によって持
30 続的な抑制ができることが示唆された。

31
32 Ishii *et al.* (2000a)は、O₃ 曝露による肺炎症に対するエブセレンの抑制作用について検討
33 するため、雄の Sprague-Dawley ラットに 10mg/kg のエブセレン又は溶媒を腹腔内投与し、
34 1 時間後に清浄空気又は 2 ppm の O₃ を 4 時間、全身吸入曝露させ、O₃ 曝露終了の 7 時間後
35 に再度エブセレン又は溶媒を投与した。O₃ 曝露終了の 18 時間後、BALF 及び肺組織を採
36 取し、BALF 中のアルブミン濃度、好中球数、肺組織における iNOS、ニトロチロシン、Cu/Zn

1 SOD 及び Mn SOD の mRNA の発現、BALF 細胞中での iNOS mRNA 発現を観察した。エブ
2 セレン投与群では BALF 中のアルブミンの濃度と好中球数の減少が示され、肺の炎症が低
3 減された。エブセレンによる、マクロファージでの iNOS の発現の変化は認められなかつ
4 たが、ニトロチロシンの肺での発現は明らかに抑制され、エブセレンが O₃ の誘発した肺炎
5 症期にペルオキシ亜硝酸を除去する可能性が示唆された。また、エブセレンの投与により
6 Cu/Zn SOD と Mn SOD の mRNA の肺組織での発現が増加した。これらの酵素も低濃度の
7 スーパーオキシドによるペルオキシ亜硝酸の形成を減少させることに寄与するかもしれな
8 い。エブセレンはオキシダントと関連する炎症プロセスの調節により、O₃ による急性肺傷
9 害を防御すると考えられる。

10
11 Johnston *et al.* (2000b)は、O₃、あるいは NO₂ 曝露によるマウスの肺における抗酸化性因子、
12 及び炎症に関わるサイトカイン、ケモカイン遺伝子発現について比較検討するため、雄の
13 C57BL/6J マウス (8 週齢) に 15、30 ppm の NO₂、1.0、2.5 ppm の O₃ のいずれかを 4 又は
14 24 時間、全身吸入曝露し、対照群には、ろ過空気を曝露した。曝露終了直後に肺組織を採
15 取し、RPA (Ribonuclease protection assay) により、抗酸化性因子、及びケモカインの mRNA
16 発現を調べた。O₃、NO₂ の 4 時間及び 24 時間の曝露の後、メタロチオネイン、HO-1、iNOS
17 の上昇が認められた。O₃、NO₂ の曝露により、MIP-1 α 、MIP-2、IL-6 の mRNA の増加がみ
18 られ、これらの増加と曝露時間や曝露濃度との関連が認められた。これらの結果から、O₃
19 及び NO₂ は、同様のメカニズムを介して毒性を発揮すると考えられる。

20
21 Kleeberger *et al.* (2000)は、O₃ 曝露は、ヒトや動物に肺の血管透過性亢進と炎症を誘導す
22 ることから、O₃ 曝露による透過性亢進に関与する遺伝的要因を明らかにするために、O₃
23 に対して高感受性の C57BL/6J マウス、低感受性の C3H/HeJ マウス、及びその交配マウス
24 を用いて、量的形質遺伝子座の解析を行った。雄で 6~8 週齢の C57BL/6J マウス、C3H/HeJ
25 マウス、C3H/HeOuJ マウスに清浄空気又は 0.3 ppm の O₃ を 24、48、72 時間、BXH 組替
26 え近交系マウスには 72 時間吸入曝露させ、曝露終了後 1 時間以内に屠殺し、BALF 中のタ
27 ンパク質、多形核白血球割合により肺透過性及び炎症について評価した。これらの交配マ
28 ウスでは、第 4 染色体上に量的形質座位が同定され、TLR-4 がその原因遺伝子と考えられ
29 た。TLR の発現型の異なる C3H/HeJ と C3H/HeOuJ マウスへの 72 時間曝露の結果、
30 C3H/HeOuJ マウスでは BALF 中のタンパク質濃度がより高く、さらに、C3H/HeJ マウスの
31 みで曝露後の TLR-4 遺伝子発現の減少が認められた。以上の結果から、第 4 染色体上の
32 量的形質座位、特に TLR-4 遺伝子が O₃ 曝露による透過性亢進に関与することが示された。

33
34 Nogami *et al.* (2000)は、O₃ 急性曝露により生じる気道の粘液分泌過多における好中球エ
35 ラスターゼの役割を調べた。Hartley モルモット (n=5/群) に好中球エラスターゼ阻害剤
36 ONO-5046 (200mg/kg、腹腔内投与) または生理食塩水を腹腔内投与した後、3 ppm O₃ を 2

1 時間曝露させ、形態学的手法を用いて気道杯細胞の粘液分泌を測定した。O₃曝露により杯
2 細胞の粘液分泌過多が誘発され、曝露後最大5時間持続した。好中球エラスターゼ阻害剤
3 であるONO-5046の前処置は、O₃曝露直後と5時間後の両方で杯細胞粘液分泌過多を阻害
4 したが、曝露直後では空気曝露群と同程度まで抑制された一方、曝露5時間後での阻害効
5 果は完全ではなかった。O₃曝露は曝露直後および5時間後の気管支肺胞洗浄液における好
6 中球数および上皮細胞数を増加させたが、ONO-5046投与はO₃曝露による好中球と上皮細
7 胞の増加を阻害した。これらの結果は、好中球エラスターゼが、O₃誘導の気管杯細胞粘
8 液分泌過多および好中球の流入において重要な役割を果たす可能性があることを示してい
9 る。

11 Bassett *et al.* (2001)は、O₃曝露による肺上皮傷害の急性期に好中球が役割を果たしている
12 か否かについて研究が続いていることから、雄のSprague-Dawleyラットに清浄空気、1、2
13 ppmのO₃を3時間全身吸入曝露させた。免疫抑制剤であるシクロホスファミド
14 (cyclophosphamide)或いは抗ラット好中球ウサギ抗血清投与によって循環好中球の有無を
15 操作した。シクロホスファミド、抗血清処理の効果を確認するため、血液、肺組織におけ
16 る炎症細胞の含有量を観察した。曝露終了の20時間後にBALF(気管支肺胞洗浄液:
17 bronchoalveolar lavage fluid)を採取し、BALF中の好中球等の細胞分画算定、アルブミンに
18 ついて観察した。また、清浄空気、0.8~1 ppmのO₃を24、48時間全身吸入曝露させ、曝
19 露終了直後について同様の観察を行った。シクロホスファミド処理により、血液中の好中
20 球は検出不能なレベルとなったが、肺組織での上皮、間質性の好中球は空気、O₃曝露の開
21 始時点において減少はみられなかった。シクロホスファミドのみで処理し、空気に曝露さ
22 せたラットでは透過性の傷害はみられなかったが、O₃の3時間曝露、24時間曝露のいずれ
23 においてもO₃曝露によるBALF中の好中球とアルブミンの上昇は改善された。一方、抗
24 血清で処理したラットでは血液中、肺組織中の好中球の回収量は空気、O₃曝露開始時には
25 90%以上減少した。抗血清処理によりO₃曝露が誘発した洗浄可能な肺組織空間での好中
26 球の集積は解消されたが、BALF中のアルブミンに変化が無いことから示されるようにO₃
27 に関連する透過性の肺傷害には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、本実験条件下で
28 は、好中球が肺組織に残存した場合、循環血液中の好中球の減少はO₃による肺傷害の減少
29 と関連することを示した。

31 Cho *et al.* (2001)は、O₃に感受性を有するC57BL/6Jマウスにおいて、どのTNFを介した
32 メカニズムがO₃の誘発した肺傷害の病態を制御するかを検討するため、野生型、p55、p75
33 TNFR(TNF受容体:TNF receptor)遺伝子又はその両方をノックアウトした雄のC57BL/6J
34 マウス(6~8週齢)に清浄空気、0.3 ppmのO₃を3、24、48時間、又は2 ppmのO₃を3
35 時間(急性曝露)、全身吸入曝露させた。急性曝露マウスについて、24時間回復期間をお
36 いてAPTI(airway pressure-time index)の測定により気道反応性を評価した結果、いずれの

(案)

1 ノックアウトマウスにおいても O₃ 急性曝露による気道反応性は野生型マウスに比較し低
2 減した。また、0.3 ppm 48 時間曝露 (亜急性曝露) のマウス及び 6 又は 24 時間の回復期間
3 をおいた急性曝露マウスの BALF の観察、亜急性曝露マウスの肺組織の病理組織学的観察
4 を行った結果、いずれのノックアウトマウスにおいても、O₃ 亜急性曝露による炎症と上皮
5 の傷害は、野生型マウスよりも低減したが、肺の高透過性については影響はみられなかつ
6 た。O₃ 急性曝露による肺炎症及び透過性は、ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較
7 して高かった。さらに、0.3 ppm、2 ppm の O₃ を曝露したマウスの肺組織における TNFR
8 mRNA の発現を分析した結果、対照群 (清浄空気曝露) と比較し、O₃ 曝露の野生型マウス
9 は肺における p55、p75 TNFR の mRNA 発現を増加させたが、それぞれのノックアウトマ
10 ウスは O₃ 曝露により mRNA 発現を低減させた。以上の結果より、O₃ の亜急性曝露によ
11 り誘発される肺の上皮傷害及び炎症病態、並びに O₃ の急性曝露により誘発される気道反応
12 性における TNFR のシグナルの重要な作用が示唆された。

13
14 Cohen *et al.* (2001)は、肺における細胞性免疫への O₃ 曝露の影響におけるサイトカイン産
15 生の役割について検索した。雄の FISHER344 ラットに清浄空気又は 0.1、0.3 ppm の O₃ を
16 4 時間/日、5 日/週で 1、3 週間、全身吸入曝露させた。最終曝露の 24 時間後、*Listeria*
17 *monocytogenes* を気管内投与し、1、48、72、96 時間後、体調及び菌のクリアランスを観察
18 した。また、同時に BALF 中のサイトカイン産生について測定した。一部のラットは曝露
19 終了後、*Listeria* 菌の投与を行わず、1、48、72、96 時間後の活性酸素代謝物の産生につい
20 て調べた。O₃ の 1 週間曝露により、菌感染後の体調不良指標 (息遣い、体のふるえ、目脂、
21 下痢、鼻水) には濃度依存的な悪化がみられ、肺における残存細菌量についても、濃度依
22 存的なクリアランス能低下がみられた。しかしながら、O₃ の 3 週間曝露ではこれらは観察
23 されなかった。O₃ の 1 週間曝露では 0.1 ppm で、3 週間曝露では 0.3 ppm で BALF 中の IL-1 α 、
24 TNF- α 、IFN- γ (interferon- γ) 産生量の上昇がみられた。IFN- γ 存在下での H₂O₂ 産生は、O₃
25 曝露による抑制が認められた。

26
27 Graham *et al.*(2001)は、気道の神経密度変化を表現型とする遺伝子改変マウスを用いて、
28 O₃ 急性曝露による肺炎症における感覚神経の役割を調べた。CCSP-NGF Tg、NGFR KO、
29 C57BL/6 マウス (n=4-17/群) に NK1、NK2、NK3 受容体それぞれのアンタゴニストまたは
30 それらの混合液を腹腔内投与し、30 分後に 1.5 ppm O₃ を 3 時間吸入曝露した。O₃ 曝露の
31 18 時間後、C57BL/6 マウスと比較して、CCSP-NGF Tg マウスでは BALF 中の好中球数が 2
32 倍に増加したが、NGFR KO マウスでは約 50%減少していた。また、C57BL/6 および
33 CCSP-NGF マウスでは、O₃ 曝露前にニューロキニン受容体アンタゴニストで処理すること
34 で、いずれも好中球炎症のレベルが低下した。O₃ 曝露から 4 時間後の CCSP-NGF マウスで
35 は、O₃ に曝露された C57BL/6 マウスよりも肺胞洗浄液中ケモカインが多かった。以上の
36 結果は、肺や気道において感覚神経がマウスの O₃ 誘導性の炎症に関与していることを示唆

1 している。

2

3 Johnston *et al.* (2001)は、NO₂、純粋 O₂ (>99%の O₂)、O₃ の急性曝露後の肺における回復
4 状況を経時的に調べるため、雄の C57BL/6J マウス (8 週齢) に 15 ppm の NO₂ を 24 時間、
5 >99 %の O₂ を 72 時間、1.0 ppm の O₃ を 24 時間、全身吸入曝露し、それぞれの対照群には
6 ろ過空気を曝露した。いずれのマウスについても曝露終了直後又は 4、24 時間後に BALF、
7 肺組織を採取し、BALF については炎症性細胞の数、種類、生化学的指標 (β-グルクロニ
8 ダーゼ、LDH、総タンパク質量)、肺組織についてはサイトカイン及びメタロチオネイン
9 (metallothionein) の mRNA 発現を観察した。BALF 中の好中球は各物質曝露により増加
10 し、曝露後も高い値を継続した。肺胞マクロファージは、曝露によって減少し、曝露後も
11 低い状態を継続した。遺伝子レベルでは、メタロチオネイン、MIP-2、MCP-1 は曝露終了
12 の 4 時間後には発現が上昇していたが、24 時間後には、MCP-1 を除いて回復がみられた。
13 これらの遺伝子は、本研究で曝露したオキシダントに対しては、ほぼ同様な反応パターン
14 を示した。炎症性細胞の集積との関連では、メタロチオネイン、MIP-2 は好中球のピーク
15 より早い時期に上昇が認められた。

16

17 Kleeberger *et al.* (2001a)は、O₃ の慢性曝露による炎症と上皮細胞傷害に肥満細胞が関与
18 するかどうか検討するため、22~24 週齢の雄の野生型マウス {WBB6F1 (+/+)}、肥満細
19 胞欠損マウス (WBB6F1 Kit^W/Kit^{W-v})、肥満細胞欠損マウスに骨髓細胞を移植し肥満細胞を
20 回復させたマウス (WBB6F1 Kit^W/Kit^{W-v} -BMT) に清浄空気又は 0.26 ppm の O₃ を 8 時間/
21 日、5 日/週で 1、3、14、30、90 日間吸入曝露させた。90 日間曝露させたマウスについ
22 ては曝露終了の直後、及び 35 日後、その他のマウスは曝露終了直後に BALF を採取し、
23 タンパク質量、白血球、マクロファージ、上皮細胞数を調べた。また、肺、鼻の組織を採
24 取し、形態を観察すると共に、肥満細胞数、曝露前に投与した BrdU 取り込みによる細胞
25 増殖 (1 日曝露は除く) について調べた。WBB6F1 (+/+) マウスや WBB6F1 Kit^W/Kit^{W-v}-
26 BMT マウスでは、WBB6F1 Kit^W/Kit^{W-v} マウスと比較して O₃ 曝露による BALF 中のマ
27 クロファージ数、白血球数、上皮細胞数がより増加していたが、タンパク質量の変化には
28 差はなく、いずれも曝露の 35 日後には清浄空気曝露群と同程度に低下した。また、WBB6F1
29 (+/+) マウスや WBB6F1 Kit^W/Kit^{W-v} -BMT マウスでは、WBB6F1 Kit^W/Kit^{W-v} マウス
30 と比較して O₃ 曝露による BrdU 標識細胞の増加がより顕著であり、曝露の 35 日後でも
31 増加傾向にあった。肺小葉においては、炎症や上皮細胞の傷害は認められなかった。鼻腔
32 においては、肺より弱いが増殖反応が認められた。気管・主気管支中の肥満細胞は、WBB6F1
33 Kit^W/Kit^{W-v}-BMT マウスと WBB6F1 (+/+) マウスとで同程度に存在した。以上 の結果
34 から、慢性の O₃ 曝露による細胞増殖に肥満細胞が関与することが示された。

35

36 Kleeberger *et al.* (2001b)は、O₃ 曝露による肺透過性亢進メカニズムの解明のため、1) iNOS

1 は O₃ が誘発する肺透過性亢進を調節する、2) O₃ 曝露中には TLR4 によって iNOS 遺伝子
2 (NOS2) の mRNA レベルが調節される、という仮説を検討した。1) の仮説検証のため、
3 O₃ への感受性の高い C57BL/6J マウス (雄、6~8 週齢) にろ過空気又は 0.3 ppm の O₃ を
4 全身吸入曝露させた。曝露開始直前及び開始 24 時間後に、NOS の特異的阻害剤である
5 L-NMMA (N^G-monomethyl-L- arginine) 又は溶媒のみを投与し、72 時間曝露したマウスの
6 BALF 中の総タンパク質量、マクロファージ数、多形核白血球数、上皮細胞数を測定した
7 結果、O₃ によって誘導される BALF 中の平均タンパク質量 (肺透過性のマーカー) が溶媒
8 対照マウスと比較して低下した。C57BL/6J マウスの野生型 {C57BL/6J - NOS2 (+/+)} 及
9 び NOS 欠損型 {C57BL/6J - NOS2 (-/-)} それぞれにろ過空気又は 0.3 ppm の O₃ を 48、
10 72 時間全身吸入曝露させたところ、O₃ 72 時間曝露後の BALF 中タンパク質は、NOS 欠損
11 型マウスでは野生型マウスと比較して 50%少なかった。しかしながら、多形核白血球数は
12 両者に差はなかった。2) の仮説検証のため、O₃ 曝露による透過性亢進が低い C3H/HeJ マ
13 ウス及び Tlr4 遺伝子にミスセンス変異が 1ヶ所あるだけが感受性の高い C3H/HeOuJ マ
14 ウスにろ過空気又は 0.3 ppm の O₃ を 1.5、3、6、24、48、72 時間全身吸入曝露させ、肺組
15 織中の NOS2 及び TLR4 の mRNA レベルを測定した。C3H/HeJ マウスにおいて、O₃ 曝露に
16 より NOS2 及び TLR4 の mRNA レベルは C3H/HeOuJ マウスと比較して減少したが、両系
17 統のマウスにおける O₃ 曝露後の mRNA レベルは相関していた。以上 の結果から、O₃ が
18 誘発する肺透過性亢進では iNOS が重要な役割を有すること、TLR4 を介して NOS2 の
19 mRNA レベルが調節されることが示された。

20

21 Miller *et al.* (2001)は、これらの研究を拡張し、上皮細胞の増殖及び修復に関連する接着
22 分子であるインテグリン β6 の上皮における発現に及ぼす、O₃ 曝露及び好中球浸潤の影響
23 を調べた。雄のアカゲサル (3 歳 8 か月~3 歳 10 か月) に CD18 抗体又は対照免疫グロブ
24 リンを投与し、8 時間後に、ろ過空気又は 0.8 ppm の O₃ を 8 時間、全身吸入曝露させた。
25 曝露終了後、C5a を気管内投与し、4 時間ろ過空気に曝露させた後、気管、右副肺の切片
26 を採取し、免疫組織化学的染色によりインテグリン β6 の発現について調べた。対照免疫
27 グロブリン処理後 O₃ 曝露したサルの気管上皮ではインテグリン β6 が発現していたが、
28 CD18 抗体処理後 O₃ 曝露したサルの気管上皮ではインテグリン β6 の発現量は非常に低下
29 していた。また、右肺中葉と後葉への C5a の投与と好中球浸潤と関連して、ろ過空気曝露
30 群及び O₃ 曝露群の細気管支上皮でインテグリン β6 発現が認められた。以上 の結果から、
31 インテグリン β6 の肺上皮細胞での発現は好中球動員の部位と関連することが示された。

32

33 van Bree *et al.* (2001)は、O₃ 曝露による曝露時間依存性を調べるため、特定病原体未感染
34 の雄の Wistar RIV: Tox ラットにろ過空気又は 0.4 ppm の O₃ を 23.5~24 時間/日で 1、3、7、
35 28、56 日間、全身吸入曝露させた。3、7、28、56 日曝露の後、それぞれ実験第 7、14、28
36 日目、実験第 14、28、56 日目、実験第 35、56 日目、実験第 136 日目に、炎症反応、肺構

1 造変化、コラーゲン変化に関し、生化学的、形態学的手法によって観察し、回復状況を検
2 討した。BALF 中の多形核白血球及び血漿タンパク質は実験第 1 日目に最大になり、曝露
3 中 6 日以内に回復した。肺胞マクロファージは曝露 56 日まで増加を続け、曝露終了後はゆ
4 っくり回復した。O₃ 曝露中、肺小葉部の炎症が認められた。曝露 7 日目には肺小葉部中核
5 部分の肥厚がみられた。細気管支の分岐部中隔の肥厚が 7、28、56 日間の曝露で進行的に
6 認められ、28 日間の曝露で認められたコラーゲンの増加は 56 日間の曝露でより増強した。
7 O₃ 曝露中は、細気管支炎が進行し、曝露終了後の回復期にも継続してみられた。以上 の
8 結果より、O₃ 曝露初期にみられた BALF 中のタンパク質、好中球の浸潤は曝露を継続する
9 と、みられなくなるが、肺胞マクロファージの増加や細気管支の肥厚、呼吸細気管支の形
10 成、コラーゲン形成等の構造変化は、曝露中継続しており、曝露終了後の回復期に一部の
11 慢性的反応は収まるが、その他の影響は消失しないことが示された。

12
13 Bhalla *et al.* (2002)は、O₃ により誘発された肺傷害における TNF- α (腫瘍壊死因子- α : tumor
14 necrosis factor-alpha) の作用について検討するため、雄の Sprague-Dawley ラットにウサギ
15 抗ラット TNF- α 抗体又は免疫前ウサギの抗体を腹腔内投与した 1 時間後に清浄空気又は 1
16 ppm の O₃ を 3 時間、鼻部吸入曝露させた。曝露終了の 12 時間後に BALF、肺組織を採取
17 し、BALF 中の肺上皮細胞の浸透性マーカーであるアルブミンと肺傷害と修復のマーカー
18 であるフィブロネクチンの解析、炎症性反応評価のための細胞数の算定、肺組織中の炎症
19 に関連するサイトカインの発現の検討を行った。O₃ 曝露群は対照群と比較し、BALF 中の
20 アルブミンとフィブロネクチンは増加し、また、BALF 中の多形核白血球も増加した。抗
21 TNF- α 抗体の投与により、BALF 中のアルブミンと多形核白血球は減少したが、フィブロ
22 ネクチンの変化は認められなかった。肺組織における遺伝子配列解析では、IL-1 α
23 (Interleukin-1 α)、IL-6、IL-10 が O₃ 曝露により活性化されたが、抗 TNF- α 抗体の投与群で
24 はその活性は抑制された。これらの結果から、TNF- α は O₃ による肺炎症の病態において重
25 要な役割を果たしていることが示唆された。O₃ 曝露による炎症と上皮細胞の傷害における
26 TNF- α の役割の重要性は、他のサイトカインを調節することによる TNF- α の寄与を反映し
27 ている。

28
29 Cohen *et al.* (2002)は、低濃度の O₃ 曝露による肺における感染防御機構への影響に関し、
30 時間依存的な適応機構、濃度依存的な適応機構について肺胞マクロファージとリンパ球機
31 能に着目して検討した。特定病原体未感染の雄の FISHER344 ラットに清浄空気又は 0.1、
32 0.3 ppm の O₃ を 4 時間/日、5 日/週で 1、3 週間全身吸入曝露した。最終曝露の 24 時間後、
33 *Listeria monocytogenes* を気管内投与し、48、96 時間後に、クリアランス能を観察した。0.1
34 ppm の O₃ は 1 週間曝露により自然免疫の *Listeria* 感染抵抗性に影響し、0.3 ppm では 1 週
35 間曝露により自然免疫、獲得免疫での *Listeria* 感染抵抗性に影響し、3 週間の曝露でも影響
36 が認められた。自然免疫と獲得免疫では、O₃ 曝露の期間、濃度でそれぞれ異なる反応パタ

1 ーンを示した。別ラットについて、最終曝露の24時間後、リンパ球、肺胞マクロファージ
2 を採取し、リンパ球増殖、リンパ球表面マーカーを観察したところ、肺から単離したリン
3 パ球の増殖反応では、0.1 ppm の1週間曝露で ConA (concanavalin A) 刺激に対する増殖
4 反応の増加が顕著であった。細胞表面マーカー検索では、IL-2 受容体である CD25 陽性細
5 胞が 0.1 ppm の3週間曝露で上昇した。Zymosan 刺激実験で、O₃ の1週間曝露によって肺
6 胞マクロファージからの O₂⁻ 産生は増加し、H₂O₂ 産生は抑制された。一方、O₃ の3週間曝
7 露でラットの肺胞マクロファージにそれらの影響がみられなかった。

8
9 Fakhrazadeh *et al.* (2002)は、O₃ により誘導された肺炎と肺組織の傷害における NO の作
10 用について検討するため、8~16 週齢の雌の野生型の C57BL6X129 マウス及び iNOS (誘導
11 型一酸化窒素合成酵素: inducible nitric oxide synthase) 欠損マウスに清浄空気又は 0.8 ppm
12 の O₃ を3時間全身吸入曝露させた。曝露終了直後、24、48、72 時間後に BALF、肺胞マ
13 クロファージを採取し、BALF 中のタンパク質と細胞数、24~72 時間培養した肺胞マク
14 ロファージの NO、ペルオキシ亜硝酸、スーパーオキシドアニオン、プロスタグランジン E2
15 の産生について観察した。野生型マウスにおいて、BALF 中のタンパク質、細胞は O₃ 曝露
16 後 24~48 時間後をピークに時間依存的に上昇した。肺胞マクロファージにおける NO、ペ
17 ルオキシ亜硝酸の産生量については、IFN- γ 、LPS と共に培養すると、O₃ 曝露後 24~48 時
18 間後をピークに時間依存的に上昇し、72 時間後までには対照レベルに向けて減少を始めた。
19 肺胞マクロファージにおけるスーパーオキシドアニオンとプロスタグランジン E2 の産生
20 も上昇した。一方、iNOS 欠損マウスから採取された肺胞マクロファージは O₃ 曝露によ
21 っても反応性中間体であるペルオキシ亜硝酸の産生は認められなかった。BALF 中のタンパ
22 ク質と細胞の測定結果によると iNOS 欠損マウスは、O₃ による炎症と組織傷害から防御さ
23 れた。これらの結果により、NO は iNOS を介して産生され、その反応性酸化物であるペル
24 オキシ亜硝酸は O₃ により誘発される炎症性メディエーターの放出と組織傷害に重要な役
25 割を果たしている可能性が示唆された。

26
27 Kenyon *et al.* (2002)は、O₃ 曝露による炎症の増悪への iNOS の寄与について検証するため、
28 野生型 C57BL/6J マウス及び iNOS 欠損マウスに、ろ過空気又は 1.0 ppm の O₃ を夜間 8 時
29 間で3日間、吸入曝露させ、比較した。iNOS は O₃ 曝露によってマクロファージなどに誘
30 導され、好中球の遊走因子である MIP-2 の産生増加にも関与していることから、O₃ 曝露に
31 よる炎症の増悪に寄与していると考えられている。BALF 中の総タンパク質、MIP-2 量、
32 マクロファージ数、好中球数、MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9) 活性について観察した
33 結果、O₃ 曝露によって野生型マウスと iNOS 欠損マウスで総タンパク質量、MIP-2、MMP-9、
34 好中球数が増加し、iNOS 欠損マウスでは野生型マウスよりも更に増加した。また、肺組
35 織中のニトロチロシン (3-nitrotyrosine) 量について観察した結果、野生型マウスでも iNOS
36 欠損マウスでも O₃ 曝露で増加傾向にあったが、統計的有意な増加ではなかった。iNOS 欠

(案)

1 損マウスでは iNOS が欠乏しているにも関わらず、BALF 中の亜硝酸塩や硝酸塩の濃度は、
2 対照群と O₃ 曝露群の間で差がなかった。以上 の結果から、iNOS 欠損マウスは O₃ 曝露に
3 対して高感受性であること、タンパク質のニトロ化は肺の炎症に関連していること、iNOS
4 由来の NO には依存しないことが示された。

5
6
7 Laskin *et al.* (2002)は、O₃ 曝露による肺胞マクロファージ活性化機構を解明するため、8
8 ~16 週齢の雌の C57BL6 マウス、iNOS 欠損の C57BL6x129 マウス、Cu, Zn SOD 過剰発現
9 の C57BL6xCBA/J マウス及び NF- κ B p50 欠損の C57BL6x129 マウスに清浄空気又は 0.8 ppm
10 の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露した。曝露終了の 48 時間後に BALF を採取し、炎症性細胞
11 数、タンパク質量を調べた。また、曝露終了の直後又は 3、6、24、48 時間後に肺胞マクロ
12 ファージを採取し、肺胞マクロファージの産生する NO 及びペルオキシ亜硝酸量 (曝露 48
13 時間後のマクロファージのみ)、NF- κ B 及び STAT (シグナル伝達兼転写活性化因子: signal
14 transducer and activator of transcription) -1 のシグナル伝達、STAT-1、PI3- K (Phosphoinositide
15 3-kinase) 及び PK (protein kinase) B の発現 (曝露 0~24 時間後のマクロファージのみ) に
16 ついて検討した。O₃ 曝露により肺胞マクロファージの iNOS、NO、ペルオキシ亜硝酸産生
17 は増加するが、iNOS 欠損マウス及び Cu, Zn SOD 過剰発現マウスではこの影響はみられな
18 かった。iNOS 欠損マウス及び Cu, Zn SOD 過剰発現マウスでは BALF 中のタンパク質量を
19 指標とした O₃ の毒性もみられなかった。iNOS 遺伝子の promoter/enhancer 部位に NF- κ B と
20 STAT-1 の結合部位があり、O₃ 曝露によって、この NF- κ B の急速かつ持続的な活性化が認
21 められた。PI3-K、PKB は NF- κ B の活性を調節しているが、これらについても O₃ に曝露し
22 たマウスから採取した肺胞マクロファージにおける増加が認められた。O₃ 曝露した NF- κ B
23 p50 欠損マウスから採取した肺胞マクロファージでは、このような反応性中間体の産生が
24 認められず、O₃ 毒性から防御されていたことから、肺傷害における NF- κ B シグナル情報伝
25 達経路が重要であることが示された。さらに、O₃ 曝露により肺胞マクロファージにおける
26 STAT-1 活性や発現が上昇していることが示された。以上 の結果から、炎症過程において
27 重要な遺伝子の発現を調整するシグナル情報伝達経路が O₃ 毒性に関与していることが示
28 唆された。

29
30 Michalec *et al.* (2002)は、オゾン曝露による炎症に関与しているケモカインを特定するた
31 めに、①6-8 週齢の BALB/c マウスに 0.2 または 0.8 ppm の O₃ を 6 時間曝露させた後、0、
32 18、42、138 時間後に肺胞洗浄を実施した、②マウスに抗ケモカイン IgG 抗体を投与した
33 1 時間後に 0.8ppm O₃ に 6 時間曝露し、その 18 時間後に肺胞洗浄を実施した、③0.8ppm O₃
34 に 6 時間曝露した後、0 時間と 18 時間後に肺組織を採取し、RT-PCR(0 時間と 18 時間後)、
35 ウェスタンブロット(18 時間後)、免疫蛍光染色(18 時間後)を実施した。解析の結果、ろ過
36 空気曝露と比較して、0.8 ppm の O₃ 曝露では顕著な好中球性気道炎症が誘発され、曝露後

1 18 時間でピークに達した。0.2 ppm の O₃ ではこの結果はみられなかった。0.8 ppm の O₃
2 は、CXCL1、2、3 (mouse growth-related oncogene-alpha and macrophage-inflammatory protein-2)、
3 CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10)、CCL3 (macrophage-inflammatory protein-1alpha)、
4 CCL7 (monocyte chemoattractant protein-3) および CCL11 (eotaxin) の肺における mRNA を
5 曝露後 0 時間時点で上方制御し、CXCL10、CCL3 および CCL7 mRNA の発現は曝露 18 時
6 間後まで持続した。また、O₃ 曝露は CXCL10、CCL7 および CCR3 (CCL7R) の肺におけ
7 るタンパク質レベルを増加させた。免疫染色より、CCL7 の由来としては気道上皮が特定
8 された。上方制御されたケモカインの役割について、0.8ppm での O₃ 曝露前に 6 種のマウ
9 スケモカインに対する IgG 抗体を投与することにより解析したところ、事前に想定した通
10 り、抗 CXCL1、2、3(KC)抗体は肺における好中球の動員を抑制したが、想定とは反して、
11 CCL7 と CXCL10 に対する抗体も好中球の動員をそれぞれ 63 と 72%減少した。これらの
12 結果は、CCL7 と CXCL10 というこれまでに報告されていない好中球性炎症を調整するた
13 めの 2 つのケモカインが、酸化ストレスにより誘発される好中球性気道炎症に重要な役割
14 を果たすことを示している。これらの結果は、重度の喘息における好中球増加症の誘発に
15 関連している可能性がある。

16

17 Toward and Broadley (2002)は、O₃ 吸入曝露の影響に対する、コルチコステロイドである
18 デキサメタゾンおよびホスホジエステラーゼ 4 阻害剤であるロリプラムの効果について調
19 べた。雄の Dunkin-Hartley モルモットに O₃ (2.15 +/- 0.05 ppm、90 分) を吸入曝露させ、
20 O₃ 曝露の 24 時間前、0.5、2、24、48、72 時間後にヒスタミンに対する気道反応性および
21 炎症について評価した。また、O₃ 曝露の 24 時間前、0.5 時間後、24 時間後にデキサメタゾ
22 ンまたはロリプラムを投与し、O₃ 曝露による影響への効果を調べた。評価は気管支肺胞洗
23 浄(および、全身プレシチモグラフィによる気道コンダクタンス(sGaw)、呼吸数の計測によ
24 り行った。また湿/乾燥重量差により肺浮腫を測定した。O₃ 曝露は、全身プレシチモグラフィ
25 で測定された気道コンダクタンスの低下として、初期相の気管支収縮 (EPB) を引き起
26 こし、5 時間後には後期の気管支収縮 (LPB) と呼吸数の増加が生じた。ロリプラムはこ
27 の変化に影響を与えなかったが、デキサメタゾン投与は EPB を阻害した。ヒスタミン吸入
28 に対する気道過敏性は、O₃ 吸入後 0.5、2、12、24、48 時間で発生し、2 時間後での変化は
29 ロリプラムとデキサメタゾンによって抑制された。BALF 中のマクロファージ、好酸球、
30 好中球は、O₃ 曝露後 12、24、48 時間で上昇し (P <0.05)、48 時間での上昇はロリプラム
31 とデキサメタゾンによって大幅に減衰した (P <0.05)。BALF 中の一酸化窒素代謝物は、
32 O₃ 曝露後 0.5 時間で 52%減少し、2 時間で回復した後、12 (101%) と 24 時間 (127%) で
33 増加した。NO の上昇はロリプラムまたはデキサメタゾンの影響を受けなかった。湿/乾燥
34 重量差から測定された肺浮腫は O₃ 曝露の 12、24、48 時間後に生じたが、ロリプラムとデ
35 キサメタゾンによって減衰した (P <0.05)。モルモットへの O₃ 曝露により、COPD と同様の
36 の影響が認められた。ロリプラムとデキサメタゾンは呼吸機能の変化には影響しなかった

1 が、炎症、気道過敏性、肺浮腫を抑制した。

2
3 Yu *et al.* (2002a)は、環境大気汚染物質によって誘発された肺の炎症、損傷および修復に
4 おけるインターロイキン-6 (IL-6) の役割を解析した。10 週齢の雄の C57BL/6J (WT) ま
5 たは IL-6 KO マウスに 10 mg/m³ の ADSS(aged and diluted cigarette smoke)またはろ過空気を
6 6 時間/日で 3 日曝露させた後、0.5 ppm のオゾンまたはろ過空気を 24 時間吸入曝露させ、
7 オゾン曝露直後に BALF を回収して解析した。また、曝露 22 時間後にブロモデオキシウ
8 リジン (BrdU) を腹腔内投与し、オゾン曝露 24 時間後に肺を固定して解析した。オゾン
9 単独または ADSS/オゾン曝露後、IL-6 KO と WT マウスにおいて、気管支肺胞洗浄 (BAL)
10 で回収された単球と好中球の割合、BALF 中の総タンパク量が増加した。一方で、IL-6 KO
11 マウスでは、オゾンまたは ADSS/オゾン曝露後の末端細気管支上皮および近位肺胞領域内
12 の BrdU 標識の増加は、WT マウスと比較して小さかった。抗 IL-6 抗体で処置された WT
13 マウスにおいても、オゾン、または ADSS/オゾン曝露後の IL-6 KO マウスと同様に、BrdU
14 の細胞標識が抑制された。ADSS、オゾン、ADSS/オゾンに曝露した WT マウスの終末細気
15 管支上皮において、クララ細胞の成熟および機能マーカーであるクララ細胞分泌タンパク
16 質 (CCSP) の量が減少した一方で、IL-6 KO マウスでは CCSP の量は変化しなかった。以
17 上より著者らは、マウスの内因性 IL-6 は肺の炎症/損傷の進展に重要な役割を果たしてお
18 り、CCSP は有毒な大気汚染物質に曝露されたマウスの肺に保護的に働くとし、本研究の
19 結果から、IL-6 抗体による治療法が環境汚染誘発の肺炎症および損傷を軽減する手段とな
20 る可能性が示されたと報告した。

21
22 Schelegle *et al.* (2003b)は、O₃ 反復曝露による、生理学的適応、上皮傷害/修復、気管のサ
23 ブスタンス P レベルの経時的な変化について調べた。Harlan Sprague-Dawley ラット (77 日
24 齢以上、全 63 匹) に 1 ppm O₃ を 8 時間/日で 5 日間曝露した後、ろ過空気を 9 日間曝露
25 するサイクルを 4 回繰り返す。各サイクルの第 1、5 日目および第 1、2、4 サイクルの第
26 14 日目に安楽死させて解析を実施した。なお、各ラットの安楽死 1 時間前に増殖細胞標識
27 として 5-bromo-2'-deoxyuridine を注射した。O₃ 曝露により、浅く早い呼吸が誘導された。
28 中位気管支、細気管支、肺胞管の炎症および上皮傷害が見られ、その影響の程度は曝露の
29 反復ごとに小さくなる傾向が見られた。BALF 中の好中球、白血球、好酸球、マクロファ
30 ージ数および上皮と間質の細胞増殖が増加したが、曝露の反復に伴い影響が弱くなった。
31 逆に、終末細気管支におけるリモデリングについては、サイクルごとに影響の増加が認め
32 られた。これらの結果は、O₃ 曝露による累積性の末梢気道病変が、気道傷害に対する細
33 胞増殖応答の低下によるものであることを示唆している。また、細胞増殖応答の低下は、
34 O₃ 誘発傷害に応答した好中球炎症および/または分裂促進性神経ペプチドの放出の減少の
35 結果であることが示唆された。

1 Wagner *et al.* (2003)は、大気中汚染物質への複合曝露は、単一汚染物質の吸入曝露よりも
2 気道上皮への中毒性が高くなる可能性があり、既報において O₃ 及びアレルギーや細菌のエ
3 ンドトキシン等、生物由来の炎症性物質への経鼻吸入による複合曝露によってラットの上
4 皮反応及び炎症反応が増大していたことから、げっ歯類の肺気道中の呼吸上皮に及ぼす O₃
5 及びエンドトキシンの毒性相互作用を検討した。10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラット
6 に 0、2、20 µg のエンドトキシン (LPS) を鼻腔に投与し、6 時間後にろ過空気又は 1.0 ppm
7 の O₃ を 8 時間/日で全身吸入曝露させる手続きを 2 日間反復した。実験第 5 日目に BALF
8 を採取し、BALF 中のマクロファージ数、リンパ球数、好中球数、粘液物質分泌量及びエ
9 ラスターゼ量を調べ、さらに、肺組織を処理し、上皮内粘液物質密度、上皮細胞密度の光
10 学顕検鏡検査及び形態計測解析を行った。また、誘導気管支を顕微解剖し定量的 RT-PCR
11 により分析し、呼吸上皮に存在する定常状態のムチン遺伝子 rMuc-5AC mRNA 濃度を定量
12 した。エンドトキシン投与によって BALF 中の好中球数が用量依存的に増加し、20 µg の
13 エンドトキシンを投与された O₃ 曝露ラットでは 2 倍に増加した。20 µg のエンドトキシン
14 を投与されたラットの BALF 中に含まれる rMuc-5AC mRNA は増加したが、2 µg のエンド
15 トキシン投与ラットでは増加しなかった。O₃ への曝露のみでは粘液過分泌が起こらなかつ
16 たが、20 µg 又は 2 µg のエンドトキシンを投与されたラットでは O₃ 曝露によって粘液分泌
17 が促進された。空気又は O₃ のみに曝露させたラットの気道中上皮内粘液物質量は少なかつ
18 たが、エンドトキシン投与により気道上皮内粘液物質量は用量依存的に増加し、エンド
19 キシン投与後に O₃ 曝露させたラットでは 2 倍に増加した。2、20 µg のエンドトキシン投
20 与によって軸性の肺気道中で rMuc5AC の形質発現が誘導され、20µg のエンドトキシン投
21 与ラットでは O₃ への曝露によって更に発現が増加した。以上 の結果から、ラット肺気道
22 中では O₃ への曝露によって生物由来物質に起因する好中球性の炎症、粘液産生と分泌が促
23 進されることが示された。

24

25 Fakhrzadeh *et al.* (2004a)は、O₃ 急性曝露による肺における炎症メディエーター産生の変化
26 と、関連転写因子タンパク質の役割について評価した。NF-κBp50 KO マウス (C57/Sv129
27 NF-κB p50^{-/-}、雌、n=3-6/群) または野生型マウス (B6J129SV F2、雌、n=3-6/群) を 0.8ppm
28 の O₃ に 3 時間曝露させ、EMSA、ウエスタンブロッティング、組織免疫染色、BALF 成分
29 の測定などにより肺への影響を評価した。O₃ 曝露により、野生型マウスでは以下の変化が
30 認められた。肺胞マクロファージにおける NF-κB 結合活性が急速に増加し、6-12 時間でピ
31 ークに達した。肺胞マクロファージにおいて C/EBP、一酸化窒素、TNF-α の産生が増加し
32 した。肺胞マクロファージにおいて IL-10 の発現が減少した。組織損傷のマーカーである気
33 管支肺胞洗浄中タンパク質量が増加した。これらの変化はいずれも NF-κB p50 KO マウス
34 では認められなかった。以上 の結果は、NF-κB および C/EBP シグナル伝達が、O₃ 曝露に
35 による反応性窒素中間体および TNF-α の産生変化と、肺における組織損傷に関与しているこ
36 とを示唆している。

1
2 Fakhrazadeh *et al.* (2004b)は、活性酸素中間体が、刺激物の吸入によって引き起こされる肺
3 損傷に関係していることから、本研究で、Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD+/+) を過剰発現させたマウスを使用して、O₃ による肺の炎症と細胞毒性における Cu/Zn-SOD
4 の役割を分析した。8-16 週齢の雌の C57BL/6 マウス、及び C57BL/6xCBA/J SOD (Cu/Zn-SOD
5 過剰発現) マウスに、0.8ppm の O₃ を 3 時間吸入曝露した。野生型マウスを O₃ に曝露させ
6 ると、FA 群と比較して気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のタンパク質が増加し、24~48 時間
7 後に最大となった。また、4-ヒドロキシアルケナールの増加、肺マクロファージ数の増加
8 が観察された。対照的に、BALF のタンパク質、マクロファージ数および 4-ヒドロキシア
9 ルケナールは、O₃ 曝露 SOD+/+マウスにおいて、FA 曝露 SOD+/+マウスと同程度であった。
10 SOD+/+マウスでは O₃ 曝露によるペルオキシ亜硝酸やニトロチロシンの産生は見られな
11 かった。野生型マウスの肺胞マクロファージは、O₃ 曝露後に一酸化窒素の量を増加させ、FA
12 曝露野性型マウスと比較して、誘導性一酸化窒素シンターゼ、ホスホリパーゼ A2 を増加
13 させ、TNF α の発現を増加させた。これは SOD+/+マウスでは認められなかった。また、
14 SOD+/+マウスでは、野性型マウスで観察された O₃ によるインターロイキン 10 の減少はみ
15 られなかった。野生型マウスでは、O₃ 曝露により、炎症性遺伝子活性を調節する NF- κ B
16 が活性化されたが、この応答は SOD+/+マウスでは大幅に減少した。これらのデータは、
17 抗酸化酵素が O₃ 誘発性組織損傷および炎症性メディエーター産生において重要な役割を
18 果たすことを示している。

19
20
21 Valacchi *et al.* (2004)は、健康な若年 (7~10 週齢) の SKH-1 無毛マウス (10 匹) に室内
22 空気又は 0.8 ppm の O₃ を 6 時間/日で連続 6 日間、曝露させた。曝露中の体重を測定し、
23 曝露終了後、血液及び皮膚、肺の組織を採取し、 α -トコフェロール、I κ B α リン酸化反応、
24 COX-2、HO-1、PCNA、K-10 (Keratin-10) について調べた。体重については、曝露第 6 日
25 において、O₃ 曝露群は室内空気曝露群より約 6~18 %少なかった。O₃ 曝露群では、肺や血
26 漿中の α -トコフェロールが減少し、皮膚及び肺に HO-1、COX-2、PCNA が誘導された。
27 O₃ 曝露による肺と皮膚における COX-2、PCNA の上方調節は同程度であったが、HO-1 に
28 ついては、肺では 2 倍の誘導だったのに対し、皮膚では 7 倍となり、皮膚でより強い反応
29 を示した。これらの酸化ストレス反応指標に加えて、O₃ 曝露は肺、皮膚の両組織における
30 I κ B α リン酸化反応として測定した NF- κ B の活性化を生じさせた。室内空気曝露群の皮膚
31 に比べ、O₃ 曝露群の皮膚で K-10 が増加した。本モデルにおいて、高汚染レベルでの O₃ 曝
32 露は、 α -トコフェロールの減少や皮膚上皮及び気道上皮におけるストレス関連反応の誘導
33 といった影響を肺及び皮膚に与える可能性がある」と結論した。

34
35 Johnston *et al.* (2005b)は、8 週齢以上の野生型 C57BL/6 マウス及び IL-6 欠損マウスに室
36 内空気又は 0.3、2 ppm の O₃ を 3 時間 (急性曝露)、室内空気又は 0.3 ppm の O₃ を 72 時間

1 (亜急性曝露)、全身吸入曝露させた。ボディプレチスモグラフで測定した気道反応性は、
2 曝露前日、及び急性曝露、亜急性曝露終了直後にメサコリンを投与して Penh (enhanced pause)
3 を用いて比較した。BALF 中の総細胞数、細胞分画、総タンパク質、IL-6、KC、MIP-2、sTNFR1、
4 sTNFR2、エオタキシンを調べた。肺における IL-6 mRNA 発現については、野生型マウス
5 において、0.3 ppm の O₃ の急性、亜急性曝露により空気曝露と比較して上昇した。BALF に
6 ついては、0.3 ppm の O₃ の急性、亜急性曝露により、野生型、IL-6 欠損の両マウスにおい
7 て総タンパク質、sTNFR1、sTNFR2 が空気曝露と比較して増加した。野生型マウスと IL-6
8 欠損マウスを比較すると、空気、0.3 ppm の O₃ 急性曝露後の総タンパク質量は同程度であ
9 ったが、空気、0.3 ppm の O₃ 急性曝露後の sTNFR2 量、空気曝露後の sTNFR1 量は IL-6 欠
10 損マウスにおいて野生型マウスよりも低かった。O₃ 亜急性曝露後の総タンパク質、sTNFR1、
11 sTNFR2 量、好中球比率は、IL-6 欠損マウスにおいて野生型マウスよりも低かった。2 ppm
12 の O₃ 急性曝露により、野生型マウスでは全ての BALF 炎症パラメーターが空気曝露時と
13 比較して上昇した。一方、IL-6 欠損マウスでは、タンパク質、エオタキシン、KC、sTNFR
14 1 は空気曝露と比較し、上昇したが、sTNFR2、MIP-2 の上昇はみられなかった。タンパク
15 質、エオタキシン、KC、sTNFR 1 の上昇の程度は、野生型マウスと IL-6 欠損マウスで相
16 違はなかった。また、野生型マウス、IL-6 欠損マウスとも 2 ppm の O₃ 急性曝露は、BALF
17 中総細胞数に顕著な差をもたらさなかったが、好中球、上皮細胞、好酸球の割合は変化した。
18 2 ppm の O₃ 急性曝露後の BALF 中の好中球、上皮細胞、好中球の割合は、室内空気を
19 曝露された対象群と比較し野生型のマウスで増加し、O₃ 曝露に伴って、BALF 中の好中球
20 数は野生型マウスと比較し IL 欠損マウスで低下を認めた。一方、上皮細胞と好中球におけ
21 る増加の程度は、野生型マウスと IL 欠損マウス間で差がみられなかった。0.3 ppm の O₃
22 急性曝露により野生型、IL-6 欠損の両マウスとも気道過敏性が生じたが、遺伝子型の違い
23 による気道過敏性の重症度に差はなかった。また、亜急性曝露ではどちらの遺伝子型にも
24 変化は生じなかった。Penh のベースライン値は、野生型、IL-6 欠損の両マウスとも 2 ppm
25 の O₃ 曝露により増加したが、0.3 ppm の O₃ 曝露では、このような変化はみられなかった。
26 以上の結果から、IL-6 欠損は高濃度の O₃ 曝露や低濃度の亜急性曝露後の気道における好
27 中球増加を抑制し、sTNFR1、sTNFR2 の両方あるいはどちらか発現を低下させるが、少な
28 くとも 0.3 ppm の O₃ 曝露では、O₃ 誘導による気道過敏性の亢進に IL-6 欠損が影響しないこ
29 とを示唆している。

30

31 Johnston *et al.* (2005c)は、BALB/cJ マウス野生型及び CXCR-2 欠損(雄、8~13 週齢、n = 4
32 ~ 10)に対し、O₃ を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、(1) room air 曝露野生型マウ
33 ス、(2) O₃ 曝露野生型マウス、(3) room air 曝露 CXCR-2 欠損マウス、(4) O₃ 曝露 CXCR-2
34 欠損マウスである。曝露濃度 1 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への
35 急性影響を調べた。曝露後 3 時間、24 時間の BALF 中好中球数・ケモカイン・上皮細胞数・
36 総タンパク量、血中好中球数、メサコリン (MCh) による気道反応性を観察し、影響を評

1 価した。野生型も CXCR-2 欠損マウスも O₃ 曝露により 24 時間後の BALF 中好中球が増加
2 し、CXCR-2 欠損マウスより少なかった。血中好中球数には違いが見られなかった。BALF
3 中の CXCR-2 リガンドは両マウスで 3 時間後に増加して 24 時間後に減少したが IP-10 と
4 MCP-1 は 24 時間後も増加した。24 時間後の BALF 中の総タンパク量は両マウスで増加し
5 ていたが上皮細胞数の増加は野生型のみで認められた。MCh による気道反応性亢進は曝露
6 3 時間後には両マウスで観察されたが、CXCR-2 欠損マウスでは 24 時間後には低下してい
7 た。CXCR-2 は O₃ 急性曝露後の肺での好中球の増加、上皮細胞の剥離、気道反応性の持続
8 的な上昇に必要なことが明らかになった。

9
10 Kenyon *et al.* (2006)は、6 週齢の C57BL/6 野生型マウス、NOS (一酸化窒素合成酵素) 2
11 遺伝子のホモ欠損マウス (NOS2^{-/-})、ヘテロ欠損マウス (NOS2^{+/-}、NOS2^{-/+}) 及び相互の
12 骨髄移植モデルにろ過空気又は 1.00 ppm の O₃ を 8 時間/日 (午前 0 時~8 時) で連続 3 日
13 間、全身吸入曝露させた (4~19 匹/群)。曝露終了の 1~3 時間後、メサコリンに対する気
14 道抵抗性、動的肺コンプライアンスを測定した。また、呼気、BALF、血液を採取し、呼
15 気中の NO 濃度、BALF 中の細胞数及びその組成、血漿中総スルフヒドリル (Sulphydryl)
16 濃度について検討した。O₃ 曝露により、NOS2^{-/-}マウスにおいて血漿中スルフヒドリル濃
17 度が減少した。NOS2^{-/-}骨髄を持つ NOS2^{-/+}マウスでは NOS2^{+/-}マウスと比較し、動的肺コ
18 ンプライアンスは低下し、BALF 中の好中球数の増加、呼気中の NO 濃度の低下等、O₃ に
19 対する反応が大きくなった。以上 の結果から、NOS2 は O₃ 吸入による肺の急性傷害に対
20 する防御的影響を及ぼし、その影響の一部には NOS2 によって炎症細胞から産生された NO
21 が関与している可能性がある」と結論される。

22
23 Cho *et al.* (2007)は、6~8 週齢の TNF 受容体欠損マウス及び野生型マウスにろ過空気又は
24 0.3 ppm の O₃ を 6、24、48 時間、NF-κB (nuclear factor-kappa B p50) 欠損マウス、JNK (c-jun
25 terminal kinase) 欠損マウス及びそれぞれに対応する野生型マウスには 48 時間、全身吸入
26 曝露させた (各群 3~4 匹)。曝露終了直後に肺組織を採取し、6、24 時間曝露後の組織学
27 的变化、TNF 受容体シグナル伝達複合体形成の指標である TRAF2 (TNF-R-associated
28 factor2)、及び NF-κB、AP-1 (activator protein-1) の DNA 結合活性、24、48 時間曝露後の
29 TNF-α、LT (lymphotoxin) -β、MIP-2、IL-1β、ICAM-1 の mRNA 発現を調べた。また、48
30 時間曝露の終了直後に BALF を採取し、炎症関連分子の変動を調べた。O₃ 曝露により、TNF
31 受容体欠損マウスでは野生型マウスと比較し、TRAF2 等の下流シグナル分子の活性化、肺
32 における炎症性変化が抑制された。NF-κB 経路、MAPK (mitogen-activated protein kinase)
33 /AP-1 経路の活性化に関しても同様の結果であった。O₃ 曝露による、これらの経路の下流
34 にある TNF-α、LT-β、MIP-2、IL-1β、ICAM-1 の遺伝子の肺における発現も、TNF 受容体
35 欠損マウスでは抑制されていた。また、NF-κB 欠損マウス、JNK 欠損マウスでは、O₃ に
36 による肺の炎症性傷害が各々の野生型マウスに比較して弱かった。

1
2 Dahl *et al.* (2007)は、O₃曝露により呼吸器に生じる酸化物、代謝物の排除に働くスカベン
3 ジャー受容体 {MARCO (macrophage receptor with collagenous structure)、SR-AI/II (scavenger
4 receptor AI/II)} の新たな働きについて解析するため、8~12週齢のスカベンジャー受容体
5 (MARCO、SR-AI/II) 欠損の C57BL/6 マウス、及びそれぞれの野生型マウスに 0.3 ppm の
6 O₃を 48 時間全身吸入曝露、ROFA (Residual Oil Fly Ash) 浸出液エアロゾルを 1 時間鼻部
7 吸入曝露、1 μ g の脂質酸化物 (β エポキシド、PON-GPC:
8 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-glycerophosphocholine、コレステロール) の気管内投与を行
9 った。O₃曝露終了から 1 時間以内、ROFA 浸出液エアロゾル曝露終了の 18 時間後、脂質
10 酸化物を気管内投与した 7 時間後に BALF を採取し、BALF 中の炎症性細胞、炎症因子、
11 スカベンジャー受容体の発現について検討した。また、8~12 週齢の C3H/OuJ マウス (O₃
12 高感受性)、C3H/HeJ マウス (O₃ 耐性) に清浄空気又は 0.3 ppm の O₃ を 6、24、48 時間全
13 身吸入曝露させ、肺における MARCO mRNA 発現について調べた。O₃ 高感受性のマウス
14 系統に比べ、O₃ 耐性のマウス系統において、O₃ 曝露による MARCO 発現が亢進した。さ
15 らに、MARCO 野生型マウスと比べて、MARCO 欠損マウスにおいて、O₃ 曝露による炎症
16 性細胞の集積や傷害、脂質酸化物気管内投与による好中球の集積が顕著に認められた。
17 SR-AI/II 欠損マウスは MARCO 欠損マウスとはやや異なる結果を示したが、互いの機能的
18 な役割の違いと解釈された。以上の結果から、スカベンジャー受容体は酸化性のガスによ
19 る炎症反応の抑制に役立っていることが示された。

20
21 Haque *et al.* (2007)は、C57BL/6 マウス (5 ~ 6 週齢、性別・匹数記載なし) に対し、O₃
22 を曝露する実験を行った。使用したマウスの遺伝子型は、野生型 (WT) と SP A (Surfactant
23 protein A) 欠損型 (KO) である。曝露群の構成は、清浄空気/O₃曝露 WT マウスと清浄空
24 気/O₃曝露 KO マウスである。曝露濃度 2 ppm で単回、3 時間または 6 時間、吸入による
25 曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露終了直後、曝露後 4 時間、24 時間後 BALF
26 を採取し、BALF 中の細胞数、総タンパク質、リン脂質比率、乳酸脱水素酵素 (LDH) 活
27 性、酸化ストレスに関するバイオマーカー及び炎症マーカー (マクロファージ炎症タンパ
28 ク質-2: MIP-2、単球走化性タンパク質-1: MCP-1)、SP-A レベル、SP-A 遺伝子・MIP-2 遺伝
29 子・MCP-1 遺伝子の発現量、酸化されたタンパク質量、酸化された SP-A 量、還元型グル
30 タチオン、酸化型グルタチオン、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン還元酵素
31 量、グルタチオン S-転移酵素量を観察し、影響を評価した。サーファクタントタンパク (SP
32 A) は宿主防御や炎症の制御に働いており、O₃ 曝露でも重要な役割を果たしていると考え
33 られる。そこで、SP A 欠損マウス (KO) は野生型 (WT) マウスと比べ O₃ 曝露による障
34 害を受けやすいか否かを検証した。O₃ を 3 時間曝露すると、KO マウスでは BALF 中の総
35 タンパク質が増加し、WT マウスでは酸化されたタンパク質量が増加した。また WT マウ
36 スでは酸化された SP-A が増加した。KO マウスでは、BALF 中の乳酸脱水素酵素の活性や、

1 リン脂質の含有率の増加がみられ、気道内皮がダメージを受けていることが示唆された。
2 野生型では、BALF 中の多形核白血球数が増加し、MIP-2、及び MCP-1 が増加した。WT
3 マウスと KO マウスでは、MIP-2 と MCP-1 の遺伝子の発現に差がみられ、WT マウスのみ
4 で、O₃ 曝露によって MIP-2 の mRNA レベルが増加した。WT と KO では炎症反応に差異が
5 みられた。以上、SP-A は、O₃ 曝露による炎症反応の制御と内皮細胞における障害の調節
6 に関わっていると考えられた。

7
8 Hollingsworth *et al.* (2007)は、O₃ 急性曝露による肺における自然免疫への影響について解
9 明するため、6~8 週齢の雄の C57BL/6J マウスにろ過空気又は 2 ppm の O₃ を 3 時間全身吸
10 入曝露し、その後 0、4 µg/m³ の LPS エアロゾルを 2.5 時間吸入曝露した。O₃ 曝露の 1、2、
11 3 日後にメサコリン誘導による気道反応性を測定し、1、2、3、7 日後に肺組織、BALF を
12 採取し、肺組織変化、BALF 中の液性因子、炎症性細胞集団の構成細胞の変動、1 日後の
13 肺、血液におけるマクロファージ、単球のアポトーシス、BALF 中マクロファージ表面の
14 TLR4 発現分布について検討した。気道過敏性については、O₃ 曝露によって亢進し、LPS
15 の投与によって更に増悪し、曝露 7 日後まで継続した。炎症性タンパク質や血清中 IL-6 量
16 の増加も同様な変動を示した。しかしながら、LPS を投与した群における曝露 1、2 日後の
17 炎症性細胞の変化をみると、O₃ 曝露群では、ろ過空気曝露群と比較して細胞数の低下が認
18 められた。O₃ 曝露によって、マクロファージ上の TLR4 の発現が変化し、マクロファージ
19 や単球はアポトーシスを起こして減少することが明らかとなった。以上 の結果から、O₃
20 急性曝露は、肺における LPS に対する自然免疫系の反応を増強することが示された。

21
22 Johnston *et al.* (2007a)は、O₃ 曝露による肺での炎症における炎症性サイトカインである
23 IL-1 の役割を調べるため、7 週齢の野生型 C57BL/6J マウス及び IL-1 受容体タイプ I 欠損マ
24 ウスに 2 ppm の O₃ を 3 時間 (急性)、又は 0.3 ppm の O₃ を 72 時間 (亜急性)、全身吸入曝
25 露させた。対照群として、遺伝子型をマッチさせたマウスに空気を曝露させた。曝露の前
26 後に呼吸回数及び終末呼気休止を測定した。また、急性曝露については曝露終了から 3、6、
27 24 時間後、亜急性曝露については曝露終了直後に BALF、肺組織を採取し、BALF 中の総
28 細胞数と分画、総タンパク質、エオタキシン、IP-10、IL-6、KC、MCP-1、MIP-2、sTNFR1 (可
29 溶性 TNF 受容体: soluble tumor necrosis factor receptor1) の濃度、肺における IL-1β、IL-1α、
30 IL-6、ICAM-1 の mRNA 発現について調べた。O₃ の亜急性曝露により、BALF 中のタンパ
31 ク質、IP-10、sTNFR1、好中球が増加したが、これらの影響は、IP-10 を除き、IL-1 受容体
32 タイプ I 欠損マウスでは減弱した。また、O₃ の亜急性曝露によって、野生型マウスでは IL-6
33 mRNA が増加したが、IL-1 受容体タイプ I 欠損マウスではこの影響はみられなかった。急
34 性曝露による影響については、BALF 中のエオタキシン、IP-10、IL-6、KC、MCP-1、MIP-2、
35 sTNFR1、好中球の増加が野生型及び IL-1RI 欠損マウスの両方でみられたが、その作用は
36 曝露の 3、6 時間後においては IL-1 受容体タイプ I 欠損マウスで弱く、24 時間後において

1 は両マウス間の差はなかった。

2
3 Plopper *et al.* (2007)は、アカゲザル(性別記載なし、生後期間、匹数記載なし)に対し、O₃
4 を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、清浄空気群、ダニ抗原曝露群、O₃曝露群、ダ
5 ニ抗原 + O₃曝露群である。曝露濃度はメキシコシティの大気に基づき 0.05 ppm に設定し
6 た。吸入による曝露を 8 時間/日、5 日間 O₃曝露、9 日間フィルター空気曝露を 11 サイク
7 ル行い、呼吸器への慢性影響を調べた。生後 12 か月までの免疫応答、気道の発達、気道平
8 滑筋、気道の免疫機構を観察し、影響を評価した。生後 ~ 発達期のアカゲザルに O₃反復
9 曝露によるアレルギー性ぜん息発症への影響を検討したところ、気道過敏性の亢進や、好
10 酸球数の増加、気道壁の肥厚や内腔の狭小化を認め(EMTU) (気道のリモデリング)、アレ
11 ルギー反応を増長させた。肺の発達期間に有害物質の曝露により障害を生じると、その後
12 曝露を止めても障害は残るか成長とともに悪化していく。

13
14 Wang *et al.* (2007)は、3 か月齢の雄の ICR マウスに 1.9 mg/m³ の O₃ を 7 日間鼻部吸入曝露
15 させ、肺傷害モデルを作成し、25、50、100 mg/kg のフェルラ酸 Na を投与した。3 種類の
16 肺傷害薬剤投与群に加え、フェルラ酸 Na を投与しない肺傷害モデル群、O₃曝露、フェル
17 ラ酸 Na 投与のいずれも行わない対照群を設定した (各群 20 匹、計 100 匹)。フェルラ酸
18 Na 最終投与の 1 時間後に屠殺し、肺上皮における SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ
19 の活性、細胞膜流動性を調べ、電子顕微鏡により肺組織の超微細構造の変化を観察した。
20 O₃曝露により肺上皮細胞の膜質脂肪微小粘度 (membrane lipo-microviscosity) は増加し、ク
21 ロマチンのゆがみ、ミトコンドリアの破壊、溶解等、超微細構造が変化していたが、フェ
22 ルラ酸投与群では微小粘度は対照群に近づき、肺傷害は O₃曝露群よりも軽度で、上皮の形
23 態学的構造も正常だった。フェルラ酸 Na は、O₃によって低下した SOD、グルタチオンペ
24 ルオキシダーゼの活性を上昇させた。フェルラ酸 Na は、高濃度では低濃度よりも SOD や
25 グルタチオンペルオキシダーゼの上昇を促進し、O₃による肺上皮細胞への傷害を抑制した。
26 以上の結果から、フェルラ酸 Na は SOD、グルタチオンペルオキシダーゼの活性を上昇さ
27 せることで細胞内小器官の破壊を抑制し、肺への傷害を緩和した。

28
29 Williams *et al.* (2007a)は、BALB/c マウス (雄、6~8 週齢、4~8 匹/群) に対し、O₃ を
30 曝露する実験を行った。O₃曝露により誘導される気道反応性や炎症における MAPK 経路
31 の JNK の役割について検証した。JNK 特異的阻害剤である SP600125 を用いた。曝露群の
32 構成は、SP600125 投与群/溶媒投与群それぞれに O₃曝露群/清浄空気曝露群がある。
33 SP600125 は腹腔内投与または溶媒投与した。曝露濃度 3 ppm で単回、3 時間、吸入による
34 曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露後 3 時間、20~24 時間の気道反応性 (PC150:
35 肺抵抗をベースラインから 150 %増大させるアセチルコリン濃度)、BALF 中の総細胞数・
36 細胞分画、IL-6・CCL2・CXCL1 (KC)・TNF- α 発現、肺組織中の mRNA 発現を観察し、

(案)

1 影響を評価した。分散分析は Kruskal-Wallis 検定を行い、分散分析で有意差があれば Dunn
2 検定を行った。阻害剤の投与は、O₃ 曝露による BALF 中総細胞数、好中球数の増加を抑制
3 し、アセチルコリン誘導の肺抵抗増加を阻害した。O₃ 曝露は、JNK の活性化を誘導したが、
4 阻害剤投与はその影響を阻止した。O₃ 曝露によりマイクロアレイ解析で 2 倍以上 増加し
5 た遺伝子は、IL-6、CXCL1 (KC)、CCL2 (MCP-1) 等、400 種類以上 あり、SP600125 は
6 O₃ 誘導遺伝子のうち 29 遺伝子の発現を変化させ、IL-6 や CCL2 などの発現量をより上昇
7 させ、metallothionein 1、 hemopexin、 mitogen-activated 3 kinase 6 の発現量は抑制した。O₃
8 曝露で抑制された遺伝子は細胞シグナル、転写に関わるものを主として 500 以上 あり、
9 angiopoietin-1 は最も抑制がみられた。阻害剤 SP600125 でそのうち 15 種類の発現を変化さ
10 せ、7 種類を増大 (HIF1 α 、2HLA-B 等)、8 種類をより低減させた。O₃ 曝露により IL-6、
11 CCL-2、CXCL1、TNF- α の発現は増大した。SP600125 投与によって TNF- α 発現は低減、IL-6、
12 CCL2 は更に増大したが、CXCL1 は影響を受けなかった。以上、阻害剤による JNK の抑
13 制は O₃ 曝露による炎症反応誘導に影響を与えることから、JNK の重要な関与が示唆され
14 た。

15

16 Williams *et al.* (2007b)は、C57BL/6 マウス (雄、齢数記載なし、20~25 g、各群 6~8 匹)
17 に対し、O₃ を曝露する実験を行った。使用したマウスの遺伝子型は野生型、TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}、
18 MyD88^{-/-}である。トール様受容体 (TLR) は、自然免疫において最前線で働く分子であり、
19 O₃ 曝露によるシグナル伝達経路にある TLR2、TLR4、MyD88 の識別について検証した。
20 曝露群の構成は、各遺伝子型について清浄空気曝露群と O₃ 曝露群である。曝露濃度 3 ppm
21 で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露後 3 時間、
22 20~24 時間の気道反応性(PC250: 肺抵抗をベースラインから 250%増大させるアセチルコ
23 リン濃度)、BALF 中の総細胞数・細胞分画・タンパク質量・IL-6 発現、肺組織中の mRNA
24 発現を観察し、影響を評価した。分散分析は Kruskal-Wallis 検定を行い、分散分析で有意
25 差があれば Dunn 検定、Mann-Whitney 検定を行った。野生型マウスでは O₃ 曝露により気
26 道反応性が亢進した。欠損型マウスである TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}、MyD88^{-/-}では O₃ 曝露による気
27 道反応性亢進はみられなかった。O₃ 曝露による BALF 中好中球数の増加は TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}
28 型で O₃ 曝露後 3 時間では野生型よりも少なかったが 24 時間では差はなかった。一方、O₃
29 曝露による MyD88^{-/-}型の好中球数は 24 時間後も野生型よりも少なかった。肺組織における
30 IL-6、KC、TLR2、TLR4、MyD88mRNA 発現は、野生型では O₃ 曝露により時間依存的に
31 増大した。TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}、MyD88^{-/-}型では、IL-6、KC の遺伝子発現は抑制された。TLR2
32 と TLR4 は O₃ 曝露による気道反応性の亢進に関わっているが、MyD88 は O₃ 曝露による好
33 中球増多に関与する。TLR2 と TLR4 も好中球反応の速度の調節では重要な働きを担って
34 いる。以上、O₃ 曝露は、酸化性ストレスのような非感染刺激を識別するトール様受容体
35 経路の活性化を介して気道反応性の亢進や好中球増多を誘導していることが示唆された。

36

1 Yoon *et al.* (2007)は、呼吸器系疾患との関係が示唆されている MMP と、肺における炎症
2 との関係調べるため、6~8 週齢の雄の野生型 C57BL/6J マウス、MMP-7 欠損マウス及び
3 MMP-9 欠損マウスに 0.3 ppm の O₃ を 6、24、48、72 時間、全身吸入曝露させ、対照群に
4 はろ過空気を 48 時間曝露させた。曝露終了直後にマウスを安楽死させ、O₃ を 24、48 時間
5 曝露させたマウスの BALF を採取し、総細胞数、分画、タンパク質について調べた。さら
6 に、対照群、24、48、72 時間 O₃ 曝露群の肺組織を病理組織学的に観察し、対照群、6、24、
7 48 時間 O₃ 曝露群の肺における遺伝子発現を調べた。O₃ 曝露によって、野生型マウスでは
8 BALF 中の MMP-9 活性が増加し、MMP-9 欠損マウスでは BALF へのタンパク質漏出、炎
9 症細胞の浸潤が野生型マウスと比較し、より増加した。また、MMP-9 欠損マウスでは、
10 O₃ 曝露後の BALF 中の KC や MIP-2 の濃度が野生型マウスよりも高かったが、これらの遺
11 伝子発現については MMP 欠損マウスと野生型マウスで差がみられなかった。一方、MMP-7
12 欠損マウスでは、O₃ 曝露後のタンパク質濃度、炎症細胞数は、野生型マウスとの差はみら
13 れなかった。以上 の結果は、O₃ によって誘発される肺の好中球性の炎症及び透過過多に
14 対し、MMP-9 は防御作用を有するが、MMP-7 は有していないことを示しており、MMP-9
15 が O₃ 誘発気道傷害を抑制するメカニズムは不明ではあるが KC、MIP-2 等の炎症性 CXC
16 ケモカインへの転写後の影響を介している可能性がある。

17

18 Fakhrzadeh *et al.* (2008)は、8~12 週齢の雌の野生型 C57BL/6 マウス及び TNF- α 欠損マウ
19 スに清浄空気又は 0.8 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露させた (各群 3~6 匹)。曝露終了
20 の直後又は 3 時間後に肺組織を採取し、TNF- α 発現を調べ、曝露終了 48 時間後に BALF
21 を採取し、タンパク質濃度を調べた。また、曝露終了の 0~48 時間後にマウスから分離し
22 た肺胞マクロファージにおける亜硝酸塩産生量、NF- κ B の活性、TNF- α の細胞内シグナル
23 伝達物質 (PI3K (phosphoinositide 3-kinase) /PKB (protein kinase B)、p44/42、MAPK、Cav
24 (caveolin) -1) の発現・活性などを検討した。O₃ を曝露した野生型マウスでは、肺胞マク
25 ロファージにおける p44/42 MAPK、PI3K/PKB の発現の一時的、急速な増大が認められた。
26 Cav-1 は p44/42 MAPK、PI3K/PKB の発現をネガティブに調節する膜内外タンパク質の一つ
27 で、野生型マウスでは、肺胞マクロファージにおける発現は O₃ 吸入曝露により下方制御さ
28 れたが、TNF- α 欠損マウスでは O₃ 曝露による変化は認められなかった。以上 の結果によ
29 り、NF- κ B の活性を介する TNF- α のシグナル伝達は O₃ の毒性における炎症性遺伝子発現
30 を制御する重要なプロセスであり、Cav-1 の関与が示唆された。

31

32 Inoue *et al.* (2008)は、メタロチオネインによる抗炎症作用について調べるため、野生型
33 C57BL/6 マウス、メタロチオネイン欠損マウス (MT (-/-)、C57BL/6 へ 6 世代戻し交配)
34 に清浄空気又は 0.3 ppm の O₃ を 65 時間連続で全身吸入曝露させた。曝露終了直後にマウ
35 スを屠殺し、BALF 中の細胞数の計測、BALF 中のタンパク質濃度、肺におけるサイトカ
36 イン、ケモカイン濃度の測定、mRNA 発現の定量、電子顕微鏡観察による多形核白血球浸

(案)

1 潤の準定量化を行った。メタロチオネイン欠損により、肺における炎症や血管透過性の亢
2 進が増悪した。また、メタロチオネイン欠損マウスにおいて、O₃曝露による BALF 中の IL-6
3 遺伝子の発現が野生型と比較して増加したが、IL-1β、KC、エオタキシンについては野生
4 型とメタロチオネイン欠損マウスで同程度であった。肺組織において酸化ストレスの指標
5 となる HO-1 (heme oxidase-1)、iNOS、8-oxo-dG (deoxyguanosine)、ニトロチロシンは、
6 O₃ 曝露したメタロチオネイン欠損マウスで野生型マウスよりも高かった。以上 の結果か
7 ら、メタロチオネインは O₃ による肺での酸化ストレスに対して、内皮や上皮の傷害を軽減
8 して抑制的に作用することがわかった。

9

10 Oslund *et al.* (2008)は、NK-1 (ニューロキニン-1: neurokinin-1) 受容体拮抗薬又は生理食
11 塩水で処理した雄の Wistar ラットに 1 ppm の O₃ を 8 時間、全身吸入曝露させた。対照群
12 として、生理食塩水による前処理を行ったラットにろ過空気を曝露させた (各群 8 匹)。曝
13 露終了の 8 時間後、BALF、肺組織を採取し、気管支の上皮・間質に遊走・浸潤する好中
14 球数、気管支上皮細胞の細胞死及び増殖 (修復) の程度、終末細気管支におけるカスパー
15 ゼ (caspase) 3 活性化等について調べた。その結果、O₃ 曝露により、気道上皮に傷害が認
16 められ、それは NK-1 受容体を介したものであった。O₃ 曝露によるカスパーゼ 3 の活性化
17 は認められなかったことから、O₃ 曝露によって生じた気管支上皮細胞の細胞死は非アポト
18 ーシス型のプログラム細胞死であることが示された。NK-1 受容体拮抗薬による前処理を
19 行うことで、上皮の傷害を防ぐことができたが、気道上皮に浸潤する好中球数には変化が
20 みられなかった。

21

22 Williams *et al.* (2008a)は、BALB/c マウス (雄、6~8 週齢、各群 6 匹) に対し、O₃ を曝露
23 する実験を行った。O₃ 曝露による気道反応性亢進や好中球増多の機構を検証するため、環
24 境ストレスに敏感な p38MAPK の関与に焦点をあて、その阻害剤である SD-282 を O₃ 曝露
25 前または曝露後に投与し、その影響を比較検討した。曝露群の構成は、(1) SD-282 低用
26 量 + 空気、(2) SD-282 低用量 + O₃、(3) SD-282 高用量 + 空気、(4) SD-282 高用量
27 + O₃、(5) 溶媒 + 空気、(6) 溶媒 + O₃ である。SD-282 は、O₃ 曝露前 1 時間、曝露後 8
28 時間、気道反応性測定 1 時間前の 3 回 (曝露 3 時間後観察のマウスは 1 回のみ) 投与した。
29 投与量は低用量: 30 mg/kg、高用量: 90 mg/kg で、強制経口投与 (対照には溶媒のみ投与)
30 した。O₃ 曝露濃度は 3 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響
31 を調べた。曝露後 3 時間 の BALF 中の総細胞数・細胞分画、肺組織の炎症性サイトカイン
32 発現・p38MAPK 活性、20~24 時間の BALF 総細胞数・細胞分画、気道反応性 (PC150: 肺
33 抵抗をベースラインから 150 % 増大させるアセチルコリン濃度) を観察し、影響を評価し
34 した。溶媒投与群では O₃ 曝露後の気道反応性は空気曝露と比べ亢進した。SD-282 投与は O₃
35 による気道反応性亢進を抑制し、その影響は高用量の方が大きかった。O₃ 曝露後、BALF
36 中総細胞数、好中球数は時間経過に伴い増加した。SD-282 は O₃ による総細胞数、好中球

1 増加を抑制し、その効果には用量依存性、時間依存性があり、曝露後 20~24 時間の高用量
2 SD-282 投与群で最大の影響がみられた。空気曝露と比較し、O₃ 曝露後の COX-2、IL-6、IL-1β、
3 MIP-1α の発現は増大した。COX-2、IL-6 は O₃ による発現増大が SD-282 により抑制された
4 が、IL-1β については高用量の SD-282 でのみ抑制された。p38MAPK リン酸化活性（リン
5 酸化 p38MAPK/総 p38MAPK）は O₃ 曝露によって増大し、SD-282 投与により用量依存的
6 に抑制された。以上、p38MAPK は、O₃ 曝露により誘導される気道反応性や好中球の増加
7 に関わり、p38MAPK の阻害が、O₃ 曝露による肺での炎症誘導を抑制する手段になること
8 が示された。

9
10 Williams *et al.* (2008b)は、BALB/c マウス（性別、年齢、匹数記載なし）に対し、O₃ を曝
11 露する実験を行った。使用したマウスの遺伝子型は、野生型、IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}（IL-4/13
12 二重欠損型）、IL-13Tg（IL-13 過剰発現型）である。曝露群の構成は、清浄空気群と O₃ 曝
13 露群で、実験 1: IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}、野生型を供試、実験 2: IL-13Tg と IL-13Wt を供試した。
14 曝露濃度 3 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。
15 曝露後 3 時間に BALF を採取した。また肺組織を採取し mRNA を抽出した。別のマウスに
16 ついて曝露後 20~24 時間に BALF を採取し、RL とアセチルコリンに対する気道反応性を
17 測定した。BALF（総細胞数、細胞種類ごとの細胞数、マクロファージ、好酸球、リンパ
18 球、好中球を特定、IL-6、KC レベル）、気道過敏（AHR）、肺組織中から抽出した mRNA
19 による遺伝子発現量を観察し、影響を評価した。T-helper cell Type 2 に由来するサイトカイン
20 である IL-4 と IL-13 が、O₃ 曝露による肺の反応を制御するか検証することを目的とした。
21 O₃ 曝露によって AHR が認められるが、IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}は、野生型と比較すると軽微であ
22 った。IL-13Tg は、野生型あるいは IL-13Wt と比較して AHR の程度が増した。O₃ 曝露は、
23 野生型マウスの BALF 中の総細胞数、好中球数、マクロファージ数を継時的に増加させ、
24 20~24 時間後には最大になった。IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}では、これら細胞の増加は緩和された。
25 IL-13Tg では、IL-13Wt と比較して BALF 中の好中球は O₃ 曝露によってより増加した。O₃
26 曝露は、IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}では IL-6 やケラチノサイトケモカインの mRNA の発現量を増加
27 させ、IL-13Tg では抑制的に作用した。マクロファージ炎症タンパク質（MIP-3α）/CCL20
28 遺伝子の発現は、O₃ 曝露後、野生型マウスでは増加した。野生型と比較すると、IL-13^{-/-}、
29 IL-4/13^{-/-}における MIP-3α/CCL20 遺伝子の発現は抑制された。なお、IL-13Tg ではその発
30 現は増加した。同様の発現パターンは、リポ多糖の刺激で誘導されるサイトカイン（LIX
31 /CXCL5/ENA-78）でも認められた。以上、IL-13 は、O₃ 曝露により誘導されるサイト
32 カインを介して気道反応性や好中球炎症を亢進すると考えられる。

33
34
35 Voynow *et al.* (2009)は、6~8 週齢の雄の野生型 C57BL/6J マウス及び NQO1（NAD(P)H:
36 キノン酸化還元酵素）欠損マウスにろ過空気又は 1 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露させ

1 た。曝露 24 時間後に気道抵抗のベースライン値及びメサコリン投与による変化を測定した。
2 また、曝露の直後又は 6、12、24、48 時間後、BALF 及び肺を採取し、BALF 中の総細胞
3 数、好中球数、KC 濃度、F2-イソプロスタノール濃度、肺における NQO1 タンパク質発現量、
4 NQO1 活性の経時的変化を検討した。NQO1 欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、O₃
5 曝露によって誘導される気道過敏性、好中球性気道炎症の低減、F2-イソプロスタノールや KC
6 の産生抑制がみられ、O₃ に対して耐性を示した。野生型マウスにおける NQO1 発現量及び
7 活性は O₃ 曝露によって変化しなかった。一方、NHBE (正常ヒト気管支上皮: normal human
8 bronchial epithelial) 細胞への O₃ の *in vitro* 曝露を行い、IL-8 mRNA 発現、F2-イソプロスタ
9 ノール産生量を調べた結果、NQO1 阻害により O₃ 誘発の IL-8 mRNA 発現、F2-イソプロスタ
10 ノール産生が抑制された。これらの結果は、O₃ 曝露による酸化ストレスには NQO1 が関与する
11 ことを示している。

12

13 Williams *et al.* (2009)は、BALB/c マウス (雄、6~8 週齢、各群 5~10 匹) に対し、O₃ を
14 曝露する実験を行った。O₃ 曝露が COPD やぜん息患者の症状を悪化させることから、O₃
15 曝露により誘導される気道反応性や炎症の誘導に肺リモデリングや炎症に関わることが報
16 告されているカテプシン S の関与について検証した。阻害剤として Compound A を用いた。
17 曝露群の構成は、(1) Compound A + 空気、(2) Compound A + O₃、(3) 溶媒 + 空気、(4)
18 溶媒 + O₃ である。曝露濃度 3 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急
19 性影響を調べた。曝露後 3 時間、20~24 時間、48 時間の BALF 中の総細胞数、細胞分画、
20 上清サイトカイン、Cathepsin S 活性、気道反応性 (PC100: 肺抵抗をベースラインから
21 100 %増大させるアセチルコリン濃度。曝露後 24 時間のみ) を観察し、影響を評価した。
22 Compound A は O₃ 曝露前 2 日、1 時間、曝露後 6 時間、16~18 時間に強制経口投与した。
23 対照には溶媒のみ投与した。O₃ 曝露はカテプシン S、気道反応性、BALF 中の炎症性細胞
24 数を増加した。Compound A 投与マウスは O₃ 曝露による気道反応性亢進や好中球増多から
25 防御された。溶媒投与マウスでは O₃ 曝露により曝露後 3 時間、20~24 時間の IL-6、IFN- γ 、
26 20~24 時間の TNF- α が空気曝露と比較し増大した。O₃ による曝露後 3 時間、20~24 時間
27 の IL-6、20~24 時間の TNF- α の増大は Compound A 投与により抑制されたが、IFN- γ につ
28 いては Compound A による影響はなかった。これらの結果から、カテプシン S は O₃ 曝露に
29 による気道反応性や好中球の浸潤機構を制御することが示され、カテプシン S が酸化性スト
30 レスによる気道反応性や炎症を抑制する標的になる可能性を示唆した。

31

32 Backus *et al.* (2010)は、IL-10^{+/+} (C57BL/6) マウスおよび IL-10^{-/-} (B6.129P2-IL-10^{tm1Cgn/J})
33 マウス (雄、6~8 週齢、n = 8 で実験項目により n = 3~5 もある) に対し、O₃ を曝露する
34 実験を行い、O₃ 曝露による肺での炎症反応の誘導における IL-10 の防御機構について検証
35 した。曝露濃度 0.3 ppm で 24、48、72 時間 (23.5 時間/日)、吸入による曝露を行い、呼
36 吸器への急性影響を調べた。曝露終了直後の BALF 細胞所見・総タンパク濃度、組織病理、

(案)

1 BALF 中 MIP-2 (マクロファージ炎症タンパク 2) 濃度、Socs3 発現、NF- κ B・STAT3 活性、
2 遺伝子発現プロファイルを観察し、影響を評価した。O₃ 曝露後の IL-10 欠損 (*IL-10^{-/-}*) マ
3 ウスの BALF 中 PMN 数はすべての時点において野生型 (*IL-10^{+/+}*) よりも著しく高かった。
4 また NF- κ B の DNA 結合活性を示す転移も欠損型マウスの方が高くなっていった。遺伝子発
5 現解析から MIP-2、カテプシン E、血清アミロイド A3 などの IL-10 依存性、O₃ 依存性メデ
6 イエーターがあることが示された。これらの結果から、IL-10 は O₃ 曝露により誘導される
7 肺好中球性炎症と細胞増殖に対する防御機能を持っていることが分かった。また、IL-10
8 が自然免疫および獲得免疫の調節において関わる標的遺伝子と 3 つの反応経路も同定され
9 た。この O₃ 誘導性肺炎の防御機構における新たなメカニズムは O₃ の影響を受けやすい
10 人々の治療ターゲットとなるであろう。

11

12 Damera *et al.* (2010) は、BALB/c マウス (雄および雌、6~7 週齢、5 匹/群) に対し、O₃
13 を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) /MANS/
14 BIO-11000/BIO-11006/RNS のうちのどれかを投与したもの (O₃ 曝露前に MARCKS
15 (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) 阻害ペプチドの MANS、BIO-11000、BIO-11006、
16 または対照ペプチド (RNS、ミリスチン酸) 1 mM、対照として溶媒 (PBS) のみ 25 μ L
17 を気管内投与) に、O₃/清浄空気のどちらかを曝露したものである。O₃ の曝露濃度を 100
18 ppb で単回、4 時間吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。O₃ 曝露終了後 1
19 時間の BALF 中総細胞数、細胞分画、サイトカイン (TNF、IFN- γ 、IL-6、KC)、細胞生存、
20 肺組織学的観察・炎症規模スコアを観察し、影響を評価した。炎症反応誘導にかかわる PKC
21 や MAPK の基質である MARCKS の阻害ペプチド投与による O₃ 曝露による炎症の誘導抑
22 制について検証した。O₃ 曝露により BALF 中の KC、IL-6、TNF 量は増加し、好中球数も
23 増加したが、IFN- γ には差は認められなかった。O₃ 曝露による KC、IL-6 分泌誘導は、阻
24 害ペプチドを気管内投与すると抑制された。O₃ 曝露による TNF 増加は MANS、BIO-11006
25 投与により抑制されたが、BIO-11000 では抑制されなかった。O₃ 曝露による好中球の増加
26 においても同様であった。以上、O₃ 曝露による好中球やサイトカイン、ケモカインの産
27 生増加が MARCKS の阻害ペプチド投与により抑制されることが示された。

28

29 Garantziotis *et al.* (2010) は、O₃ 曝露による気道過敏性の惹起に、ヒアルロン酸が内因性の
30 TLR4 のリガンドとして働くかどうかを検討した。6~8 週齢の雄の C57BL/6J マウス及び
31 TLR4 欠損マウスに、ろ過空気又は 2 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露、又は低分子のヒ
32 アルロン酸又は溶媒を気管内投与し、気道過敏性の測定を行い、その後、肺の炎症、傷害
33 について調べるため、BALF 中の総タンパク質、KC (keratinocyte-derived chemokine)、TNF- α 、
34 IL-1 β 、IL-6、MCP-1、可溶性ヒアルロン酸の濃度の測定、肺組織の免疫組織学的検討を行
35 った。O₃ を曝露させた TLR4 欠損マウスと C57BL/6J マウスの細胞炎症、肺の傷害、可溶
36 性ヒアルロン酸濃度は同程度であったが、O₃ あるいはヒアルロン酸を曝露させた TLR4 欠

1 損マウスは気道過敏性の惹起が抑制された。O₃ あるいはヒアルロン酸を曝露した後の
2 BALF 中の炎症性サイトカインは TLR4 依存性を有し、類似のパターンを示していた。O₃
3 曝露は肺のマクロファージの TLR4 の発現を増加させた。in vitro で骨髄由来のマクロファ
4 ージにヒアルロン酸を曝露すると、NF-κB や炎症性のサイトカイン類産生が TLR4 依存的
5 に誘導された。以上 の結果から、細胞外マトリックスのヒアルロン酸が O₃ 曝露による気
6 道疾患に関与していること、炎症性サイトカインの産生や O₃ 曝露による気道過敏性の惹起
7 への介在によるヒアルロン酸への生物学的反応に TLR4 が寄与していることが裏付けられ
8 た。

9

10 Vasu *et al.* (2010)は、α トコフェロール転写タンパク (ATTP) 遺伝子を有する ATTP^{+/+}と、
11 ATTP が欠損した ATTP^{-/-}雄の C57BL/6 マウスに対し、O₃ を曝露する実験を行った。4 週齢
12 のマウスを 35IU/kg 酢酸トコフェロールを添加した標準食によって 8~12 週間飼育し、12
13 ~14 週齢で O₃ を曝露した。匹数は n = 8 (肺胞洗浄、mRNA 各 n = 4) である。曝露群の構
14 成は、ATTP^{+/+}と ATTP^{-/-}に対して清浄空気群と O₃ 曝露群があり、計 4 群である。曝露濃度
15 0.5 ppm で 6 時間/日で 3 日間連続、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。
16 曝露終了直後の血漿、肝臓、肺組織の α トコフェロール (AT)、血漿中の NO 生産、BALF
17 中の総タンパクと細胞数、肺組織の遺伝子発現解析から、影響を評価した。ATTP^{+/+}と ATTP^{-/-}
18 マウスの血漿、肝臓、肺組織の AT を比較すると、ATTP^{-/-}で 10~20 倍低かった。O₃ 曝露に
19 よって ATTP^{+/+}の血漿、肝臓、肺の AT は激減したが、ATTP^{-/-}は肝臓の AT だけが低下した。
20 O₃ 曝露で BALF 中の総タンパクと細胞数は増加したが、ATTP^{-/-}で細胞数増加が著しかった。
21 O₃ 曝露により肺の遺伝子発現が変化した遺伝子は、ATTP^{+/+}で 99 遺伝子、ATTP^{-/-}マウスで
22 52 遺伝子、共通していた遺伝子は 22 遺伝子であった。O₃ 曝露によって細胞増殖や DNA
23 修復、炎症-免疫反応に関する遺伝子の発現増加がみられた。O₃ 曝露に敏感に反応する
24 Timp1、Areg、Birc5、Tnc の遺伝子発現は AT 量に依存して影響が認められることが示され
25 た。

26

27 Bauer *et al.* (2011)は、C3H/HeJ マウス (Hej、Tlr-4 変異)、C3H/HeOuJ (OuJ、Tlr-4 正常)、
28 Hsp-70^{+/+}マウス (B6-Hspa1a/Hspa1b^{miDix}/NIEHS)、Hsp-70^{-/-}マウス (C57BL/6J) に対し、O₃
29 を曝露する実験を行った。使用したマウスは雄で、年齢は 6 週齢、匹数は n = 3~7 で測定
30 項目により異なる。曝露濃度 0.3 ppm で 6、24、48、72 時間 (23.5 時間/日)、吸入による
31 曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露終了直後の BALF 中の炎症因子、トラン
32 スクリプトーム解析、HSP70 遺伝子発現・免疫染色、組織病理を観察し、影響を評価した。
33 TLR4 を介した経路が O₃ 曝露後の肺での反応に関与していることを C3H/HeJ (Hej、Tlr-4
34 変異) マウスと、C3H/HeOuJ (OuJ、Tlr-4 正常) マウスを用いて分子レベルで検証した。
35 0.3 ppm O₃ 誘導性 TLR4 シグナル経路は OuJ マウスでは Myd88 タンパク依存性および非依
36 存性経路を通して活性化され、下流にも多くの経路が存在していた。ゲノム規模での転写

1 解析から O₃ 曝露した HeJ、対照群 HeJ および OuJ に比べ、O₃ 曝露した OuJ マウスにおい
2 て、反応が亢進していた HSP70 などを含む遺伝子の一団を特定した。さらに、HSP70 欠損
3 マウスと HSP70 正常マウスに O₃ 曝露して HSP70 の関与を調べると、HSP70^{-/-}マウスでは
4 O₃ 誘導性炎症、Myd88 亢進反応、ERK1/2、AP-1 活性、KC タンパクで HSP70^{+/+}マウスよ
5 りも著しく減少していた。これらの結果から、HSP70 は TLR4 の下流に存在し、O₃ 誘導性
6 肺炎症の制御に関わるエフェクター分子であることが考えられた。これらの発見は環境汚
7 染物質への曝露による炎症性疾患の治療および予防に貢献すると考えられる。

8
9 Chou *et al.*(2011)らにより、疫学は大気汚染物質への曝露と小児喘息との因果関係を裏付
10 けているが、そのメカニズムは不明である。著者らは、オゾン曝露がアレルゲン感作され
11 た幼児アカゲザルの気道における CD25+リンパ球の解剖学的分布を変化させる可能性が
12 あることを以前に報告した。本研究ではオゾンがアレルゲン感作乳児の気道への好酸球の
13 輸送にも影響を与える可能性があると仮定し、検証した。オゾンとハウスダストダニ (HDM)
14 エアロゾル曝露を繰り返した生後 3 か月のサル血液、洗浄液、気道粘膜の好酸球を測定
15 した。また、オゾン曝露におけるエオタキシンファミリーのメンバー (CCL11、CCL24、
16 CCL26) と好酸球の分布との関連性の有無を判断した。気管支洗浄液では、オゾン、HDM、
17 およびオゾンと HDM の両方に曝露された群において好酸球数が増加した。オゾン+HDM
18 群は、洗浄液中の CCL24 および CCL26 タンパク質の増加を示したが、CCL11、CCL24、
19 および CCL26 の濃度は、すべての曝露群の好酸球数とは相関は無かった。気道粘膜では、
20 HDM 単独の曝露群で好酸球が増加し、オゾン曝露群およびオゾン+HDM 曝露群では好酸
21 球は減少していた。CCL26 の mRNA および蛍光免疫染色は、HDM 単独曝露群の気道粘
22 膜において増加し、好酸球数と相関していた。オゾン+HDM 曝露群では、CCL24 の mRNA
23 と蛍光免疫染色は CCR3mRNA とともに増加したが、気道粘膜の好酸球数との相関はなか
24 った。これらの結果は、オゾン曝露が、HDM を介した経路とは異なる気道好酸球遊走の
25 特性をもたらすことを示している。CCL24 は、オゾンと HDM の複合曝露によってのみ誘
26 導されることがわかったが、発現は気道粘膜内の好酸球の存在とは関連していなかった。

27
28 Hulo *et al.* (2011)は、マウスにおける急性オゾン曝露が肺胞液排出能を損ない、肺組織の
29 過酸化亜硝酸産生を増加させ、過酸化亜硝酸が代謝経路と細胞ストレスへの応答を調節す
30 る 5'-AMP 活性化キナーゼ (AMPK) を活性化するかどうかを検証した。また、マウスに
31 おいて AMP 活性化プロテインキナーゼ $\alpha 1$ サブユニットの喪失が、オゾン曝露が誘発する
32 酸化ストレスと肺損傷の増強を妨げるか検証した。対照および AMPK $\alpha 1$ 欠損マウスは、ガ
33 ラスケージ内で 2.0 ppm の濃度のオゾンに 3 時間曝露された。評価はオゾン曝露から 24 時
34 間後に行われた。肺胞液排出能 (AFC) は、フルオレセインイソチオシアネート標識アル
35 ブミンを用いて評価した。細胞数、総タンパク質量、サイトカイン濃度、ミエロペルオキ
36 シダーゼ活性、および酸化ストレスのマーカー、すなわちマロンジアルデヒドおよび過酸

(案)

1 化亜硝酸は、気管支肺胞洗浄(BAL)および肺ホモジネート(LH)で測定した。AMPK-Thr172
2 リン酸化レベルと側底膜 Na (+) -K (+) -ATPase の存在量はウエスタンブロットによって
3 測定を行なった。解析の結果、対照マウスにおいて、オゾン曝露は BAL 中の白血球数とタン
4 パク質濃度の増加および LH のミエロペルオキシダーゼ活性と炎症誘発性サイトカイン
5 レベルの増加を示し、肺の炎症を誘発した。オゾン曝露の対照マウスから得られた LH から、
6 過酸化亜硝酸レベルの増加 (3 vs 4.4 nM, $p=0.02$) およびマロンジアルデヒド濃度の
7 増加 (110 vs 230 $\mu\text{mole} / \text{g}$ 湿組織) が検出した。対照マウスのオゾン曝露はリン酸化
8 AMPK-Thr172 の総 AMPK 比は一貫して 80%増加した。オゾン曝露は対照マウスにおいて、
9 AMPK α 1 欠損マウスでは発生しなかった、AFC および側底膜における Na(+)-K(+)-ATPase
10 量の増加を引き起こした。以上の結果より、著者らは AMPK の活性化がオゾンによって
11 誘発される AFC、炎症、および酸化ストレスの増加に関与していることを示唆していると
12 し、AMPK 経路がオゾン誘発性肺損傷の予防の新しいアプローチをどのようにもたらすの
13 か理解するためには、さらなる研究が必要であるとした。

14
15 Tighe *et al.* (2011)は、C57BL/6 マウスと CX3CR1 欠損マウス (CX3CR1^{GFP/GFP})、
16 CX3CR1^{+GFP}、CCR2^{-/-}マウス (雌、6 ~ 10 週齢) に対し、O₃ を曝露する実験を行った。匹
17 数は各群 14 ~ 18 匹 (フローサイトメトリーに 6 ~ 8 匹、ラベルに 8 匹、AHR に 4 ~ 6 匹)
18 である。曝露群の構成は、それぞれの遺伝子型のマウスにつき清浄空気群と O₃ 曝露群であ
19 る。曝露濃度 2 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べ
20 た。曝露後 24 時間の肺マクロファージ表面マーカーと遺伝子発現、気道反応性 (RT)、BALF
21 中の総細胞数、細胞分画、BALF 上清の 8-イソプロスタニン、カルボニル化タンパク質、サ
22 イトカイン発現を観察し、影響を評価した。O₃ 曝露によって肺に Gr-1 が高発現のマク
23 ロファージ (Gr-1 Macs) が増加し、この Gr-1 Macs は O₃ 曝露により CX3CR1 と MARCO の
24 発現が増加した。Gr-1 Macs は O₃ 曝露により NQO1 mRNA 発現の増大と HO-1、SOD-1
25 mRNA 発現の低減が認められた。C57BL/6 マウスと CCR2 欠損マウスでは O₃ 曝露後の Gr-1
26 Macs 数に差が認められなかった。また、肺胞マクロファージを蛍光ラベルしたところ、
27 Gr-1 Macs もラベルされたことから、O₃ 曝露後の Gr-1 Macs は肺胞マクロファージ由来で
28 あることが示唆された。Gr-1 Macs の割合は O₃ 曝露により C57BL/6 マウスに比べて
29 CX3CR1^{GFP/GFP} で低く、CX3CR1 が Gr-1 Macs 成熟に重要であることが示唆される。BALF
30 中の CX3CL1 発現は CX3CR1^{+GFP} では O₃ 曝露による増大がみられ、CX3CR1^{GFP/GFP} 型では
31 空気曝露、O₃ 曝露ともに多かった。O₃ 曝露により CX3CR1 欠損マウスは野生型より気道
32 反応性が亢進した。O₃ 曝露により CX3CR1 欠損マウスは野生型より肺胞洗浄液中の総細胞
33 数や好中球、サイトカインの増加、8-イソプロスタニンやカルボニル化タンパク量の増加が
34 みられたが、タンパク量には差がみられなかった。以上の結果は O₃ 曝露によりマク
35 ロファージに発現する CX3CR1 が O₃ 曝露による炎症や気道反応性を抑制することを示すもの
36 である。

1
2 Kasahara *et al.* (2012)は、オゾンへの長期(48-72 時間)低用量(0.3ppm)曝露によって引き起
3 こされる肺炎症におけるアディポネクチンの役割を調べるため、アディポネクチン欠損
4 (Adipo-/-)および野生型マウスをオゾンまたは室内空気に曝露した。野生型マウスでは、オ
5 ゾン曝露により総気管支肺胞洗浄(BAL)液中のアディポネクチンが増加した。野生型マウ
6 スと比較して、Adipo-/-マウスでは、オゾンは、BAL 好中球、タンパク質(肺損傷の指標)、
7 IL-6、KC、LIX および G-CSF を増加し、含む肺炎症を誘発し。また、オゾン曝露により、
8 野生型マウスと比較し、Adipo-/-マウスにおいて IL-17A mRNA の発現誘導が認められた。
9 さらに、対照の抗体と比較して、抗 IL-17A 抗体は、Adipo-/-マウスでオゾン誘発により増
10 加する BAL 好中球および G-CSF を減少させたが、野生型マウスでは減少しなかった。こ
11 のことは、IL-17A が、G-CSF 放出を促進することにより、Adipo-/-マウスにおける好中球
12 の増加に寄与すること示唆している。肺細胞のフローサイトメトリー分析法により、オゾ
13 ン曝露後、IL-17A を発現する CD45+/F4/80+IL-17A+マクロファージおよび $\gamma\delta$ T 細胞の数は、
14 野生型マウスにおいて増加し、Adipo-/-マウスではさらに増加することが明らかとなった。
15 IL-17+マクロファージは CD11c-(間質性マクロファージ)であったのに対し、CD11c+マクロ
16 ファージ(肺胞性マクロファージ)は IL-17A を発現しなかった。これら結果は、アディポネ
17 クチンが、オゾンへの長期・低濃度曝露による間質マクロファージおよび/または $\gamma\delta$ T 細胞
18 における IL-17A の誘導および/または動員を阻害することによって、好中球の動員より保
19 護するという仮説と一致した。

20
21 Martinez-Campos *et al.* (2012)は、急激な運動によって引き起こされる酸化ストレスは、慢
22 性的な運動によって軽減されることから、O₃によって生じる酸化ストレスを軽減するかと
23 うかを調べた。パイロット実験として、10 週齢の雄の Wistar ラットに有酸素運動 (1 日 90
24 分泳ぐように訓練)を実施した。訓練 3 週間後には、血漿中の還元型硝酸塩 (NO_x) の変
25 化により、運動への適応が確認された。その後、訓練を受けたラットに O₃ (0.5 ppm で 1
26 日 4 時間、運動の 1 時間前)を 2 週間曝露した。対照として、静止+ろ過空気曝露、静止
27 +O₃ 曝露、運動+ろ過空気曝露の組み合わせを実施した。実験終了時に、血漿中の NO_x、
28 8-イソプロスタン (8-IP)、マロンジアルデヒド (MDA)、スーパーオキシドディスムター
29 ゼ (SOD) 活性、およびカルボニル (CB) を測定した。CB はいずれの群でも変化しな
30 かった。O₃による酸化ストレスは、NO_x と SOD 活性の低下、8-IP と MDA の増加によ
31 て示された。運動は O₃ による影響を抑制したが、SOD については運動による低下も見られ
32 た。ただし静止+O₃ 曝露群ではより大きな低下が見られた。以上の結果から、有酸素運
33 動は O₃による酸化ストレスから保護し、その効果は SOD とは無関係であると結論づけた。

34
35 Sunil *et al.* (2012)は、肺胞マクロファージ (AM) の各表現型に対するオゾン誘発性酸化
36 ストレスの影響を分析した。ラットをオゾン (2 ppm、3 時間)に曝露すると、AM におい

(案)

1 て 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) およびヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)
2 の発現が増加した。8-OHdG は 24 時間で最大になったが、HO-1 の発現は 3 時間後と 48～
3 72 時間後に二相性の増加を示した。アポトーシスとオートファジーのマーカである切断
4 されたカスパーゼ-9 とベクリン-1 はオゾン曝露 24 時間後の AM において誘導された。こ
5 れは、気管支肺胞洗浄タンパク質および細胞の増加、ならびにマトリックスメタロプロテ
6 イナーゼ (MMP) -2 および MMP-9 と関連しており、肺胞上皮損傷を示している。オゾン
7 曝露は、転写因子 NFkB について二相性の活性化をもたらした。これは炎症誘発性マクロ
8 ファージのマーカである単球走化性タンパク質-1、誘導型一酸化窒素シンターゼおよび
9 シクロオキシゲナーゼ-2 の発現と相関があった。アルギナーゼ-1、Ym1 およびガレクチン
10 -3 陽性の抗炎症/創傷治癒マクロファージの増加も、オゾン吸入後 24 時間で始まり (アル
11 ギナーゼ-1、Ym1)、72 時間持続する (ガレクチン-3) かたちで肺で認められた。これは創
12 傷修復の重要なステップである、II 型細胞の増殖と活性化のマーカであるプロサーファ
13 クタントプロテイン C の発現増加と関連していた。これらの結果は、炎症誘発性/細胞毒
14 性マクロファージおよび抗炎症性/創傷治癒マクロファージの両方が、オゾン誘発性の酸化
15 ストレスおよび組織損傷への応答の初期に活性化されることを示唆している。

16

17 Xiang *et al.* (2012)は、オゾンストレスを受けた BALB/c マウスモデルの肺組織および急性
18 オゾンストレスを受けたヒト気管支上皮細胞 (HBEC) において CTNNAL1 の発現が増加
19 することを観察した。BALB/c マウスに 2 ppm の O₃ を 30 分/日で 0, 1, 2, 4, 8 日間曝露させ、
20 オゾンストレスを受けた BALB/c マウスモデルの肺組織および急性オゾンストレスを受け
21 たヒト気管支上皮細胞 (HBEC) において CTNNAL1 の発現が増加することを観察した。
22 HBEC において CTNNAL1 遺伝子の転写を調節する可能性のある DNA 結合タンパク質を
23 特定するために、電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) において CTNNAL1 プロモー
24 ターのさまざまな領域に対応する 8 つのオリゴヌクレオチドプローブを設計した。EMSA
25 および抗体スーパーシフトアッセイにより、CTNNAL1 プロモーター領域内において LEF-1、
26 AP-2 α および CREB をそれぞれ補充し得る 5 つの推定転写因子結合部位を検出した。クロ
27 マチン免疫沈降 (ChIP) アッセイにより、AP-2 α および LEF-1 が CTNNAL1 プロモーター
28 に補充されることを確認した。さらに、CTNNAL1 プロモーター内の推定 AP-2 および LEF-1
29 部位の機能を解析するために、pGL3/FR/luc 内のそれらの部位について部位特異的突然変
30 異誘発を行った。解析の結果、AP-2 α および LEF-1 部位の両方の変異体においてヒト
31 CTNNAL1 プロモーター活性の低下が認められた。LEF-1 および AP-2 α を標的とする ASO
32 による前処理は、オゾンストレスによって誘導される CTNNAL1 の発現を減少させた。
33 AP-2 α および LEF-1 の活性化とそれに続く CTNNAL1 発現は、16 時間の時間経過中に相関
34 を示した。以上の結果は、CTNNAL1 の強力な転写増加が急性オゾン誘発ストレス中に発
35 生し、少なくとも部分的には、ヒト CTNNAL1 プロモーターへのオゾンに誘導される LEF-1
36 および AP-2 α の補充に仲介されることを示唆する。

1

2 Yanagisawa *et al.* (2012)は、PrxI null (PrxI^{-/-}) および野生型 (WT) マウスを用いて、O₃
3 誘発性肺炎におけるペルオキシレドキシニン I (PrxI) の役割を調べた。PrxI は抗酸化因子
4 として知られており、toll 様受容体 4/NF- κ B シグナル伝達を活性化する強力な炎症誘
5 発性因子でもある。PrxI^{-/-} および WT の両方のマウスを 2 ppm の O₃ に 6 時間曝露し、酸
6 化ストレスと肺の急性炎症に対する反応を 18 時間後に評価した。O₃ 吸入は、0 時間と 4
7 時間後にそれぞれ、両側の肺で同程度に転写因子である核因子-赤血球 2 関連因子 2 (Nrf2)
8 を活性化させ、酸化ストレスの典型的なマーカーであるヘムオキシゲナーゼ-1 mRNA を増
9 加させた。O₃ 曝露による肺への好中球の浸潤の減少と、気管支肺胞洗浄液におけるインタ
10 ーロイキン-6やケラチノサイト化学誘引物質などの炎症誘発性メディエーターの産生の抑
11 制の程度から判断すると、WT マウスと比較して PrxI^{-/-}マウスにおいて誘発された肺炎症
12 は軽度であった。以上の結果は、PrxI は有害な脂質代謝物によって引き起こされる O₃ 誘
13 発性酸化的損傷に対する効果的な保護因子ではないが、O₃ 曝露後の肺炎症の開始に積極的
14 な役割を果たすことを示唆する。

15

16 Barreno *et al.* (2013)は、C57BL/6 マウス (雌、4~8 週齢、n=6~10) に対し、O₃ を曝露
17 する実験を行い、O₃ 曝露による肺での障害、炎症、気道反応性の亢進の過程でのオステオ
18 ポンチン (OPN) の関与について検証した。使用したマウスの遺伝子型は、野生型とオス
19 テオポンチン (OPN) 欠損型である。曝露濃度 2 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を
20 行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露後 6 時間、24 時間の BALF および血清中 OPN
21 レベル、肺胞マクロファージ中 OPN の局在、BALF 中細胞パラメーター、IL-6、IL-17、IP-10、
22 KC、MIP-2 レベル、メタコリン吸入後の気道抵抗 (Raw)・肺組織減衰率 (G)・肺組織エ
23 ラスタンス (H)、気道・肺血管のコラーゲン構成、BALF 中コラーゲン量を観察し、影響
24 を評価した。野生型マウスの BALF 中 OPN は O₃ 曝露によって増加したが免疫組織学的観
25 察の結果では OPN 陽性の肺胞マクロファージ数は対照群と変化がなかった。BALF 中の上
26 皮細胞数、タンパク量、好中球数は野生型と欠損型それぞれ対照群に比べ増加していたが、
27 好中球数は欠損型が野生型に比べ著しく少なかった。メサコリン吸入後の反応性亢進は野
28 生型の気道と肺実質でみられたが欠損型ではみられなかった。以上の結果から O₃ の急性
29 曝露により気腔 (air space, 呼吸細気管支から肺胞まで) で OPN が増加し O₃ 曝露により誘
30 導される肺炎症と気道 (Raw) および肺実質 (G・H) のメサコリン反応性亢進に対して機
31 能的に関わっていることを示している。

32

33 Cho *et al.* (2013)は、マウスに O₃ を亜急性で吸入曝露させ、気道影響における転写因子
34 Nrf2 の関与について調べた。Nrf2^{+/+}マウスと Nrf2^{-/-}マウス (n=3-12/群) に急性 (0.3 ppm
35 の O₃ を 6, 24, 48, or 72 hr)、亜急性 (2 ppm の O₃ を 3 hr 曝露させた後、室内空気で 3, 6,
36 24 hr 回復) で O₃ を曝露し、BAL および組織病理学的分析によって肺傷害を評価した。酸

1 化マーカーと粘液分泌を ELISA、Nrf2 及びその下流エフェクターの発現を RT-PCR および
2 ウェスタンブロットにより評価した。Nrf2+/+マウスでは、急性曝露、亜急性曝露いずれに
3 おいても、肺ホモジネート中の Nrf2 mRNA が増加した。また急性および亜急性曝露によ
4 り、Nrf2-/-マウスではNrf2+/+マウスよりと比較して、①BALF 中の乳酸脱水素酵素レベル、
5 好中球数、リンパ球数、上皮細胞数、総タンパク質、Muc5AC タンパク質が増加し、②肺
6 ホモジネート中の脂質過酸化とタンパク質の酸化が亢進し、③BALF 中の GSH の増加が抑
7 制され、④肺ホモジネート中の GPx2 mRNA、HO-1 mRNA、NQO1 mRNA の増加が抑制さ
8 れた。これらの結果は、Nrf2 欠損が O₃ によって引き起こされる酸化的ストレスおよび気
9 道炎症、気道障害を悪化させることを示唆している。

10
11 Groves *et al.* (2013)は、サーファクタントタンパク質D(Sftpd)欠損マウスを用いて、老化
12 による肺炎症と O₃ 曝露による影響の関連について調査した。C57BL/6J または Sftpd-/-マウ
13 ス (雄、8, 27, 80 週齢、n=3~6/群) に、0.8ppm の O₃ を 3 時間曝露した後、各種解析を行っ
14 た。O₃ 曝露による影響として、8 週齢の C57BL/6J マウスでは、O₃ 曝露により活性化され
15 たマクロファージの増加が観察されたが、Sftpd-/-マウスでは観察されなかった。また、
16 C57BL/6J マウスでは O₃ 曝露により、8 週齢と 27 週齢で肺粘性抵抗の増加が認められたが、
17 80 週齢では変化は生じなかった。弾性抵抗については、27 週齢でのみ O₃ 曝露群において
18 増加が認められたが、8 週齢と 80 週齢では差は認められなかった。8 週齢の Sftpd-/-マウス
19 では O₃ 曝露により BALF 中の細胞数およびタンパク質が増加したが、27 週齢および 80 週
20 齢では増加は見られなかった。8 週齢の Sftpd-/-マウスでは O₃ 曝露により BALF 中の細胞
21 数およびタンパク質が増加したが、27 週齢および 80 週齢では増加は見られなかった。こ
22 れらの結果は、若齢動物ほど O₃ 曝露による肺抵抗への影響が大きいことを示唆している。

23
24 Kasahara *et al.* (2013)は、過去の研究結果でアディポネクチン欠損マウス(Adipo-/-)におい
25 て、オゾンへの亜急性曝露後、肺に IL-17A 依存性好中球の蓄積が増加したことを報告して
26 いた(72 時間、0.3 ppm)。本研究は、このアディポネクチンの抗炎症効果が T-カドヘリンに
27 結合するアディポネクチンを必要とするかどうかを解明することを目的とした。野生型、
28 Adipo-/-、T カドヘリン欠損(T-cad-/-)、および 両欠損型(Adipo-/-/T-cad-/-)マウスを亜急性オ
29 ゾンまたは空気に曝露した。野生型マウスと比較して、T-cad-/-および Adipo-/-マウスで O₃
30 曝露による肺 IL-17A mRNA 発現の誘導が認められた。T-cad-/-マウスと比較して、
31 Adipo-/-/T-cad-/-マウスの IL-17A にこれ以上 の増加はなかった。すなわち、T-カドヘリン
32 へのアディポネクチン結合は、オゾン誘発 IL-17A 発現の抑制に必要であることが示される。
33 同様の結果が、IL-17A 発現を誘発する急性期タンパク質である saa3 の肺 mRNA 発現に関
34 しても得られた。また、遺伝子型間の肺組織学的切片の比較により、気管支枝ポイントに
35 おけるオゾン誘発性炎症性病変のアディポネクチン減衰が T-カドヘリンを必要とするこ
36 とが示された。BAL 好中球および G-CSF は T-cad-/-マウスで増加し、Adipo-/-/T-cad-/-マウ

1 スでさらに増えた。オゾンに曝露した *Adipo*^{-/-}マウスにおけるこれらの増加が IL-17A に部
2 分的に依存することを示したこれまでの知見を鑑みると、本研究結果は BAL 好中球および
3 G-CSF に対する T-カドヘリン欠乏症の影響は IL-17A の二次的な変化である可能性が高い
4 ことを示されるが、アディポネクチンも T-カドヘリン非依存性経路を介して作用すること
5 も示している。本研究により、オゾン誘発性肺炎症の全てではなく部分的な側面を抑制す
6 るため、アディポネクチンの機能に T-カドヘリンが必要であることを示された。

7
8 *Kummarapurugu et al. (2013)*は、NQO1 非存在下におけるオゾン曝露が、炎症を抑制させ
9 るシクロペンテノンイソプロスタンである A2-イソプロスタン生成の増加をもたらすかど
10 うかを検証した。6-8 週齢の雄の C57BL/6J および NQO1-null マウスに 1ppm の O₃ を 3 時間
11 曝露させたところ、GC-MS を使用した解析により、NQO1-null マウスではコンジェニック
12 野生型マウスと比較して、ベースラインとオゾン曝露後の両方で、J2-イソプロスタンおよ
13 び A2-イソプロスタンの前駆体である D2-イソプロスタンおよび E2-イソプロスタンの肺組
14 織レベルが高いことが明らかになった。正常なヒト気管支上皮細胞の初代培養において、
15 A2-イソプロスタンがオゾン誘発性 NF-κB 活性化と IL-8 調節を阻害することが確かめられ
16 た。さらに、*in vitro* において A2-イソプロスタンがオゾンの存在下で阻害性 κB キナーゼ
17 の活性 Cy179 ドメインを共有結合的に修飾することを証明され、NF-κB の A2-イソプロス
18 タンによる阻害の生化学的基礎が確立された。以上の結果は、宿主因子が肺における A2-
19 イソプロスタンの生成を調節することにより、オゾンに対する肺の感受性を調節する可能
20 性があることを示している。これらの知見は、NQO1 がオゾンに対する肺の感受性を調節
21 するという疫学的知見に生化学的基礎をもたらす。

22
23 *Verhein et al. (2013)*は、p38 と JNK MAPK のオゾン誘発気道過敏症への寄与について調べ
24 るため、モルモットを曝露 60 分前に p38 および JNK MAPK の二重阻害剤(30mg /kg、ip)
25 で前処置し、その後オゾン 2 ppm または濾過空気に 4 時間曝露した。1 日後、麻酔動物に
26 ついて気道反応性を測定した。曝露 1 日後、オゾンは気道過敏症を引き起こし、p38 およ
27 び JNK MAPK の遮断はオゾン誘発気道化反応性を完全に防止した。p38 および JNK MAPK
28 の遮断はまた、空気曝露動物における副交感神経活性を抑制した。よって、p38 と JNK
29 MAPK が気道副交感神経によるアセチルコリン放出に寄与することが示唆された。オゾン
30 は神経細胞 M2 ムスカリン受容体を阻害し、p38 と JNK の両方を遮断することにより M2
31 受容体機能障害が予防された。気管支肺胞洗浄への好中球の流入は、MAPK 阻害物質の影
32 響を受けなかった。p38 および JNK MAPK は、神経細胞 M2 受容体の機能障害の予防を含
33 む複数のメカニズムを通じてオゾン誘発気道過反応を媒介する。

34
35 *Kasahara et al. (2014)*は、*Adipo*^{-/-}マウスにおける IL-6 の上昇が、IL-17A 発現に及ぼす影
36 響を介してオゾンに対する増強反応に寄与するか検討した。11-13 週齢の雄雌マウス

1 (C57BL/6J、Adipo^{-/-}、Adipo^{-/-}/IL-6^{-/-}) に 0.3ppm のオゾン を 24、48、72 時間吸入曝露さ
2 せた。オゾン曝露マウスにおける気管支肺胞洗浄(BAL)好中球、IL-6、G-CSF、および肺 Il17a
3 mRNA 発現は、Adipo^{-/-}マウスにおいて野生型マウスよりも多かったが、Adipo^{-/-}と比較す
4 ると Adipo^{-/-}/IL-6^{-/-}マウスでは減少していた。また、オゾン曝露後の Adipo^{-/-}/IL-6^{-/-}マウス
5 では、Adipo^{-/-}マウスよりも IL-17A+ F4/80+ 細胞および IL-17A+ $\gamma\delta$ T 細胞についても減少
6 していた。野生型マウスに対して IL-6^{-/-}マウスで減少したのは BAL 好中球のみであった。
7 野生型マウスでは、IL-6 が Gr-1+F4/80-CD11c-細胞で発現したのに対し、Adipo^{-/-}マウスで
8 は F4/80+CD11c+細胞においても IL-6 が発現した。すなわち、IL-6 がこれらの肺胞マクロ
9 ファージにおけるアディポネクチンによって制御されることを示唆している。トランスク
10 リプトーム解析により、野生型と比較して Adipo^{-/-}マウスにおけるオゾンによって最も差
11 欠的に増強された遺伝子として IL-17A 発現を促進する血清アミロイド A3(Saa3)を同定し
12 た。オゾン曝露後、Saa3 mRNA 発現は野生型より Adipo^{-/-}マウスで著しく大きかったが、
13 Adipo^{-/-}マウスよりも Adipo^{-/-}/IL-6^{-/-}マウスでは減少していた。これら結果は、オゾン曝露
14 後の Adipo^{-/-}マウスで観察された過炎症状態において IL-6 が極めて重要な役割を担うこと
15 を示している。そして、IL-6 は Saa3、IL-17A、および G-CSF の誘発に関わることを示唆
16 している。

17
18 Theis *et al.* (2014)は、O₃ の吸入曝露が肝臓に与える影響を調べた。Sprague-Dawley ラッ
19 ト (雄、n=6/群) に 0.5 ppm O₃ を 8 時間/日で 5 日間曝露し、血漿中の肝臓由来酵素と肝臓
20 のタンパク質の増減を解析した。血漿中の肝臓由来酵素の測定結果からは、O₃ 曝露による
21 肝細胞死は確認されなかった。肝臓におけるプロテオーム解析および質量分析では、O₃ 曝
22 露による複数のストレス応答性タンパク質の顕著な増減が確認された。増加が認められた
23 タンパク質としては、Glucose-regulated protein 78 及び Protein disulfide isomerase があり、減
24 少が認められたタンパク質としては Glutathione S-transferase mu1 があつた。対照的に、Heme
25 oxygenase-1 または CytochromeP450 2E1 および 2B については変化は検出されなかった。こ
26 れらの結果は、O₃ の吸入曝露が肝臓中の特定のタンパク質の発現を変化させることを示
27 唆している。

28
29 Barker *et al.* (2015)は、特に、マウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)における IL-1 β 、NGF、
30 および SP レベルに対する O₃ の影響と、これらのメディエーターが *in vivo* の炎症性神経細
31 胞カスケードに関連する可能性があるかどうかに関心を当て研究を行った。8 週齢の雄の
32 ICR マウスに 2ppm の O₃ を 3 時間曝露させ、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の IL-1 β 、NGF、
33 および SP レベルに対する O₃ の影響と、これらのメディエーターが *in vivo* の炎症性神経細
34 胞カスケードに関連する可能性を評価した。解析の結果、*in vivo* O₃ 曝露により BALF 中タ
35 ンパク質の 3 つ全てに誘導が増加したことが示された。また、NGF および SP の両方にお
36 ける O₃ の誘発による増加は、炎症性サイトカイン IL-1 β によって媒介されることが示され

1 た。さらに、NGF の阻害は、肺 BALF および肺組織の両方の SP の O₃ 誘発増加を減少させ、
2 NGF が SP に対する IL-1 β 作用のメディターとして働くことが示された。これらデータは、
3 IL-1 β が *in vivo* マウスにおける NGF およびそれに伴う SP 放出における O₃ の誘発による増
4 加の初期メディターであることを示すものである。

5
6 Gabehart *et al.* (2015)は、オゾン曝露における年齢の影響を調査するとともに、出生後の
7 発達期間中のオゾン曝露に対する肺の反応における toll-like 受容体 4 (TLR4) の役割を明
8 確にするためにマウスを用いた実験を行った。雌マウス (1~6 週齢) をオゾン (1 ppm)
9 またはろ過空気に 3 時間曝露した。分析は、肺透過性、気道好中球増加症、抗酸化因子と
10 ケモカインの発現、および粘液産生への影響を評価するために、曝露完了後 6 時間と 24
11 時間に実施された。TLR4 の役割は発生中の肺における TLR4 の発現を調べ、*tlr4* 欠損マウ
12 スのオゾンに対する応答を精査することによって明らかにされた。メタロチオネイン-1、
13 カルシトニン遺伝子関連産物、およびケモカイン C-X-C リガンド (CXCL) 5 は、発達の
14 期間中ずっとオゾンによって発現が誘導された一貫したマーカーだった。成体と比較して、
15 新生児は肺の TLR4 発現レベルが低く、粘液産生の増加に反応し、アルブミン漏出と好中
16 球の気道への流入の減少、CXCL1 ケモカインおよび CXCL2 ケモカインの発現低下を特徴
17 とするオゾンに対する反応の減弱を示した。*tlr4* 欠損マウスにおける応答試験は、アルブ
18 ミン漏出または粘液産生ではなく、オゾンを介した気道好中球増加症が TLR4 に依存して
19 いることを示した。以上 の結果は、オゾンへの応答が年齢によって決定され、部分的に
20 TLR4 シグナル伝達に依存することを示している。新生児におけるオゾンに対する肺の反
21 応性の低下は、肺の TLR4 発現が不十分であることが少なくとも部分的に原因となった可
22 能性がある。

23
24 Mathews *et al.* (2015)は、代替活性化 M2 マクロファージ誘導における $\gamma\delta$ T 細胞の役割と
25 オゾン曝露後の炎症の消失について調べた。野生型もしくは $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウス (TCR δ -/
26 マウス) を空気もしくはオゾン (最大 72 時間、0.3ppm) に曝露し、曝露終了直後または 1、3、
27 または 5 日後に安楽死させた。WT マウスでは、M2 マクロファージはオゾン曝露の過程で
28 肺に蓄積した。Arg1、Retnla、および Clec10a などの M2 遺伝子の肺 mRNA 存在量もオゾ
29 ン曝露後に増加した。これに対し、TCR δ -/
30 マウスでは TCR δ -/
31 マウスではなく WT マウスにおいてのみオゾン曝露後に M2c 分極化サイトカイン IL-17A
32 が発現した。IL-17A 中和抗体で処置した WT マウスでは、オゾン誘発 M2 遺伝子発現が減
33 弱した。WT マウスでは、気管支肺胞洗浄液中の好中球およびマクロファージのオゾン誘
34 発による増加は、オゾン曝露停止後に迅速に回復し、3 日以内に空気曝露レベルに戻った。
35 しかし、TCR δ -/
36 マウスにおける M2 マクロファージの欠如は、オゾン曝露停止後の炎症細
胞のクリアランスの遅れと、肺におけるアポトーシスマクロファージの蓄積の増加と関連
していた。TCR δ -/
マウスでは正常な肺の構造の回復遅延も観察された。すなわち、 $\gamma\delta$ T 細

(案)

1 胞がオゾン誘発炎症の消失に必要であることが示された。 $\gamma\delta$ T 細胞は、IL-17A の分泌を通
2 じて、アポトーシス細胞のクリアランスを促進するマクロファージ分極の変化に寄与する
3 からであると考えられる。

4
5 Sunil *et al.* (2015)は、オゾンに対する肺マクロファージの応答における Gal-3 の役割につ
6 いて解析した。WT および Gal-3^{-/-}マウスを空気または 0.8 ppm のオゾンに曝露 (3 時間)
7 してから 24-72 時間後に、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液および肺組織を採取した。WT マウ
8 スにおいて、オゾン吸入は肺における炎症誘発性 (Gal-3⁺, iNOS⁺) マクロファージ数お
9 よび抗炎症性 (MR-1⁺) マクロファージ数の増加をもたらした。Gal-3^{-/-}マウスではオゾン
10 による iNOS⁺マクロファージの蓄積は減弱したが、MR-1⁺マクロファージ増加の増大が
11 認められた。これは、BAL 中のマクロファージの増加と相関していた。フローサイトメト
12 リー解析は、これらの細胞が CD11b⁺であり、主に (> 97%) 成熟 (F4/80⁺CD11c⁺) 炎症
13 誘発性 (Ly6G⁺Ly6Chi) マクロファージおよび抗炎症性 (Ly6G⁺Ly6Clo) マクロファージか
14 らなることを示した。オゾン吸入後、両方のマクロファージ亜集団の増加が観察された。
15 Gal-3 の喪失は、Ly6Clo マクロファージに影響を与えることなく、Ly6Chi マクロファージ
16 の減少をもたらした。CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺顆粒球 (G) および単球 (M) 骨髄由来サプレ
17 ッサー細胞 (MDSC) も、オゾン後の肺で確認された。Gal-3^{-/-}マウスでは、オゾンに対
18 する G-MDSC の応答は弱められ、一方で M-MDSC の応答は高められた。オゾン処理され
19 た Gal-3^{-/-}マウスの肺における炎症性細胞集団の変化は、シトクロム b5 発現によって評価
20 された組織損傷の減少と相関があった。これらのデータは、オゾン曝露後の肺において
21 Gal-3 が炎症誘発性マクロファージの蓄積と毒性を促進する役割を果たすことを示してい
22 る。

23
24 Verhein *et al.* (2015)は、Notch3 と Notch4 がオゾン誘発肺炎症に対する感受性の重要な決
25 定因子であると仮定し、野生型(WT)、Notch3 ノックアウトマウス(Notch3^{-/-})、Notch4 ノッ
26 クアウトマウス(Notch4^{-/-})をオゾン(0.3 ppm)またはろ過空気に 6~72 時間曝露した。空気
27 に曝露したコントロールに対して、オゾン曝露により、全ての遺伝子型マウスで肺透過性
28 マーカーである気管支肺胞洗浄液(BALF)タンパク質が増加した。とりわけ、Notch4^{-/-}マウ
29 スにおいて、WT や Notch3^{-/-}よりも濃度が高かった。オゾン曝露後、全肺 TnF の発現は、
30 Notch3^{-/-}および Notch4^{-/-}マウスで増加した。特に WT に対し、Notch3^{-/-}が高かった。トラ
31 ンスクリプトーム解析では、オゾン曝露後、WT とノックアウトマウスの間で遺伝子ネッ
32 トワークの違いが同定され、インフラマソームパスウェイのメンバーである Trim30 とイン
33 フラマソームシグナル伝達メンバーである Traf6 が含まれた。これらの新しい知見は、
34 Notch3 および Notch4 がオゾン誘発性肺損傷の感受性遺伝子であるとの仮定を裏付けるも
35 のであり、Notch 受容体が自然免疫炎症から防御することが示唆される。

36

1 Ward *et al.* (2015)は、急性オゾン誘発性の肺傷害および炎症が、ラットでよく特性を明ら
2 かにされている。しかしながら、関与する経路のメカニズムの理解は限られていることか
3 ら、オゾンに急性曝露されたラットでは転写に変化が起こり、この変化の網羅的解析が肺
4 傷害と炎症のメカニズムをよりよく理解することを可能にするという仮説を立てた。雄の
5 Wistar Kyoto ラット (10-12 週齢) を空気またはオゾン (0.25、0.5、1.0 ppm) に 4 時間曝露
6 し、肺傷害および炎症を曝露 0 時間後または 20 時間後に評価した (n=8/群)。肺における
7 遺伝子発現プロファイリングは曝露 0 時間後で評価した (空気および 1.0 ppm オゾン、n=
8 3-4/群)。1 ppm のオゾン曝露により、20 時間の気管支肺胞洗浄中においてタンパク質量
9 と好中球数が増加した。細胞の接着と移動、ステロイド代謝、アポトーシス、細胞周期制
10 御および細胞増殖に関与する遺伝子の変化に加えて、急性炎症反応に関与する多数の遺伝
11 子は増加した。オゾン曝露後、多くの NRF2 標的遺伝子も誘導された。発現量の変化から、
12 RelA, SP1 および TP53 を介したシグナル伝達が下流の変化を仲介していることが明らかに
13 された。エンドサイトーシスのプロセスの著しい変化は、肺を被覆している脂質およびタ
14 ンパク質が酸化されることにより生じる細胞膜成分および受容体の変化によってオゾン誘
15 発性の肺傷害および炎症が開始される可能性を示す。結論として、オゾン誘発性の傷害と
16 炎症が起こる前に、エンドサイトーシスの過程とステロイド受容体シグナル伝達変化を介
17 している可能性がある RelA, SP1, TP53 によって調節される細胞接着/遊走、アポトーシス、
18 細胞周期制御、および増殖に関する標的遺伝子の変化が生じている。

19
20 Brand *et al.* (2016)は、亜急性の O₃ への曝露が、肺における好中球の集積を引き起こすが、
21 マウスにおいては、この集積に IL-17A が必要であることが知られていることと、O₃ はま
22 た、IL-17A を誘導する IL-23 や IL-1 の発現増加も引き起こすことから、この研究の目的を、
23 O₃ の亜急性曝露後の IL-23 と IL-1 が IL-17A の発現とそれに続く好中球の動員に寄与する
24 という仮説を検討することとした。C57BL/6 マウス、IL-23 KO、IL-23 および IL-1 を発現
25 する cDC (conventional dendritic cells) が欠損した Flt3l KO に IL-1R1 拮抗薬アナキンラ (100
26 mg/kg、24 時間ごと) を腹腔内投与した後、0.3 ppm の O₃ を 72 時間吸入曝露させ、曝露直
27 後に BALF 中より気管支肺胞中サイトカイン、ケモカイン及びタンパク質量を評価した。
28 また、フローサイトメトリーにより肺における炎症細胞の種類及び量、RT-PCR により肺
29 Il17a 及び Il23a mRNA の発現量を評価した。O₃ 曝露により、WT マウス肺における Il23a
30 mRNA および Il17a mRNA の発現が増加した。IL-23 KO マウスでは、WT と比較して、肺
31 Il17a mRNA 量及び IL-17A (+) F4/80 (+) 細胞が大幅に減少した。一方で、アナキンラ投
32 与は肺における Il23a や Il17a mRNA 量、または好中球生存因子 G-CSF の BALF 中濃度に
33 影響を与えなかったが、BALF 中の好中球数を減少させた。これはおそらくアナキンラが
34 BALF 中の IL-6 を減少させたためであると考えられた。WT マウスでは、O₃ 曝露により
35 DC 数が大幅に増加したが、Flt3 KO マウスでは増加が認められなかった。また Flt3 KO マ
36 ウスでは、WT と比較して、O₃ 曝露後の Il23a や Il17a mRNA の量、または BAL の好中球

1 数に差は認められなかった。これらの結果は、IL-1ではなくIL-23が亜急性のO₃曝露に
2 よって誘発されるIL-17A発現に寄与していることを示している。また、O₃によるIL-23
3 の誘導はcDC(conventional dendritic cells)を必要としないと考えられる。

4
5 Che *et al.* (2016) は、O₃によって引き起こされるインフラマソームの活性化とインターロ
6 イキン (IL) -1 の産生がIL-17Aを介して好中球性気道炎症を調節すると仮説を立て、検
7 証した。研究には、IL-1受容体1 (Il1r1) (-/-) マウス、Il17 α (-/-) マウス、およびカスパー
8 ーゼ-1阻害剤であるアセチル-YVAD-クロロメチルケトン (Ac-YVAD-cmk) を用いた。肺
9 の好中球性炎症はO₃の長期低用量曝露(72時間, 0.7 ppm)によって誘発され、気管支肺胞
10 洗浄液 (BALF) 中の炎症性細胞とタンパク質レベル、サイトカイン、IL-17A産生 $\gamma\delta$ T細
11 胞およびミトコンドリア性活性酸素種 (ROS)、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の放出、
12 肺胞マクロファージのインフラマソーム活性について分析された。その結果、O₃誘発性の
13 好中球性気道炎症は肺においてIL-1 β 、IL-18、IL-17A、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、
14 インターフェロンガンマ誘導タンパク質10 (IP-10)、およびBALFタンパク質の増加を伴
15 った。オゾン誘発性IL-17A産生は主に $\gamma\delta$ T細胞で起こり、Il17 α ノックアウトマウスは気
16 道炎症の減少を示した。O₃曝露マウスの肺胞マクロファージは、高レベルのミトコンドリア
17 ROS産生、細胞質へのmtDNAの漏出、カスパーゼ1活性の上昇、IL-1 β 産生の増加を
18 示した。Il1r1-ノックアウトマウスまたはAc-YVAD-cmkによる処理は、IL-17A産生とそれ
19 に続く気道炎症を減少させた。以上より著者らは、O₃に誘導されるIL-17Aと好中球性気
20 道炎症がカスパーゼ-1-IL-1カスケードによって調整されていることが証明されたとした。

21
22 Cienciewicki *et al.* (2016) は、自然免疫血清タンパク質であるマンノース結合レクチン
23 (MBL)が、自然免疫系のオゾン媒介活性によって引き起こされる炎症の促進イベントに寄
24 与すると仮定し、実験を行った。野生型(Mbl+/+)およびMBL欠損(Mbl-/-)マウスをオゾン
25 (0.3ppm)に最大72時間曝露し、気管支肺胞洗浄液の炎症マーカーについて調べた。好酸球
26 および好中球の数、そして好中球誘引物質C-X-Cモチーフケモカイン2[Cxcl2(主要内在性
27 タンパク質2)]および5[Cxcl5(四肢発現、LIX)]の平均は、オゾン曝露を受けたMbl+/+マウ
28 スよりもMbl-/-マウスで低かった。ゲノム全体のmRNAマイクロアレイ分析を用いて、転
29 写応答プロファイルとネットワークについて、ベースライン(例えば、核因子 κ B/IRF3/IRF7
30 関連因子2(NRF2)媒介酸化ストレス応答)と曝露後(例えば、液体免疫応答)におけるMbl+/+
31 およびMbl-/-マウス間の差を確認した。マイクロアレイデータをさらに解析し、抗菌反応
32 および炎症反応を含むいくつかの有益な差異応答パターンとそれに続く遺伝子セットを発
33 見した。また、遺伝子転写のリストを使用してLINCS L1000CDS2データセットを検索し、
34 遺伝子転写および炎症におけるオゾン誘発変化を乱すと推測される薬剤を同定した。これ
35 ら知見は、Mblの標的削除が、ベースラインおよびオゾン曝露後の炎症関連遺伝子セット
36 のレベルの差異を引き起こし、肺炎を減少させたことを示している。すなわち、この実

1 験モデルにおける遺伝子が自然免疫調節に重要な役割を担うことが示された。

2

3 Miller *et al.* (2016a)は、副腎由来のストレスホルモンの増加がオゾンに誘発される代謝影
4 響と肺損傷の両方に必要であると仮定し、これを検証した。オスの Wistar-Kyoto ラットに、
5 両側副腎髓質摘出術 (DEMED)、両側副腎全摘出術 (ADREX)、または偽手術 (SHAM)
6 を行った。4 日間の回復後、ラットを空気またはオゾン (1 ppm) に 4 時間/日で 1 日また
7 は 2 日間曝露し、曝露直後に応答性を評価した。循環アドレナリンレベルは、SHAM と比
8 較して DEMED および ADREX ラットではほぼゼロまで低下した。コルチコステロンは、
9 DEMED ラットでは低くなる傾向があり、ADREX ラットではほぼゼロまで低下した。空気
10 曝露した副腎摘出術ラットは、代謝物と肺毒性パラメーターに中程度の変化を引き起こし
11 た。オゾン誘発性高血糖および耐糖能異常は、DEMED ラットで著しく弱められ、ADREX
12 ラットではほぼ完全に逆転した。オゾンは SHAM において循環エピネフリンおよび循環コ
13 ルチコステロンを増加させたが、DEMED または ADREX ラットでは増加させなかった。
14 遊離脂肪酸 ($P = .15$) と分岐鎖アミノ酸は、SHAM ではオゾン曝露後に増加したが、DEMED
15 または ADREX ラットでは増加しなかった。肺の毎分呼吸量は手術やオゾンの影響を受け
16 なかったが、オゾンに誘導された努力呼吸は ADREX ラットにおいて明白ではなかった。
17 オゾンによる肺タンパク質漏出および好中球性炎症の増加は、DEMED および ADREX ラ
18 ットで著しく減少した (ADREX > DEMED)。SHAM における循環白血球のオゾンを介し
19 た減少は、DEMED および ADREX ラットでは認められなかった。オゾン誘発性の末梢代
20 謝作用および肺損傷/炎症は、おそらくストレス反応経路の活性化を介して、副腎由来のス
21 トレスホルモンに媒介される可能性が示唆された。

22

23 Ong *et al.* (2016) は、オゾンに繰り返し曝露したマウスにおける好酸球性鼻炎の経時的な
24 発症とリンパ球細胞依存性及び上皮変化を検討した。C57BL/6 マウスを、1、2、4、または
25 9 日間 (平日のみ) 連続で、4 時間/日でオゾン 0.5ppm に曝露した。リンパ球細胞欠損
26 Rag-/-/Il2rg-/-マウスも同様に 9 日間 (平日) 曝露した。曝露 2~24 時間後、形態測定およ
27 び遺伝子発現解析のために鼻組織を採取した。オゾンに 1 日曝露された C57BL/6 マウスに
28 は、気道上皮壊死および粘膜における Ccl2(MCP-1)、Ccl11(エオタキシン)、Cxcl1(KC)、
29 Cxcl2(MIP-2)、Hmox1、Il1b、Il5、Il6、Ilf13、および Tnf の mRNA の過剰発現を伴う急性
30 好中球性鼻炎がみられた。それとは対照的に、9 日間オゾンに曝露された C57BL/6 マウス
31 では、Arg1、Ccl8(MCP-2)、Ccl11、Chil4(Ym2)、Clca1(Gob5)、Il5、Il10、および Il13 の粘
32 膜 mRNA の過剰発現を有する 2 型免疫応答の発現、粘膜浸潤好酸球の増加、鼻粘膜上皮リ
33 モデリング(例えば、過形成または肥大、粘液細胞の過形成、ヒアリン症、および YM1/YM2
34 タンパク質の増加)がみられた。しかし、9 日間オゾンに曝露された Rag-/-/Il2rg-/-マウスで
35 は、2 型免疫に関連した鼻腔病理像や転写産物の過剰発現はみられなかった。これらの結
36 果は、高濃度大気中オゾンへの曝露を受けた非アトピー性個体における鼻腔気道に見られ

1 た好酸球性炎症および2型免疫の活性化に関して、もっともらしいパラダイムをもたらす
2 ものである。

3
4 Page *et al.* (2016)は、マウスにおける O₃ 誘発性肺炎症における EGFR の役割を調べるた
5 め、BALB/c マウス 40 匹を、7日間連続して1日3時間、濾過空気(FA)または(0.25、0.5、
6 1.00ppm)O₃に曝露した。活性酸素種(ROS)、EGF、およびマウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)
7 における形質転換増殖因子 α (TGF- α)の濃度を ELISA を用いて測定した。BALB/c マウスに
8 は、O₃ 曝露2時間前、そしてその後1日おきに EGFR キナーゼ阻害剤 PD153035 を気管内
9 に投与した。肺切片における EGFR(Y1068)のリン酸化は、曝露24時間後に免疫組織染色
10 法およびウェスタンブロットを用いて同定した。O₃の吸入により、用量依存的に顕著に肺
11 炎症が誘発された。0.5 ppm または 1.0 ppm オゾンに曝露したマウスの BALF 中 ROS、TGF- α 、
12 総タンパク質および細胞のレベルは、FA に曝露したマウスの BALF 中のそれと比較し、
13 著しく増加した。さらに、O₃への曝露は、気道上皮における EGFR(Y1068)リン酸化を誘導
14 した。PD153035 の投与は、O₃曝露によって誘導される EGFR リン酸化と同様に肺の炎症
15 を減少させた。O₃の吸入は、気道上皮における EGFR の活性化に依存する炎症反応をもた
16 らす。

17
18 Speen *et al.* (2016)は、O₃を吸入すると、気道上皮細胞膜のコレステロールまたは肺表面
19 の液相と相互作用して、化学的に反応性の高いオキシステロールを生成するが、O₃由来の
20 オキシステロールが分子機能に影響するメカニズムは不明であることから、①ヒト気管支
21 上皮 16HBE 細胞に肝臓 X 受容体(LXR)アゴニスト T0901317 (T09) を添加し、0.4 ppm の
22 O₃を4時間曝露させ、曝露から1-24時間後に細胞と Apical 洗浄液中のオキシステロール
23 濃度、細胞におけるコレステロール排出ポンプタンパク質である ATP-binding cassette
24 transporter 1 (ABCA1)および炎症誘発性サイトカイン遺伝子の発現レベルを解析した。また、
25 16HBE 細胞に O₃由来のオキシステロールである Seco A を添加した後、Seco A 結合タンパ
26 ク質の同定を行った。②8-12週齢の C57BL/6J (WT または、LXR α KO) マウスに 2 ppm の
27 O₃を3時間曝露させ、曝露直後に BALF 中のタンパク質及び肝臓中の mRNA 発現を解析
28 した。③ヒトボランティアに 0.3 ppm の O₃を運動しながら2時間曝露させ、曝露1-24時
29 間後に気管支鏡検査を行い、BALF を収集した。16HBE 細胞への O₃曝露により、細胞ラ
30 イセートおよび上清において、オキシステロールであるエポキシコレステロール- α と- β
31 (α -EpCh、 β -EpCh)、セコステロール A と B (Seco A、Seco B) が形成された。同様に、
32 O₃に曝露されたヒトのボランティアから得られた BALF においても、これらのオキシステ
33 ロールの増加が観察された。また、4種類のオキシステロールには炎症誘発作用があり、
34 いずれも 16HBE 細胞における NF- κ B 活性を亢進させた。LXR の活性化により制御されて
35 いる ABCA1 の発現は、O₃に曝露された 16HBE 上皮細胞において抑制された。さらに、
36 LXR KO マウスを O₃に曝露すると、WT と比較して肺において炎症誘発性サイトカインで

1 ある IL-6 の産生が増強された。また、16HBE 細胞にアルキニル基を付加した Seco A を添
2 加すると、Seco A による LXR への付加が示された。同様に、16HBE 細胞にアルキニル化
3 コレステロールを添加して O₃ を曝露すると、LXR と HSP のようなタンパクとの付加体
4 形成が引き起こされた。LXR 作動薬である T09 単独での刺激と比較して、Seco A と T09
5 での共刺激では、ABCA1 の発現が低下していたことから、Seco A-LXR 複合体の形成は、
6 作動薬による LXR の活性化を阻害すると考えられた。これらの結果は、O₃ 由来のオキシ
7 ステロールが炎症誘発作用を有しており、LXR との脂質付加物を形成させることで、コレ
8 ステロール調節遺伝子の発現を抑制することを示しており、気道における O₃ 由来の脂質過
9 酸化と、それに続発する健康障害の生化学的メカニズムを提供している。

10
11 Francis *et al.* (2017a)は、オゾン反応時における肺への炎症性細胞輸送における CCR2 の
12 役割を解析した。マウスをオゾン (0.8 ppm、3 時間) で処理すると、24 時間で肺の炎症促
13 進性 CCR2+マクロファージが増加し、24 時間および 48 時間で炎症促進性 CD11b+ Ly6Chi
14 および iNOS+マクロファージが増加した。マンノース受容体+抗炎症マクロファージは、
15 オゾンの 24 時間後と 48 時間後にも肺で認められた。CCR2 の喪失は、肺における炎症促
16 進性マクロファージの数の減少と、炎症促進性サイトカインである IL-1b および TNFa の
17 発現の減少に関連していた。抗炎症性 CD11b+ Ly6C^{Lo} マクロファージの減少は、オゾン処
18 理 CCR2^{-/-}マウスの肺でも認められたが、マンノース受容体+マクロファージの蓄積は遅れ、
19 反対に、CX3CL1 と CX3CR1 は増加した。CCR2^{-/-}マウスにおける肺マクロファージ亜集
20 団および炎症性遺伝子発現の変化は、気管支肺胞洗浄タンパク質含有量の減少およびヘム
21 オキシゲナーゼ-1、4-ヒドロキシノネナール、チトクローム b5 の肺発現の減少によって表
22 されるように、オゾン毒性および酸化ストレスの減少と相関していた。これらのデータは、
23 CCR2 がオゾン曝露後の肺における炎症促進性マクロファージおよび抗炎症性マクロファ
24 ージの蓄積の両方で役割を果たすことを示している。しかし CCR2^{-/-}マウスにおいてオゾ
25 ン誘発性の肺損傷と酸化ストレスが減少するという事実は、炎症誘発性マクロファージに
26 対する CCR2 のより顕著な効果を示唆している。

27
28 Francis *et al.* (2017b)は、脾臓摘出 (SPX) マウスを使用して、オゾンによって誘発された
29 肺の炎症と損傷に対する脾臓由来の単球の寄与を評価した。マウスを空気またはオゾン
30 (0.8 ppm、3 時間) に曝露してから 24~72 時間後に細胞と組織を採取した。オゾン曝露
31 後、対照群 (CTL) のマウスの脾臓において、炎症促進性 CD11b + Ly6Chi 単球数および抗
32 炎症性 CD11b + Ly6C^{Lo} 単球数の増加が認められた。CD11b + Ly6Chi および MMP-9 +炎
33 症促進性マクロファージは、CD11b + Ly6C^{Lo} およびマンノース受容体 (MR) +抗炎症性
34 マクロファージとともに、オゾン後の CTL マウスの肺でも認められた。これは、CCL3、
35 CCL4、CCR1、AT1R を含む単球/マクロファージ輸送に関与するタンパク質の肺発現の増
36 加を伴った。脾臓摘出術は、肺の炎症促進性マクロファージの減少と CCR2、CCL2、およ

1 び CCL4 の減少をもたらしたが、CD11b + Ly6C^{Lo} 抗炎症性マクロファージの増加をもたら
2 した。 CD11b + Ly6G + Ly6C + 顆粒球 (G) -および単球 (M) -骨髄由来サプレッサー細胞
3 (MDSC) も、CTL マウスの肺および脾臓で検出され、これらはオゾン曝露後に増加した。
4 脾臓摘出術は、肺における G-MDSC の減少と関連しており、M-MDSC には影響しなかつ
5 た。 SPX マウスにおける肺マクロファージ亜集団および MDS の変化は、気管支肺胞洗浄
6 タンパク質含有量の減少および肺における 4-ヒドロキシノネナール発現の減少によって証
7 明されたように、オゾン毒性の減少と相関していた。これらの結果は、脾臓がオゾン誘発
8 性の肺損傷、炎症、および酸化ストレスに寄与する炎症促進性/細胞毒性マクロファージの
9 供給源であることを示唆している。

10

11 Fryer *et al.* (2017)は、モルモットにおいて O₃ への曝露が免疫反応と生理学的反応にどう
12 影響するかに焦点を当てた。モルモットは、空気中のアレルゲンに対する反応がヒトに似
13 ており、アレルギー性喘息に関していくつか共通する特徴があることから、ヒトの呼吸お
14 よび生理学的反応の研究に役立つ動物モデルであると考えられている。以前著者らは、24
15 時間以内の曝露で O₃ が気管支収縮を誘発するだけでなく、すべての白血球が発達する骨髄
16 における新しい細胞の産生を刺激することも観察した。O₃ 曝露の結果、新しく合成された
17 白血球、特に好酸球の数が増加し、血液と肺に移動していた。今回の研究における主な仮
18 説は、新たに合成された好酸球は O₃ 曝露から 3 日後に肺に動員され、O₃ が誘発した気管
19 支収縮を軽減したため、動物にとって保護的に作業するというものだった。また、アレル
20 ゲンとなるオボアルブミンを投与された動物では、非感作動物で見られた保護的な影響が
21 無くなったと考えられた。また、特定のサイトカイン (細胞シグナル伝達分子) に対する
22 遮断薬の影響について評価した。アレルゲンを感知した動物の免疫応答は、サイトカイン
23 (インターロイキン IL-4、IL-5、および IL-13) の合成を特徴とする Th2 パターンに支配さ
24 れており、CD4⁺ T リンパ球の Th2 サブセットとそれらが活性化する細胞 (主に好酸球、
25 および免疫グロブリン E [IgE] の産生に切り替わる B リンパ球) によることから、免疫感作
26 が IgE によって支配される傾向があるアレルギー性ヒトのモデルとして、アレルゲンに感
27 受性を持つ動物が用いられた。著者らは、非感作およびオボアルブミン感作モルモットを
28 2 ppm の O₃ またはろ過された空気に 4 時間曝露し、1 日または 3 日後に骨髄、血液、気管
29 支肺胞洗浄液中における好酸球や他の白血球 (マクロファージ、好中球、リンパ球) の数
30 と、気管支収縮を含む重要な生理学的反応を測定した。一部の動物は、それぞれ腫瘍壊死
31 因子- α (TNF α) と IL-5 を遮断するエタネルセプトと抗 IL-5 モノクローナル抗体で事前に
32 処理された。TNF α および IL-5 遮断薬は喘息患者の治療に使用されている。この研究の重
33 要な特徴は、ブロモデオキシウリジン (BrdU) の動物への投与により、もともと存在する
34 白血球と曝露後に合成された白血球の種類を区別する手法である。BrdU は分裂細胞の
35 DNA に組み込まれるチミジン類似体で、新生細胞のマーカーとして機能するため、もとも
36 と存在する (BrdU 陰性) 細胞のタイプに対する新生 (BrdU 陽性) 細胞の割合を得ること

1 ができる。アレルギーのモルモットと非感作モルモットでは、O₃曝露後の気管支収縮の時
2 間経過と好酸球や白血球の細胞型の変化が異なっていた。非感作モルモットでは1日目に
3 気管支収縮が大幅に増加したが、O₃曝露後3日目までに減少した。対してアレルギーモル
4 モットでは、気管支収縮は3日目も高いままであった。アレルギーモルモットだけでなく
5 非感作モルモットの骨髄と肺においても、新生 BrdU⁺陽性好酸球の割合がO₃曝露によっ
6 て増加した。TNF α 遮断薬のエタネルセプトによる事前処理は、非感作モルモットとアレ
7 ルギーのモルモット間で異なる複雑な影響をもたらした。非感作モルモットでは、エタネ
8 ルセプトが骨髄におけるO₃誘発性の好酸球新生を減少させ、好酸球の肺への移動を阻害し
9 た。また、エタネルセプトなしの1日目と比較して3日目に気管支収縮を増加させた。O₃
10 曝露後のアレルギーの動物においては、エタネルセプト処置がない場合と比較して、エタ
11 ネルセプト処置は骨髄または肺におけるどの細胞型にも影響を与えず、気管支収縮を変化
12 させなかった。ろ過空気およびO₃に曝露してから3日目では、エタネルセプトが非感作お
13 よびアレルギーモルモットにおける血中の単球とリンパ球の数を増加させる傾向があった
14 が、この時点では血中の好酸球に影響はなかった。これは研究において、曝露されたモル
15 モットの血中で見られた数少ない所見の1つだった。抗IL-5抗体は、O₃曝露から3日後の
16 アレルギーのモルモットにおける気管支収縮を減少させた。対して抗IL-5抗体で処置され
17 た非感作モルモットでは、気管支収縮が大幅に増加した。以上のデータは、オゾン曝露が
18 骨髄での好酸球産生とそれに続く肺への動員を誘導することを示している。これらの新し
19 く産生された好酸球は、保護的な特性を備えた、これまで認識されていなかった好酸球の
20 集団を構成する。TNF α は、オゾン誘発性の好酸球増加における重要なサイトカインであ
21 る可能性がある。特に、これらの保護的な好酸球はアトピー患者の肺においては動員され
22 ないため、気道過敏性が悪化する。これらのデータは、好酸球を標的とする治療が、アト
23 ピー患者でより効果的である可能性があることを示唆している。

24

25 Henriquez *et al.* (2017)は、オゾン誘発性肺損傷および炎症におけるアドレナリン作動性お
26 よび糖質コルチコイド受容体の阻害の役割を調べた。12週齢のオスのWistar-Kyotoラット
27 を、プロプラノロール (PROP; 非選択的 β アドレナリン受容体[AR]拮抗薬、10 mg/kg, i.p.)、
28 ミフェプリストン (MIFE; グルココルチコイド受容体[GR]拮抗薬、30 mg/kg, s.c.)、両方
29 の薬物 (PROP + MIFE)、またはそれぞれの溶媒で7日間毎日前処理し、その後薬物治療を
30 継続しながら、空気またはオゾン (0.8 ppm) に1日または2日間連続して4時間/日で曝
31 露した。オゾン単独曝露群では最大呼気流量が増加し、Penhが強化された、これは2日目
32 に最も増加した。MIFEおよびPROP + MIFEの前処理はオゾン誘発性のBALFにおける
33 N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の増加とリンパ球減少といった変化が消失したが、
34 PROPの前処理ではO₃による影響が残存した。オゾン単独曝露は、肺血管漏出、マクロフ
35 ザージ活性化、好中球性炎症およびリンパ球減少症の著しい増加と関連していた。特に、
36 PROP、MIFE、およびPROP + MIFEの前処理はオゾンによる肺血管漏出を減少させた。一

1 方、PROP または PROP + MIFE は好中球の炎症を軽減させた。PROP はまた、気管支肺胞
2 洗浄液 (BALF) 中の IL-6 および TNF- α タンパク質や肺 IL6 および Tnf α mRNA についてオ
3 ズン誘発性の増加を減少させた。これらの結果より著者らは、オゾン曝露後に放出される
4 ストレスホルモンは受容体特異的に AR と GR を介して肺損傷と炎症作用を調節しており、
5 AR および GR に関連する治療を受けている肺疾患患者は、大気汚染に対する感受性の変
6 化を経験する可能性があるとした。

7
8 Kumagai *et al.* (2017) は、C57BL/6 マウス、ILC を欠損していない Rag2^{-/-}マウス (T 細胞
9 および B 細胞を欠く)、ILC 欠損 Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}マウス (ILC を含むすべてのリンパ球が枯
10 渇) を使用して、オゾン誘発性非アトピー性喘息の病因における自然リンパ球 (ILC) の
11 役割を決定した。マウスは、0 または 0.8 ppm のオゾンに 1 日または 9 日間連続して (4 時
12 間/日) 曝露された。単回オゾン曝露は、ILC の有無に関係なく、すべての系統のマウスに
13 おいて好中球性炎症、気道上皮損傷、および修復 DNA の合成を引き起こした。対照的に、
14 9 日間の曝露は ILC が十分なマウスの肺でのみ好酸球性炎症と粘液細胞の化生を誘導した。
15 繰り返されたオゾン曝露は ILC が十分なマウスにおいて 2 型免疫と気道粘液産生に関連す
16 る転写産物の mRNA 発現の増加も誘発した。オゾンに繰り返し曝露された ILC 欠損マウス
17 では、肺病変や 2 型免疫に関連する遺伝子発現の増加は認められなかった。以上 の結果は、
18 環境中のオゾン曝露に関連する小児非アトピー性喘息発症の根底にある生物学的メカニズ
19 ムの新しいパラダイムを示唆している。

20
21 Holze *et al.* (2018)は、ROS 供給源へのマウスまたは細胞の曝露によって誘発される炎症
22 および細胞死が、カノニカル ROS 感知経路または既知の細胞死経路がない場合には変化し
23 ないことを示すため、C57BL/6J (野生型、Pgam5^{-/-})、SV129 (Casp1/11^{-/-}) マウスに 1ppm
24 の O₃ を 1 時間曝露させ、ROS 誘発細胞死シグナル伝達は、細胞 ROS センサーと抗酸化因
25 子 KEAP1、ホスファターゼ PGAM5 (phosphoglycerate mutase family member 5) およびプロ
26 アポトーシス因子 AIFM1 との相互作用を伴うこと、Pgam5^{-/-}マウスにおいて、オゾン曝露
27 モデルにおいて肺の炎症および炎症性サイトカインの悪化がみられたこと、インフルエン
28 ザ A ウイルスの攻撃は、ウイルス浸潤の増加、リンパ球性気管支炎、Pgam5^{-/-}マウスの生
29 存率の低下につながることを報告した。著者らは、「オキシプトシス」と呼ばれるこの経路
30 は、ROS 感受性、カスパーゼ非依存性、非炎症性細胞死経路であり、この経路は、ROS に
31 より誘発される炎症またはウイルス病原体などの ROS 生成病原体によって誘発される炎
32 症からの保護に重要であるとした。

33
34 Michaudel *et al.* (2018)は、マウスでの急性オゾン曝露に対する肺の炎症における IL-33 及
35 びその受容体である ST2 の役割について研究を行った。ST2 欠損および Il33 欠損、IL-33
36 シトリンレポーター、および C57BL/6 (野生型) マウスを用い、すべての研究で一回のオ

1 ゾン曝露 (1 ppm, 1 時間) を行った。肺組織および気管支肺胞腔における細胞動員と、炎
2 症パラメーター、上皮バリア損傷、および気道過敏性 (AHR) を測定した。野生型マウス
3 において一回のオゾン曝露により、1 時間以内に上皮バリアが急速に破壊され、その後第 2
4 段階として、好中球動員、活性酸素種産生、AHR、および上皮および骨髄細胞における IL-33
5 発現の増加を伴う呼吸バリア損傷が起きた。IL-33 または IL-33 受容体/ST2 非存在下におい
6 て、タンパク質の漏出を伴う上皮細胞の損傷、骨髄細胞の補充および炎症がさらに増加す
7 るが、好中球における密着結合タンパク質である E-カドヘリンと密着結合タンパク質 1、
8 および活性酸素種の発現と AHR は減少した。ST2 中和は増強されたオゾン誘発性好中球
9 性炎症を再現した。しかしながら、GR-1 抗体を用いた骨髄細胞の欠乏は、オゾン誘発性の
10 肺の炎症、上皮細胞の損傷、およびタンパク質の漏出を減少させたが、組換えマウス IL-33
11 の投与は IL-33 欠損マウスにおいて好中球の動員を減少させた。以上 の結果は、IL-33/ST2
12 軸の制御下でオゾンが骨髄細胞性の炎症性損傷に先行する即時のバリア損傷を引き起こす
13 ことを示している。それゆえに IL-33/ST2 シグナル伝達は、無傷の上皮バリアの維持と炎
14 症に重要である。

15 16 1. 1. 4. 呼吸機能に関する知見

17 Currie *et al.* (1998a) は、急性 O₃ 曝露が呼吸に影響を与えるかどうか、および肺サーファ
18 クタントが末端気道の開存性を維持する能力に影響するかどうかを評価することを目的と
19 した。7 週齢の雄 BALB/c マウスに 1 ppm の O₃ を 2、4、6 および 8 時間曝露し、24 時間
20 後にプレチスモグラフィと気管支肺胞洗浄を行った。2 時間の O₃ 曝露後、呼吸数は 297 +/-
21 6 から 386 +/- 11 呼吸 × min⁻¹ に増加した (p < 0.0001)。一呼吸あたりの圧力振幅は減少
22 し (p < 0.001)、吸気/呼気時間比が減少した。BALF 中のリン脂質が増加し、毛細管表面張
23 力計による解析では肺サーファクタントの機能障害が観察された (p < 0.0001)。また、BALF
24 中のタンパク質についても O₃ 曝露により増加した (p < 0.0001)。BALF 成分を遠心沈殿処
25 理し生理食塩水での洗浄操作を行うことで、BALF 中肺サーファクタントの開存性を維持
26 する能力が回復したことから、タンパク質または他の水溶性阻害物質が肺サーファクタン
27 トの機能障害を引き起こしていた可能性が考えられた。急性 O₃ 曝露は呼吸に影響を与え、
28 気道炎症を引き起こした。炎症性タンパク質または他の水溶性阻害物質が気道の開存性を
29 維持するための肺サーファクタントの能力を低下させることが示唆された。

30
31 Ho *et al.* (1998) は、O₃ 曝露が肺のカプサイシンに対する応答を増強することが報告され
32 ていることから、O₃ の急性曝露が肺における気管支肺の C 線維応答に影響を与えると考え、
33 化学的および機械的な刺激への肺 C 線維の応答に対する O₃ の効果を調べた。ラット
34 (Sprague-Dawley、雄、全 27 匹) に 3 ppm O₃ を 30 分間曝露させた後、カプサイシン刺激、
35 乳酸の投与、肺膨張を実施し、肺迷走神経 C 繊維の応答活性を測定した。O₃ への曝露後、
36 動脈血圧、気管圧、C 繊維のベースライン活性には変化は生じなかった。C 繊維にカプサ

1 イシンで刺激を与えたところ、O₃曝露なしでは変化は生じなかったが、O₃曝露後では応答
2 が顕著に増強・延長された。増強・延長は、54±6分後には対照レベルまで戻った。同様に、
3 低用量の乳酸による肺C線維の応答も、O₃曝露により増強された。さらに、O₃曝露は、
4 定圧肺膨張に対するC線維応答についても増強した。これらの結果は、呼吸パターンお
5 よび胸部におけるO₃誘発性変化にこれらの求心性神経の過応答が関与している可能性を
6 示唆している。

7
8 Kleinman *et al.* (1999)は、O₃や酸性粒子の曝露が呼吸機能や炎症に及ぼす影響に、適応が
9 あるかどうかを検討するため、Sprague-Dawleyラットに0.2、0.4 ppmのO₃を単独曝露、又
10 はO₃とH₂SO₄被覆炭素粒子状物質(0.2 ppm O₃+50 µg/m³炭素粒子+100 µg/m³H₂SO₄、
11 空気動学的中央粒子径0.24µm又は0.4 ppm O₃+250 µg/m³炭素粒子+500 µg/m³H₂SO₄、
12 空気動学的中央粒子径0.26µm)を複合曝露させた。対照群は清浄空気に曝露させた。
13 いずれも4時間/日で1、5日間の鼻部吸入曝露とした。曝露第1、5日に曝露中の呼吸パ
14 ターンについて測定し、曝露終了後、肺組織、BALFを採取し、肺組織の病理組織学的解析、
15 BALF中の肺胞マクロファージのFc受容体結合能解析を行った。高濃度のO₃の単回曝露
16 により、一回換気量は低下し、肺の炎症反応は増加したが、反復曝露では対照群と差はみ
17 られず、影響が緩和された。しかし、酸性粒子共存下では5日間曝露による炎症反応は1
18 日曝露よりも大きく、影響緩和の効果は観察されなくなった。肺胞マクロファージのFc
19 受容体結合能は、濃度に関わらず5日間のO₃+酸性粒子複合曝露により、1日曝露群、対
20 照群と比較し抑制された。以上の結果より、O₃と酸性粒子との複合曝露は、O₃単独曝露
21 において報告された反復曝露による適応機構を変化させる可能性がある」と結論する。

22
23 Nielsen *et al.*(1999)は、O₃誘導性の肺影響に対するBALB/cAマウスの感度を調べるため、
24 吸入曝露実験を行った。BALB/cAマウス(雄、各試験n=4)に0.3~4 ppmのO₃を30分間
25 吸入曝露させ、曝露期間中の呼吸機能への影響を調べた。O₃曝露開始から11~20分では、
26 2 ppm以上のO₃濃度で呼吸数が増加した。21~30分では、1 ppmより高い濃度で呼吸数
27 の増加が見られたが、2~2.5 ppmで最も増加の程度が大きくなり、より高濃度では影響が
28 減少した。1回換気量は、曝露開始から4~10分、11~20分、21~30分それぞれにおいて、
29 2.5 ppm以上、1.5 ppm以上、1 ppm以上の濃度で濃度依存的に減少した。50%呼気流量
30 は、曝露開始から11~20分では2 ppm以上、21~30分では1 ppm以上の濃度で、濃度依
31 存的に減少した。吸気時間については、11~20分では2 ppm以上、21~30分では1 ppm
32 以上のO₃濃度で減少した。吸気終了から呼気開始までの停止時間(time of brake)につい
33 ては、11~20分では4 ppmのO₃曝露で、21~30分では2.5 ppm以上で減少が見られた。
34 呼気終了から吸気開始までの停止時間(time of pause)については、11~20分では4 ppm
35 のO₃曝露で、21~30分では2.5 ppm以上の濃度で増加が見られた。呼気時間については、
36 21~30分では、2および2.5 ppmのO₃曝露では減少した、4 ppmでは増加がみられた。以

1 上の結果から、1 ppm 以上の O₃ 曝露が浅速呼吸を誘導することが示唆された。

2
3 Inoue *et al.* (2000)は、O₃ 曝露による呼吸器への影響を NOS 阻害剤が抑制するかどうかを
4 評価するため、Hartley モルモットに NOS (一酸化窒素合成酵素: endothelial nitric oxide
5 synthase) 阻害剤、又は溶媒による前処理を行い、1 時間後、乾燥空気又は 3.0 ± 0.1 ppm の
6 O₃ を 2 時間吸入曝露させた。O₃ 曝露終了直後又は 5 時間後に気道反応性の測定及び BALF、
7 肺組織の採取を行った。気道反応性、BALF 中の好中球数、硝酸+亜硝酸量、肺組織中の IL-8
8 mRNA 発現量のいずれの評価項目においても、曝露終了 5 時間後において O₃ の影響が強
9 く出ていることを示唆する結果となった。また、曝露終了 5 時間後の O₃ の影響を NOS 阻
10 害剤が抑制している結果から、O₃ 誘発性の気道の炎症、過敏性は NOS 阻害剤によって持
11 続的な抑制ができることが示唆された。

12
13 Schelegle *et al.* (2001)は、C 繊維が媒介する O₃ 起因性の浅速呼吸と、下気道内の様々な部
14 位における気道上皮細胞損傷との関連性を検討するため、Wistar ラットの迷走神経の神経
15 周囲を溶媒のみ又はカプサイシンによって処理し、約 20 時間後、意識下のラットにろ過空
16 気又は 1 ppm の O₃ を 8 時間全身吸入曝露させた。サンプル部位毎の上皮損傷の指標として
17 BrdU 標識密度 (気道面積 1 mm² あたりの標識化細胞数) を観察した。呼吸機能に関して
18 は、呼吸回数、一回換気量、分時換気量を測定した。O₃ を吸入した溶媒処理 (対照) ラッ
19 トでは浅速呼吸パターンがみられた一方で、O₃ を吸入したカプサイシン処理ラットでは呼
20 吸数に変化しなかった。浅速呼吸が認められた溶媒処理/O₃ 曝露ラットでは、左の幹気管支
21 (中間気道) の分岐部から短い気道又は長い気道までの間に BrdU 標識密度の累進的な増
22 加が認められ、短い気道及び長い気道が接続する終末細気管支の BrdU 標識密度は同程度
23 であり、近位気道における BrdU 標識密度よりも大きかった。これとは対照的に、カプサ
24 イシン処理によって浅速呼吸が減衰したため、短い気道が接続する終末細気管支における
25 BrdU 標識密度は、長い気道が接続する終末細気管支よりも低下した。以上の結果は、O₃
26 に起因する浅速呼吸が多数のレベルの気管支を保護する一方で、終末細気管支における損
27 傷の分布が増加することを示している。

28
29 Schlesinger *et al.* (2002a)は、雌雄の Hartley モルモットに清浄空気又は 0.1、0.3 ppm の O₃
30 を 4 時間/日、4 日/週で 24 週間吸入曝露させた。既存のアトピーや曝露中の感作の影響を
31 検討するため、正常動物、OVA の 4 日間吸入曝露により感作させることでアトピーを誘導
32 し O₃ 曝露まで 28 日間おいたモルモット、O₃ 曝露開始と同時に OVA 感作させたモルモッ
33 トを用いた。曝露終了 1 週間後、又は 9 週間後に屠殺、血液を採取し、抗体価を調べた。
34 また、BALF、肺組織を採取し、気道炎症、酸化ストレスに関する指標を調べた。気道反
35 応性については、O₃ 曝露中は 4 週間毎に測定し、曝露終了 9 週間後まで飼育したモルモッ
36 トについては曝露後 4、8 週目にも測定した。O₃ 曝露は正常モルモットに気道過敏性を誘

1 発しなかったが、OVA による感作が O₃ 曝露前か同時かによらず、アトピーを誘導したモ
2 ルモットの気道過敏性を増悪させ、この影響は曝露終了後、少なくとも 4 週間は持続した。
3 O₃による気道過敏性への増悪影響と BALF や肺組織における気道炎症の指標との間には相
4 関は認められなかったが、抗原特異的抗体価とは相関が認められた。

5
6 Shore *et al.* (2002)は、成体マウスでは O₃ 曝露中の分時換気量が減少する反応がみられる
7 ことから、O₃ に対する呼吸反応に週齢による相違があるかどうかを決定するため、2、4、
8 8、12 週齢の雌雄の A/J マウスに、ろ過空気、又は 0.3、0.5、1.0、2.0、3.0 ppm の O₃ を 3
9 時間鼻部吸入曝露させ、プレチスモグラフィにより O₃ 曝露前 20 分間及び曝露中の分時
10 換気量、一回換気量、呼気終末休止期、呼吸回数、曝露前日及び曝露終了後 3 時間の Penh
11 の測定を実施した。体重で標準化した分時換気量のベースライン (VE/g) は週齢とともに
12 減少した。これは、若齢の動物ほど代謝速度が大きいことと一致する。全ての週齢のマウ
13 スにおいて、分時換気量は、O₃ 濃度に相関して減少したが、2 週齢のマウスの反応は 4 週
14 齢以上のマウスと比較して小さかった。未成熟マウスでは VE/g のベースラインが増加し、
15 O₃ による分時換気量の減少が小さいことから、体重で標準化した O₃ の総吸入量は成体マ
16 ウスよりも 3~4 倍多くなった。8 週齢及び 12 週齢のマウスでは O₃ 曝露量に相関して気道
17 反応が増加したが、2 週齢及び 4 週齢のマウスでは気道過敏症は発症しなかった。また、
18 生後 2、8 週の雌雄の A/J マウスにろ過空気、又は 2.0 ppm の O₃ を 3 時間鼻部吸入曝露さ
19 せ、曝露終了の 4 時間後又は 24 時間後に BALF を採取し、タンパク質、TNF- α 、IL-6、MIP-2、
20 総細胞数、好中球比率、マクロファージ数比率、好酸球比率を観察した結果、8 週齢のマ
21 ウスでは O₃ 曝露 4 時間後の IL-6 濃度と MIP-2 濃度が 2 週齢のマウスより増加した。以上 の
22 結果は、少なくとも気道過敏症の誘導及びある種のサイトカインの遊離促進においては、
23 若齢マウスは成体マウスと比較して O₃ に対する感受性が低いことを示している。

24
25 Schelegle *et al.* (2003b)は、O₃ 反復曝露による、生理学的適応、上皮傷害/修復、気管のサ
26 プスタンス P レベルの経時的な変化について調べた。Harlan Sprague-Dawley ラット (77 日
27 齢以上、全 63 匹) に 1 ppm O₃ を 8 時間/日で 5 日間曝露した後、ろ過空気を 9 日間曝露
28 するサイクルを 4 回繰り返し、各サイクルの第 1、5 日目および第 1、2、4 サイクルの第
29 14 日目に安楽死させて解析を実施した。なお、各ラットの安楽死 1 時間前に増殖細胞標識
30 として 5-bromo-2'-deoxyuridine を注射した。O₃ 曝露により、浅く早い呼吸が誘導された。
31 中位気管支、細気管支、肺胞管の炎症および上皮傷害が見られ、その影響の程度は曝露の
32 反復ごとに小さくなる傾向が見られた。BALF 中の好中球、白血球、好酸球、マクロファ
33 ージ数および上皮と間質の細胞増殖が増加したが、曝露の反復に伴い影響が弱くなった。
34 逆に、終末細気管支におけるリモデリングについては、サイクルごとに影響の増加が認め
35 られた。これらの結果は、O₃ 曝露による累積性の末梢気道病変が、気道傷害に対する細
36 胞増殖応答の低下によるものであることを示唆している。また、細胞増殖応答の低下は、

1 O₃ 誘発傷害に応答した好中球炎症および/または分裂促進性神経ペプチドの放出の減少の
2 結果であることが示唆された。

3
4 Cremillieux *et al.* (2008)は、5 か月齢の雄の Sprague-Dawley ラットに空気又は 0.5 ppm の
5 O₃ を 12、22 時間 (それぞれ間欠曝露、連続曝露) /日 で 2、6 日間、全身吸入曝露させた (各
6 群 3~7 匹、計 24 匹)。曝露終了後、過分極化させた ³He をラットの気道に挿入したカテ
7 ーテルから送り込み、³He の肺分布を MRI を用いて調べ、吸気時の ³He の肺分布像、肺に
8 おける ³He 拡散係数、肺充填時の動的換気像を評価した。吸気時肺分布像、拡散係数につ
9 いては、O₃ 曝露群と対照群の差はみられなかった。動的換気像については、³He の肺充填
10 の遅延や不均一な充填として表れる換気欠損が認められ、その発生率は対照群に比較し、
11 O₃ 曝露群で高く、特に 6 日間間欠曝露群で 85%と高率であった。以上 のように、³He を
12 用いた MRI で、O₃ 曝露により、不均一な閉塞パターンが観察された。

13
14 Schelegle and Walby (2012)は、Brown-Norway ラット (雄、8~10 週齢、113 匹) に対し、
15 O₃ を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、(1) Air/SH、(2) Air/SC、(3) O₃/SH、(4)
16 O₃/SC (Air: 清浄空気、O₃: O₃ (抗原感作 3 日目の抗原感作前に O₃ 曝露を行った)、SH: 生
17 理食塩水、SC: コナヒョウヒダニ抗原感作) である。1.0 ppm で単回、8 時間、吸入による
18 曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露直後に呼吸パターン、肺抵抗性 (RL)、
19 呼吸数、BALF タンパク・細胞所見を観察し、影響を評価した。O₃ 曝露によって肺抵抗性
20 とアレルギー感受性を著しく高めたが、迷走神経周辺をカプサイシン処理 (PCT: perineural
21 capsaicin treatment、迷走神経求心路遮断) したラットは O₃ 誘導性の肺抵抗性への影響が消
22 失し、さらに O₃ 曝露後にアレルギーを負荷した際の肺抵抗性の増加度も減少していた。迷
23 走神経を切除したマウスでは O₃ 誘導性気管支収縮および O₃ 曝露後のアレルギー負荷によ
24 る気管支収縮を著しく強めた。本実験で用いた O₃ によるぜん息悪化モデルでは、肺の知覚
25 線維からの入力気管支の収縮と弛緩の両方を起こすことが分かった。C 線維が気管支収
26 縮を惹起し、有髄神経が起こす反射性気管支弛緩と釣り合っており、気道に放出されたメ
27 ディエーターは気管支収縮を起こす。迷走神経が無傷ならば気管支弛緩反応は優性だが、
28 アレルギー誘導性の気管支弛緩を打ち消すことはできない。

29
30 Groves *et al.* (2013)は、サーファクタントタンパク質 D (Sftpd) 欠損マウスを用いて、老化
31 による肺炎と O₃ 曝露による影響の関連について調査した。C57BL/6J または Sftpd^{-/-}マウ
32 ス (雄、8、27、80 週齢、n=3~6/群) に、0.8ppm の O₃ を 3 時間曝露した後、各種解析を行っ
33 た。O₃ 曝露による影響として、8 週齢の C57BL/6J マウスでは、O₃ 曝露により活性化され
34 たマクロファージの増加が観察されたが、Sftpd^{-/-}マウスでは観察されなかった。また、
35 C57BL/6J マウスでは O₃ 曝露により、8 週齢と 27 週齢で肺粘性抵抗の増加が認められたが、
36 80 週齢では変化は生じなかった。弾性抵抗については、27 週齢でのみ O₃ 曝露群において

1 増加が認められたが、8週齢と80週齢では差は認められなかった。8週齢の *Sftpd*^{-/-}マウス
2 ではO₃曝露によりBALF中の細胞数およびタンパク質が増加したが、27週齢および80週
3 齢では増加は見られなかった。8週齢の *Sftpd*^{-/-}マウスではO₃曝露によりBALF中の細胞
4 数およびタンパク質が増加したが、27週齢および80週齢では増加は見られなかった。こ
5 れらの結果は、若齢動物ほどO₃曝露による肺抵抗への影響が大きいことを示唆している。

6
7 Miller *et al.* (2016a)は、副腎由来のストレスホルモンの増加がオゾンに誘発される代謝影
8 響と肺損傷の両方に必要であると仮定し、これを検証した。オスのWistar-Kyotoラットに、
9 両側副腎髓質摘出術 (DEMED)、両側副腎全摘出術 (ADREX)、または偽手術 (SHAM)
10 を行った。4日間の回復後、ラットを空気またはオゾン (1 ppm) に4時間/日で1日また
11 は2日間曝露し、曝露直後に応答性を評価した。循環アドレナリンレベルは、SHAMと比
12 較してDEMEDおよびADREXラットではほぼゼロまで低下した。コルチコステロンは、
13 DEMEDラットでは低くなる傾向があり、ADREXラットではほぼゼロまで低下した。空気
14 曝露した副腎摘出術ラットは、代謝物と肺毒性パラメーターに中程度の変化を引き起こし
15 た。オゾン誘発性高血糖および耐糖能異常は、DEMEDラットで著しく弱められ、ADREX
16 ラットではほぼ完全に逆転した。オゾンはSHAMにおいて循環エピネフリンおよび循環コ
17 ルチコステロンを増加させたが、DEMEDまたはADREXラットでは増加させなかった。
18 遊離脂肪酸 (P=.15) と分岐鎖アミノ酸は、SHAMではオゾン曝露後に増加したが、DEMED
19 またはADREXラットでは増加しなかった。肺の毎分呼吸量は手術やオゾンの影響を受け
20 なかったが、オゾンに誘導された努力呼吸はADREXラットにおいて明白ではなかった。
21 オゾンによる肺タンパク質漏出および好中球性炎症の増加は、DEMEDおよびADREXラ
22 ットで著しく減少した (ADREX>DEMED)。SHAMにおける循環白血球のオゾンを介し
23 た減少は、DEMEDおよびADREXラットでは認められなかった。オゾン誘発性の末梢代
24 謝作用および肺損傷/炎症は、おそらくストレス反応経路の活性化を介して、副腎由来のス
25 トレースホルモンに媒介される可能性が示唆された。

26
27 Henriquez *et al.* (2017)は、オゾン誘発性肺損傷および炎症におけるアドレナリン作動性お
28 よび糖質コルチコイド受容体の阻害の役割を調べた。12週齢のオスのWistar-Kyotoラット
29 を、プロプラノロール (PROP; 非選択的βアドレナリン受容体[AR]拮抗薬、10 mg/kg, i.p.)、
30 ミフェプリストン (MIFE; グルココルチコイド受容体[GR]拮抗薬、30 mg/kg, s.c.)、両方
31 の薬物 (PROP+MIFE)、またはそれぞれの溶媒で7日間毎日前処理し、その後薬物治療を
32 継続しながら、空気またはオゾン (0.8 ppm) に1日または2日間連続して4時間/日で曝
33 露した。オゾン単独曝露群では最大呼気流量が増加し、Penhが強化された、これは2日目
34 に最も増加した。MIFEおよびPROP+MIFEの前処理はオゾン誘発性のBALFにおける
35 N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の増加とリンパ球減少といった変化が消失したが、
36 PROPの前処理ではO₃による影響が残存した。オゾン単独曝露は、肺血管漏出、マクロフ

1 アージ活性化、好中球性炎症およびリンパ球減少症の著しい増加と関連していた。特に、
2 PROP、MIFE、および PROP + MIFE の前処理はオゾンによる肺血管漏出を減少させた。一
3 方、PROP または PROP + MIFE は好中球の炎症を軽減させた。PROP はまた、気管支肺胞
4 洗浄液 (BALF) 中の IL-6 および TNF- α タンパク質や肺 Il6 および Tnf α mRNA についてオ
5 ゾン誘発性の増加を減少させた。これらの結果より著者らは、オゾン曝露後に放出される
6 ストレスホルモンは受容体特異的に AR と GR を介して肺損傷と炎症作用を調節しており、
7 AR および GR に関連する治療を受けている肺疾患患者は、大気汚染に対する感受性の変
8 化を経験する可能性があるとした。

9 10 1.1.5. 気道反応性に関する知見

11 Joad *et al.* (1998) は、O₃ 曝露による急速適応受容体 (RARs, rapidly adapting receptors) へ
12 の刺激が呼吸パターンおよび肺機能に変化を引き起こすことは知られているが、O₃ 反復曝
13 露の RAR の反応性への影響は明らかにされていないことから、O₃ の繰り返し曝露が RAR
14 の反応性を低下させるかどうかを調べた。雄の Hartley モルモットに 0.5 ppm の O₃ を 8 時
15 間/日で 7 日間曝露させ、メタコリンおよびサブスタンス P 刺激による PAR の反応性を評
16 価した。O₃ 反復曝露は、サブスタンス P、メタコリン、および過膨張に対する頸部求心性
17 迷走神経の RAR 応答を増強させた。なお、RAR のベースライン応答には変化は認められ
18 なかった。また、サブスタンス P およびメタコリン誘発性の Cdyn (動的コンプライアンス)
19 および肺抵抗についても変化は認められなかった。これらのアゴニストにより誘発される
20 RAR 活性の変化は、Cdyn の変化に先行して生じていた。これらの結果は、O₃ の反復曝露
21 が RARs の応答性を増幅させることを示唆している。

22
23 Takebayashi *et al.* (1998) は、1) O₃ 曝露による肺損傷及び気道反応性亢進に対する C 線維
24 による保護効果におけるタキキニンの役割を決定することと、2) 分時換気量 (VE) の差
25 によって、カプサイシンによる C 線維の機能を阻害したことによる影響について説明する
26 ことの可能性について検討した。雄の Sprague-Dawley ラットを 1 ppm O₃ に 3 時間曝露し、
27 その 4 時間後に BALF を観察するか、又は気道反応性を測定した。ラットに CP-99994 と
28 SR-48968 (選択的ニューロキニン-1 及び-2 受容体拮抗薬) 又は薬剤の溶解に使用した溶媒
29 を投与した。O₃ は溶媒投与群及びタキキニン受容体拮抗薬投与群のラットの BALF 中の好
30 中球数の増加を引き起こし、好中球数はタキキニン受容体拮抗薬を投与したラットで約 2
31 倍高かった。対照的に、タキキニン受容体拮抗薬の投与は、肺機能や気道反応性に影響を
32 及ぼさなかった。O₃ の曝露後、BALF 中の好中球数は、溶媒を投与したラットに比べてカ
33 プサイシンを投与したラットで多かった。O₃ 曝露は、カプサイシンを投与した群と溶媒を
34 投与した群において分時換気量を減少させたが、その応答量 (それぞれ 44.7 \pm 3.7%、
35 27.8 \pm 6.8%) や、その効果の現れる時間 (10 分対 70 分) など、カプサイシンを投与した群
36 でより大きな影響がみられた。これらの結果は、タキキニンが、O₃ 曝露によって誘導さ

(案)

1 れる肺炎症に対する C 線維の保護効果を仲介することを示唆している。また、カプサイシ
2 ンを投与したラットにおける BALF 中の好中球数の増加は、分時換気量が高いために O₃
3 の用量が増加したことの結果ではないことを示した。

4
5 Vargas *et al.* (1998)は、雄の Hartley モルモット (500-600 g) を空気又は O₃ (0.3 ppm、4
6 時間/日、1、3、6、12、24、又は 48 日) を曝露した。曝露終了 16-18 時間後に静脈注射に
7 によるサブスタンス P (0.032~3.2 µg/kg) を投与し、誘発される肺吸入圧力(pulmonary
8 insufflation pressure)の変化を測定するとともに BALF を観察した。また、中性エンドペプ
9 チダーゼ阻害薬ホスホラミドンの有無にかかわらず、空気又は O₃ の単独曝露 3 時間後に気
10 管支リング (bronchial rings) を用いて気道反応性について検討した。O₃ 曝露群では、O₃
11 曝露の 1、3、6、12、24 日後に、*in vitro* で投与したサブスタンス P に対する気道過敏症を
12 引き起こした。しかし、O₃ 曝露の 48 日後には気道過敏症を引き起こさなかった。O₃ 曝露
13 によって BALF 中の総細胞、マクロファージ、好中球及び好酸球数が増加した。すべての
14 モルモットのデータをプールして解析すると、気道反応性の程度と総細胞数 (R = 0.55)、
15 マクロファージ (R = 0.54)、好中球 (R = 0.47)、及び好酸球 (R = 0.53) の間に相関が認め
16 られた。このことは、気道炎症が、サブスタンス P による気道過敏症の亢進に関与してい
17 ることを示唆している。BALF 中の SOD レベルは、O₃ 曝露の 1、3、6、12 日後に増加を
18 示したが、24 日後、48 日後にはベースラインレベルに回復した。O₃ 曝露は気管支リング
19 におけるサブスタンス P による気道過敏症を誘発せず、ホスホラミドンは 空気を吸入さ
20 せた対照群と O₃ 曝露群のサブスタンス P に対する応答を増加した。このことは、中性エ
21 ンドペプチダーゼの不活性化は、*in vivo* でのサブスタンス P による O₃ 誘発性気道過敏症に
22 関与していないことを示唆した。高度に汚染された都市において測定される程度の濃度で
23 ある 0.3 ppm O₃ への慢性的な曝露は、SOD-非依存性の機構によるモルモットのサブスタ
24 ス P によって引き起こされる気道過敏症に対する耐性をもたらした。

25
26 Currie *et al.* (1998a)は、急性 O₃ 曝露が呼吸に影響を与えるかどうか、および肺サーファ
27 クタントが末端気道の開存性を維持する能力に影響するかどうかを評価することを目的と
28 した。7 週齢の雄 BALB/c マウスに 1 ppm の O₃ を 2、4、6 および 8 時間曝露し、24 時間
29 後にプレチスモグラフィと気管支肺胞洗浄を行った。2 時間の O₃ 曝露後、呼吸数は 297 +/-
30 6 から 386 +/- 11 呼吸×min (-1) に増加した (p < 0.0001)。一呼吸あたりの圧力振幅は減少
31 し (p < 0.001)、吸気/呼気時間比が減少した。BALF 中のリン脂質が増加し、毛細管表面張
32 力計による解析では肺サーファクタントの機能障害が観察された (p < 0.0001)。また、BALF
33 中のタンパク質についても O₃ 曝露により増加した (p < 0.0001)。BALF 成分を遠心沈殿処
34 理し生理食塩水での洗浄操作を行うことで、BALF 中肺サーファクタントの開存性を維持
35 する能力が回復したことから、タンパク質または他の水溶性阻害物質が肺サーファクタン
36 トの機能障害を引き起こしていた可能性が考えられた。急性 O₃ 曝露は呼吸に影響を与え、

1 気道炎症を引き起こした。炎症性タンパク質または他の水溶性阻害物質が気道の開存性を
2 維持するための肺サーファクタントの能力を低下させることが示唆された。

3
4 Depuydt *et al.* (1999)は、大気レベルの O₃ 曝露によって惹起される気道過敏性のラットに
5 おける系統差を検討するため、雄の Long-Evans ラット、Sprague-Dawley ラット、FISHER344
6 ラット、Brown-Norway ラット、BDII ラット、BDE ラット、DA ラット、Lewis ラット、
7 Wistar ラットに、室内空気又は 0.05 ppm の O₃ を 4 時間吸入曝露させた。曝露終了 90 分後
8 に 5-HT (Hydroxytryptamine) に対する気道反応性を測定し、BALF を採取した。また、
9 Long-Evans ラットについては曝露終了 4、8、12、24 時間後、FISHER344 ラットについて
10 は曝露終了 4、8、12 時間後に気道反応性の測定及び BALF の採取を行った。さらに、
11 Long-Evans ラットは曝露終了 12 時間後に Evans blue 染料を頸静脈注入し、5 分後の溢出を
12 調べた。曝露 90 分後の観察では、Lewis ラット、BDII ラット、Long-Evans ラットにおい
13 て気道過敏性の亢進を認めた。一方、どの系統のラットにおいても明らかな気道炎症は認
14 められなかった。Long-Evans ラットにおいては、明らかな気道炎症や細胞傷害を認められ
15 なかったが、気道過敏性亢進の持続が最大 12 時間認められた。結論として、高度の近交系
16 ラットにおいては大気レベルの O₃ の曝露により、気道炎症を起こすことなく気道過敏性が
17 生じる系統があり、観察された O₃ 曝露への気道の感受性の相違を遺伝要因によって説明で
18 きると考えられるとした。

19
20 Dye *et al.* (1999)は、高齢 (生後 14 か月) の雄の FISHER344 ラットにろ過空気又は 2 ppm
21 の O₃ を 2 時間吸入曝露させ、曝露終了 2 時間以内に気道反応性を測定した。また、生後
22 90 日の雄の FISHER344 ラット、Sprague-Dawley ラット、Wistar ラットにろ過空気又は 0.5
23 ppm の O₃ を夜間 8 時間吸入曝露させた。曝露終了の 2 時間後に BALF を採取し、総タン
24 パク質、LDH、フィブロネクチン、細胞分画算定、IL-6、プロスタグランジン E2 について
25 観察した。高齢 FISHER344 ラットへの 2 ppm の O₃ 曝露後、明らかな気道過敏性亢進が認
26 められた。0.5 ppm の O₃ 曝露後には、Wistar ラットでは、Sprague-Dawley ラット及び
27 FISHER344 ラットと比較し、肺傷害、好中球性炎症が進展し、BALF 中の IL-6 濃度が上昇
28 することが認められた。Sprague-Dawley ラットにおいて、BALF 中のプロスタグランジン
29 E2 がより高く、FISHER344 ラットでは一貫して影響が最も小さかった。Wistar ラット由来
30 の気管支上皮を、*in vitro* において 0.1~1.0 ppm の O₃ に 1 時間曝露させ、類似の影響につ
31 いて検討した結果、多種の炎症性メディエーターを介する経路が O₃ 曝露により影響される
32 ことが確認された。これらの作用はぜん息患者のように気道炎症を既に有する者の
33 morbidity を悪化させ得る。

34
35 Matsumoto *et al.*(1999)は、モルモットに O₃ を急性吸入曝露し、気道反応性の変化におけ
36 る好中球エラスターゼの関与について調べた。モルモット (Hartley、雄、n=5/群) に生理

(案)

1 食塩水または ONO-5046(好中球エラスターゼ阻害剤、200mg/kg) を腹腔内投与した後、3
2 ppm O₃ を 2 時間吸入曝露し、O₃ 曝露の 0、3、5 時間後にアセチルコリン(Ach)への気道反
3 応性の測定、BALF 成分の解析を実施した。O₃ 曝露は、ACh の吸入および静脈内投与に対
4 する気道反応性を増強させるとともに、BALF における NE-PI (NE- α -1-protease inhibitor
5 complex) 濃度、好中球数、気道上皮細胞数、マクロファージ数を増加させた。ONO-5046
6 の前処置は、O₃ 曝露による BALF 中の好中球数および上皮細胞数の増加、および吸入 Ach
7 に対する気道反応性の向上を抑制したが、Ach の静脈内投与に対する気道反応性には影響
8 は示さなかった。これらの結果は、好中球エラスターゼが上皮傷害を誘発することで、
9 O₃ 誘導性の気道反応に寄与していることを示唆している。

10
11 Yost *et al.* (1999)は、モルモットを O₃ に曝露すると M (2) 機能障害と気道過敏症が引き
12 起こされることから、O₃ 誘発性過敏症における好酸球の役割を調べるため、雌のモルモッ
13 ト (specific pathogen-free) に、ろ過空気または 2 ppm の O₃ を 4 時間曝露し、O₃ 曝露から
14 24 時間後に麻酔され、胸腔内圧 (Ppi)、迷走神経性気管支収縮、神経性 M (2) ムスカリ
15 ン受容体および気道平滑筋 M (3) ムスカリン受容体の機能解析を行った。抗インターロ
16 イキン 5 抗体あるいは抗 MBP 抗体による前処理は腹腔内投与によって行われた。O₃ 曝露
17 後 24 時間において、ムスカリン作動薬のピロカルピンは O₃ 曝露モルモットに誘発された
18 迷走神経性気管支収縮を阻害せず、M (2) 機能障害が示された。O₃ に曝露されたモルモ
19 ットの M (2) 受容体機能は、抗インターロイキン 5 抗体による好酸球の減少と、抗 MBP
20 抗体による前処置によって保護された。また、M (2) 機能は、ヘパリンを用いた MBP の
21 除去により急性的に回復した。O₃ 誘発性の気道内圧の上昇は、抗 MBP 抗体によっても抑
22 制されるとともに、ヘパリンによって逆転した。迷走神経除去術を施されたモルモットに
23 おけるメタコリン誘導性気管支収縮に対して抗 MBP 抗体投与およびヘパリン前処理はど
24 ちらも効果がなかったことから、M (3) ムスカリン受容体は関与しないと考えられた。こ
25 れらのデータは、O₃ 曝露後のニューロン M (2) 受容体機能の喪失が、好酸球 MBP の放出
26 によるものであることを示している。

27
28 Fedan *et al.* (2000)は、O₃ は呼吸器上皮に対する毒性を有しており、気道の炎症や反応亢
29 進を引き起こすことから、過敏性の発達における上皮の役割を評価した。雄の English
30 short-hair SPF モルモットに、3ppm の O₃ を 1 時間吸入曝露させ、曝露後 0-24 時間で、①吸
31 入メタコリン (MCh) に対する反応性、②摘出灌流気管 (IPT) の MCh への反応性、③上
32 皮由来の弛緩因子 (EpDRF) による IPT の弛緩、④神経性収縮及び弛緩反応、⑤経上皮電
33 位差、⑥ニトロチロシン免疫蛍光、サブスタンス P 繊維密度、顕微鏡による気管の形態変
34 化、を観察した。O₃ 曝露群は FA 曝露群と比較して、曝露後 0 時間では、灌流気管の MCh
35 に対する過敏反応、及び経上皮電位差の減少を引き起こした。曝露 2-6 時間後では、EpDRF
36 により誘発される弛緩反応の抑制が生じた。これらの変化はいずれも曝露 12~18 時間で正

1 常に戻った。O₃ 曝露は神経原性収縮反応に影響を与えなかった。ニトロチロシンに対する
2 免疫蛍光染色では O₃ 曝露群で、剥離した上皮細胞であるゴースト細胞が曝露後 0 時間で気
3 管において発生し、曝露後 6 時間まで出現していた。サブスタンス P 繊維密度は曝露 0 時
4 間及び 18 時間で平滑筋において上昇したが、肺内及び肺外気管支の上皮又は粘膜固有層で
5 は上昇しなかった。O₃ 曝露による、粘膜繊毛と粘膜物質の損失は曝露 0 時間で発生した。
6 また、上皮は 12~24 時間で著しく損傷された。上皮透過性の可逆的な増加と EpDRF 生成
7 の減少は、MCh への O₃ 誘発性過敏反応に寄与している可能性がある。

8
9 Inoue *et al.* (2000)は、O₃ 曝露による呼吸器への影響を NOS 阻害剤が抑制するかどうかを
10 評価するため、Hartley モルモットに NOS (一酸化窒素合成酵素: endothelial nitric oxide
11 synthase) 阻害剤、又は溶媒による前処理を行い、1 時間後、乾燥空気又は 3.0 ± 0.1 ppm の
12 O₃ を 2 時間吸入曝露させた。O₃ 曝露終了直後又は 5 時間後に気道反応性の測定及び BALF、
13 肺組織の採取を行った。気道反応性、BALF 中の好中球数、硝酸+亜硝酸量、肺組織中の IL-8
14 mRNA 発現量のいずれの評価項目においても、曝露終了 5 時間後において O₃ の影響が強
15 く出ていることを示唆する結果となった。また、曝露終了 5 時間後の O₃ の影響を NOS 阻
16 害剤が抑制している結果から、O₃ 誘発性の気道の炎症、過敏性は NOS 阻害剤によって持
17 続的な抑制ができることが示唆された。

18
19 McGraw *et al.* (2000)は、気道上皮細胞に発現している β2-AR (アドレナリン作動性受容
20 体: adrenergic receptor) が気道反応性を制御しているかどうかを検討するため、ヒト β2-AR
21 を気道上皮細胞に発現させたヘテロ接合型、第 2~4 世代、10~14 週齢の FVB/N マウス及
22 び野生型マウスにろ過空気又は 0.75 ppm の O₃ を 4 時間吸入曝露させ、曝露終了の 5、15、
23 30、45、60、90、120 分後に気道反応性: Penh、曝露終了の 6、24 時間後に ED200 (Penh
24 がベースラインの 200%となるメサコリン投与量) を測定した。また、曝露終了後、気管、
25 肺における発現の分布を調べると共に、BALF を採取し、NO 及びプロスタグランジン E2
26 レベルを調べた。β2-AR 発現マウスは組織学的には野生型マウスと変化なく、気道上皮細
27 胞に約 2 倍の β2-AR が発現し、メサコリンで誘導した気道反応性は 1/2 であった。BALF
28 中のプロスタグランジン E2 と NO のレベルには違いはなかった。β2-AR 発現マウスは O₃
29 曝露による気道抵抗の上昇が野生型マウスより少なく、曝露後 6 時間後に両マウスとも気
30 道反応性は上昇したが、β2-AR 発現マウスのメサコリン反応性は野生型マウスのベースラ
31 イン値と同程度であった。以上 の結果は、気道上皮細胞に発現している β2-AR は気道過
32 敏性を緩和していることを示唆するものである。

33
34 Nakano *et al.* (2000)は、非選択的 (インドメタシン) と選択的 (JTE-522) のシクロオキ
35 シゲナーゼ 2 阻害剤を使用して、モルモットの O₃ 曝露後の気道過敏性と炎症におけるシク
36 ロオキシゲナーゼの役割を検討した。雄の Hartley モルモットにインドメタシン (10 mg / kg)

(案)

1 または JTE-522 (10 mg/kg) を O₃ 曝露 30 分前に経口投与した後、3 ppm の O₃ に 2 時間曝
2 露した。吸入されたヒスタミンに対する (PC200) 気道反応性と気管支肺胞洗浄液は O₃ 曝
3 露の前、直後、および 5 時間後に解析した。O₃ 曝露前、直後および 5 時間後の気管支肺胞
4 洗浄液中の炎症性細胞におけるシクロオキシゲナーゼ 2 発現を免疫組織化学によって解析
5 した。プロスタグランジン E₂、またはトロンボキサン A (2) 模倣薬である U-46619 をエ
6 アロゾルにより吸入させる前、吸入させた直前、3 時間後および 5 時間後の気道反応性を
7 評価した。O₃ は曝露直後に気道過敏性を引き起こし、5 時間後においても持続していた。
8 JTE-522 およびインドメタシン投与は、O₃ 曝露直後の気道過敏性には影響しなかったが、
9 曝露 5 時間後の気道過敏性を減少させた。これは、シクロオキシゲナーゼ-2 が気道過敏性
10 の後期において関与し、初期には関与していないことを示唆している。気管支肺胞洗浄液
11 中の好中球および上皮細胞は O₃ 曝露後に増加し、5 時間後までにさらに増加したが、イン
12 ドメタシンあるいは JTE-522 の投与は好中球および上皮細胞数に影響しなかった。気管支
13 肺胞洗浄液中のプロスタグランジン E (2) とトロンボキサン B (2) 濃度は O₃ 曝露直後に
14 増加し、曝露後 5 時間で通常レベルまで低下した。このプロスタグランジン E (2) とトロ
15 ンボキサン B (2) の増加は、JTE-522 およびインドメタシン投与によって大幅に抑制され
16 た。シクロオキシゲナーゼ-2 の発現は、O₃ 曝露後だけでなく曝露前にも検出されており、
17 またどの時点でもシクロオキシゲナーゼ-2 陽性細胞の数に差はなかった。トロンボキサン
18 A (2) 模倣薬である U-46619 (10⁻⁵M) の投与は、吸入後 5 時間後に気道過敏性を誘発し
19 たが、吸入直後及び吸入後 3 時間では誘発しなかった。これらのデータは、モルモット気
20 道における O₃ 曝露の前にシクロオキシゲナーゼ-2 が継続的に発現している可能性がある
21 ことと、シクロオキシゲナーゼ 2 が O₃ 刺激下で一時的にプロスタグランジン E (2) とト
22 ロンボキサン A (2) を合成し、トロンボキサン A (2) が後期気道過敏性を誘発している
23 可能性を示唆している。

24

25 Neuhaus-Steinmetz *et al.* (2000)は、IgE 応答性の異なるマウスにおける OVA 感作への O₃
26 曝露の影響について検討するため、IgE 高応答性の BALB/c マウス及び低応答性の C57BL/6
27 マウスの雌 (6~8 週齢) に室内空気又は 180、250、500 µg/m³ の O₃ を 4 時間/日、3 日/週
28 で 4 週間全身吸入曝露させると共に、OVA エアロゾルを 20 分/回、5 回/週で O₃ 曝露中の 4
29 週間吸入させることにより感作させた。OVA エアロゾル最終曝露の 24 時間後、メサコリ
30 ン刺激に対する気道反応性、皮膚過敏性を調べた。また、BALF、血液を採取し、血清中
31 抗体価、BALF 中の細胞数、サイトカイン及び LT の産生について調べた。その結果、BALB/c
32 マウスでは、O₃ 曝露による濃度依存的な血清中 IgE 産生、サイトカイン産生、好酸球、リ
33 ンパ球の気道への集積による Th(T-helper) 2 型の反応の増加が見られた。BALB/c マウス
34 の O₃ 曝露+OVA 感作群では、それらの反応は増強し、気道抵抗の上昇、皮膚反応の陽性率
35 増加も見られた。一方、C57BL/6 マウスでは、O₃ 曝露+OVA 感作群でのみ Th2 型の反応増
36 加が見られた。

1
2 Cho *et al.* (2001)は、O₃に感受性を有する C57BL/6J マウスにおいて、どの TNF を介した
3 メカニズムが O₃ の誘発した肺傷害の病態を制御するかを検討するため、野生型、p55、p75
4 TNFR 遺伝子又はその両方をノックアウトした雄の C57BL/6J マウス (6~8 週齢) に清浄
5 空気、0.3 ppm の O₃ を 3、24、48 時間、又は 2 ppm の O₃ を 3 時間 (急性曝露)、全身吸入
6 曝露させた。急性曝露マウスについて、24 時間回復期間において APTI (airway pressure-time
7 index) の測定により気道反応性を評価した結果、いずれのノックアウトマウスにおいても
8 O₃ 急性曝露による気道反応性は野生型マウスに比較し低減した。また、0.3 ppm 48 時間曝
9 露 (亜急性曝露) のマウス及び 6 又は 24 時間の回復期間をおいた急性曝露マウスの BALF
10 の観察、亜急性曝露マウスの肺組織の病理組織学的観察を行った結果、いずれのノックア
11 ウトマウスにおいても、O₃ 亜急性曝露による炎症と上皮の傷害は、野生型マウスよりも低
12 減したが、肺の高透過性については影響はみられなかった。O₃ 急性曝露による肺炎症及び
13 透過性は、ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して高かった。さらに、0.3 ppm、
14 2 ppm の O₃ を曝露したマウスの肺組織における TNFR mRNA の発現を分析した結果、対照
15 群 (清浄空気曝露) と比較し、O₃ 曝露の野生型マウスは肺における p55、p75 TNFR の mRNA
16 発現を増加させたが、それぞれのノックアウトマウスは O₃ 曝露により mRNA 発現を低減
17 させた。以上 の結果より、O₃ の亜急性曝露により誘発される肺の上皮傷害及び炎症病態、
18 並びに O₃ の急性曝露により誘発される気道反応性における TNFR のシグナルの重要な作
19 用が示唆された。

20
21 Toward and Broadley (2002)は、O₃ 吸入曝露の影響に対する、コルチコステロイドである
22 デキサメタゾンおよびホスホジエステラーゼ 4 阻害剤であるロリプラムの効果について調
23 べた。雄の Dunkin-Hartley モルモットに O₃ (2.15 +/- 0.05 ppm、90 分) を吸入曝露させ、
24 O₃ 曝露の 24 時間前、0.5、2、24、48、72 時間後にヒスタミンに対する気道反応性および
25 炎症について評価した。また、O₃ 曝露の 24 時間前、0.5 時間後、24 時間後にデキサメタゾ
26 ンまたはロリプラムを投与し、O₃ 曝露による影響への効果を調べた。評価は気管支肺胞洗
27 浄(および、全身プレチモグラフィによる気道コンダクタンス(sGaw)、呼吸数の計測によ
28 り行った。また湿/乾燥重量差により肺浮腫を測定した。O₃ 曝露は、全身プレチモグラフィ
29 で測定された気道コンダクタンスの低下として、初期相の気管支収縮 (EPB) を引き起
30 こし、5 時間後には後期の気管支収縮 (LPB) と呼吸数の増加が生じた。ロリプラムはこ
31 の変化に影響を与えなかったが、デキサメタゾン投与は EPB を阻害した。ヒスタミン吸入
32 に対する気道過敏性は、O₃ 吸入後 0.5、2、12、24、48 時間で発生し、2 時間後での変化は
33 ロリプラムとデキサメタゾンによって抑制された。BALF 中のマクロファージ、好酸球、
34 好中球は、O₃ 曝露後 12、24、48 時間で上昇し (P <0.05)、48 時間での上昇はロリプラム
35 とデキサメタゾンによって大幅に減衰した (P <0.05)。BALF 中の一酸化窒素代謝物は、
36 O₃ 曝露後 0.5 時間で 52%減少し、2 時間で回復した後、12 (101%) と 24 時間 (127%) で

1 増加した。NOの上昇はロリプラムまたはデキサメタゾンの影響を受けなかった。湿/乾燥
2 重量差から測定された肺浮腫はO₃曝露の12、24、48時間後に生じたが、ロリプラムとデ
3 キサメタゾンによって減衰した (P<0.05)。モルモットへのO₃曝露により、COPDと同様
4 の影響が認められた。ロリプラムとデキサメタゾンは呼吸機能の変化には影響しなかつた
5 が、炎症、気道過敏性、肺浮腫を抑制した。

6
7 Schlesinger *et al.* (2002a)は、雌雄のHartleyモルモットに清浄空気又は0.1、0.3 ppmのO₃
8 を4時間/日、4日/週で24週間吸入曝露させた。既存のアトピーや曝露中の感作の影響を
9 検討するため、正常動物、OVAの4日間吸入曝露により感作させることでアトピーを誘導
10 しO₃曝露まで28日間おいたモルモット、O₃曝露開始と同時にOVA感作させたモルモッ
11 トを用いた。曝露終了1週間後、又は9週間後に屠殺、血液を採取し、抗体価を調べた。
12 また、BALF、肺組織を採取し、気道炎症、酸化ストレスに関する指標を調べた。気道反
13 応性については、O₃曝露中は4週間毎に測定し、曝露終了9週間後まで飼育したモルモッ
14 トについては曝露後4、8週目にも測定した。O₃曝露は正常モルモットに気道過敏性を誘
15 発しなかったが、OVAによる感作がO₃曝露前か同時かによらず、アトピーを誘導したモ
16 ルモットの気道過敏性を増悪させ、この影響は曝露終了後、少なくとも4週間は持続した。
17 O₃による気道過敏性への増悪影響とBALFや肺組織における気道炎症の指標との間には相
18 関は認められなかったが、抗原特異的抗体価とは相関が認められた。

19
20 Schlesinger *et al.* (2002b)は、OVA4日間投与によりアトピーを誘導したHartleyモルモッ
21 ト、又は非アトピーのモルモットに、ろ過空気又は0.1、0.3 ppmのO₃を4時間/日、4日
22 /週で、24週間吸入曝露させた。OVAによる感作はO₃曝露開始28日前(PS)、又はO₃曝
23 露と同時(CS)とした。終了の1週間後、又は8週間後に屠殺して血液、左肺洗浄液、肺
24 組織を採取し、抗体価、肺の炎症について影響を観察した。気道反応性については、曝露
25 開始から屠殺まで4週間毎に測定を行った。その結果、アトピー誘導動物においてのみ、
26 O₃の長期曝露により気道反応性が増強した。その影響は、曝露開始4週間後から認められ
27 た。気道反応性の亢進と気道における好酸球性炎症や抗原特異的抗体価等との相関は認め
28 られなかった。

29
30 Shore *et al.* (2002)は、成体マウスではO₃曝露中の分時換気量が減少する反応がみられる
31 ことから、O₃に対する呼吸反応に週齢による相違があるかどうかを決定するため、2、4、
32 8、12週齢の雌雄のA/Jマウスに、ろ過空気、又は0.3、0.5、1.0、2.0、3.0 ppmのO₃を3
33 時間鼻部吸入曝露させ、プレチスモグラフィによりO₃曝露前20分間及び曝露中の分時
34 換気量、一回換気量、呼気終末休止期、呼吸回数、曝露前日及び曝露終了後3時間のPenh
35 の測定を実施した。体重で標準化した分時換気量のベースライン(VE/g)は週齢とともに
36 減少した。これは、若齢の動物ほど代謝速度が大きいことと一致する。全ての週齢のマウ

1 スにおいて、分時換気量は、O₃濃度に相関して減少したが、2週齢のマウスの反応は4週
2 齢以上のマウスと比較して小さかった。未成熟マウスではVE/gのベースラインが増加し、
3 O₃による分時換気量の減少が小さいことから、体重で標準化したO₃の総吸入量は成体マ
4 ウスよりも3~4倍多くなった。8週齢及び12週齢のマウスではO₃曝露量に相関して気道
5 反応が増加したが、2週齢及び4週齢のマウスでは気道過敏症は発症しなかった。また、
6 生後2、8週の雌雄のA/Jマウスにろ過空気、又は2.0 ppmのO₃を3時間鼻部吸入曝露さ
7 せ、曝露終了の4時間後又は24時間後にBALFを採取し、タンパク質、TNF- α 、IL-6、MIP-2、
8 総細胞数、好中球比率、マクロファージ数比率、好酸球比率を観察した結果、8週齢のマ
9 ウスではO₃曝露4時間後のIL-6濃度とMIP-2濃度が2週齢のマウスより増加した。以上の
10 結果は、少なくとも気道過敏症の誘導及びある種のサイトカインの遊離促進においては、
11 若齢マウスは成体マウスと比較してO₃に対する感受性が低いことを示している。

12

13 Schelegle *et al.* (2003a)は、O₃曝露がサルの呼吸器神経の発達に及ぼす影響を調べるため、
14 HMDA (House dust mite allergen, ハウスダストダニ抗原) 感作によるぜん息様病態発症モ
15 デルとしたアカゲザルと、非感作のアカゲサル (30日齢) にろ過空気又は0.5 ppmのO₃
16 を8時間/日で5日間全身吸入曝露させ、その後9日間ろ過空気回復させるサイクルを11
17 回反復した(各群6匹)。ぜん息様病態発症モデルのアカゲサルは、生後14日及び28日に
18 HDMAを皮下投与することにより感作させ、曝露サイクル中のろ過空気又はO₃曝露第3
19 ~5日にHDMAエアロゾルを2時間/日、曝露させた。血清IgE、ヒスタミン、気道抵抗性、
20 気道反応性、及び肺組織の病理組織学的検索による構造のリモデリングについて調べた。
21 また、BALFを採取し、好酸球の浸潤を調べた。O₃曝露、HDMA感作それぞれ単独の処置
22 では、好酸球の上気道、終末気管支への浸潤が顕著な増加を示したが、それ以外の気道へ
23 の影響は軽度のものしか認められなかった。一方、O₃曝露とHDMA感作処置を両方実施
24 したサルでは血清IgE、血清ヒスタミン量、気道への好酸球の浸潤など、アレルギー症状
25 の指標が増加し、気道抵抗性や反応性に関連して気道構造の変化が認められた。

26

27 Fakhrzadeh *et al.* (2004b)は、活性酸素中間体が、刺激物の吸入によって引き起こされる肺
28 損傷に関係していることから、本研究で、Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ(SOD+/+)
29 を過剰発現させたマウスを使用して、O₃による肺の炎症と細胞毒性におけるCu/Zn-SOD
30 の役割を分析した。8-16週齢の雌のC57BL/6マウス、及びC57BL/6xCBA/J SOD(Cu/Zn-SOD
31 過剰発現)マウスに、0.8ppmのO₃を3時間吸入曝露した。野生型マウスをO₃に曝露させ
32 ると、FA群と比較して気管支肺胞洗浄液(BALF)中のタンパク質が増加し、24~48時間
33 後に最大となった。また、4-ヒドロキシアルケナールの増加、肺マクロファージ数の増加
34 が観察された。対照的に、BALFのタンパク質、マクロファージ数および4-ヒドロキシア
35 ルケナールは、O₃曝露SOD+/+マウスにおいて、FA曝露SOD+/+マウスと同程度であった。
36 SOD+/+マウスではO₃曝露によるペルオキシ亜硝酸やニトロクロシンの産生は見られなか

1 った。野生型マウスの肺胞マクロファージは、O₃曝露後に一酸化窒素の量を増加させ、FA
2 曝露野性型マウスと比較して、誘導性一酸化窒素シンターゼ、ホスホリパーゼ A2 を増加
3 させ、TNF α の発現を増加させた。これは SOD+/+マウスでは認められなかった。また、
4 SOD+/+マウスでは、野性型マウスで観察された O₃によるインターロイキン 10 の減少はみ
5 られなかった。野生型マウスでは、O₃曝露により、炎症性遺伝子活性を調節する NF- κ B
6 が活性化されたが、この応答は SOD+/+マウスでは大幅に減少した。これらのデータは、
7 抗酸化酵素が O₃誘発性組織損傷および炎症性メディエーター産生において重要な役割を
8 果たすことを示している。

9
10 Park *et al.* (2004)は、マウスに対する O₃の急性曝露による気道過敏症と気道炎症において、
11 IL-1 受容体拮抗剤 (IL-1RA) の作用について検討した。雌の C57/BL6 マウスに 2.0 ppm O₃
12 又はろ過空気を 3 時間曝露すると、曝露 8 時間後又は 16 時間後にメタコリン吸入に対する
13 気道反応性の増加と、BALF 中の好中球の増加をもたらした。遺伝子マイクロアレイで評
14 価した IL-1 β 遺伝子の発現は、O₃曝露後 4 時間で 2 倍まで増加したが、24 時間後にはベー
15 スラインレベルに回復した。肺組織の破砕物中の IL-1 β のレベルは、O₃曝露 8 時間後まで
16 増加していた。マウスに対してヒト由来の IL-1 受容体拮抗剤を投与することによって、O₃
17 曝露による気道過敏症の発生は予防され、BALF 中の好中球数は減少した。また、O₃曝露
18 による肺組織破砕物中のケモカイン濃度の増加や、TNF- α 、MIP-2 及びケラチノサイト走
19 化性因子の増加は、IL-1 受容体拮抗剤によって抑制された。IL-1 産生を阻害するデキサメ
20 タゾン (抗炎症剤) の吸入は、気道過敏症の発生や BALF 中の好中球数増加を抑制し、
21 O₃曝露後の IL-1 レベルを低下させた。これらの結果を要約すると、O₃の急性曝露は気道
22 過敏症、好中球性炎症、気道上皮の損傷、及び IL-1 産生を誘導するといえる。IL-1 受容体
23 拮抗剤は、気道機能の変化、炎症、及び組織の構造的な損傷を効果的に予防する。

24
25 Johnston *et al.* (2005c)は、BALB/cJ マウス野生型及び CXCR-2 欠損(雄、8~13 週齢、n = 4
26 ~ 10)に対し、O₃を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、(1) room air 曝露野生型マウ
27 ス、(2) O₃曝露野生型マウス、(3) room air 曝露 CXCR-2 欠損マウス、(4) O₃曝露 CXCR-2
28 欠損マウスである。曝露濃度 1 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への
29 急性影響を調べた。曝露後 3 時間、24 時間の BALF 中好中球数・ケモカイン・上皮細胞数・
30 総タンパク量、血中好中球数、メサコリン (MCh) による気道反応性を観察し、影響を評
31 価した。野生型も CXCR-2 欠損マウスも O₃曝露により 24 時間後の BALF 中好中球が増加
32 し、CXCR-2 欠損マウスより少なかった。血中好中球数には違いが見られなかった。BALF
33 中の CXCR-2 リガンドは両マウスで 3 時間後に増加して 24 時間後に減少したが IP-10 と
34 MCP-1 は 24 時間後も増加した。24 時間後の BALF 中の総タンパク量は両マウスで増加し
35 ていたが上皮細胞数の増加は野生型のみで認められた。MCh による気道反応性亢進は曝露
36 3 時間後には両マウスで観察されたが、CXCR-2 欠損マウスでは 24 時間後には低下してい

1 た。CXCR-2 は O₃ 急性曝露後の肺での好中球の増加、上皮細胞の剥離、気道反応性の持続
2 的な上昇に必要なことが明らかになった。

3
4 Jang *et al.* (2006)は、5～6 週齢の雌の BALB/c マウスに 10μg の OVA とアジュバント
5 KAl(SO₄)₂ を実験開始第 1、14 日に腹腔内投与し、第 21～23 日に 30 分/日で 1 %の OVA
6 エアロゾルに曝露させることによってアレルギー性気道疾患モデルを作成し、第 24 日から、
7 ろ過空気又は 2 ppm の O₃ を 8 時間/日で 4、8、12 週間、全身吸入曝露した。対照群には、
8 アジュバント KAl(SO₄)₂ 投与、生理食塩水エアロゾル曝露を行った。O₃ 曝露直前、直後
9 に Penh(enhanced pause)、肺組織変化、BALF 中の炎症細胞、サイトカイン産生の分析を行
10 った。Penh は、4、8、12 週間の O₃ 曝露によって低下が認められ、気管支、肺胞における
11 粘液分泌細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞等は時間依存性の増加を示した。IL-4/IFN-γ の
12 比は、O₃ 曝露群では、ろ過空気曝露群と比較して増加した。以上の結果から、アレルギー
13 気道炎症と関連する気道過敏性の亢進は O₃ 長期曝露中持続せず、大気汚染物質反復曝露
14 による気道リモデリングや適応機構が、気道過敏性に対する防御として働くことが示唆さ
15 れた。

16
17 Joad *et al.* (2006)は、抗原により感作した動物の抗原反復吸入曝露による気管支、呼吸細
18 気管支におけるアレルギー反応惹起に対する O₃ 曝露の影響を検討するため、生後 14、28
19 日に HDMA (ハウスダストダニ抗原) による感作を行った生後 1 か月のアカゲサル 23 匹
20 に対し、(1) ろ過空気曝露、(2) 抗原エアロゾルを 2 時間/日で 3 日間(第 3～5 日)曝露させ、
21 残りの 11 日間休息させるサイクル、(3) 0.5 ppm の O₃ を 6 時間/日で 5 日間曝露させ、9
22 日間休息させるサイクル、(4) O₃ を 5 日間、そのうち最後の 3 日間は抗原エアロゾルも
23 曝露させ、9 日間休息させるサイクル、のいずれかの全身吸入曝露サイクルを 11 回反復し
24 した。最終曝露の 3～5 日後、気管支、呼吸細気管支を採取し、メサコリンに対する反応性、
25 好酸球数、肺神経内分泌細胞について観察した。メサコリンに対する反応性については、
26 気管支では抗原曝露により、呼吸細気管支では O₃ 及び抗原の曝露により亢進した。好酸球
27 については、気管支では抗原単独あるいは O₃ 及び抗原の曝露により、呼吸細気管支では抗
28 原曝露により増加した。気道反応性は、気管支では好酸球数、肺神経内分泌細胞数と相関
29 したが、呼吸細気管支では相関しなかった。以上の結果から、抗原曝露によるアレルギー
30 反応に伴う気道反応性への影響に及ぼす O₃ の影響が、気道の部位により異なることが示さ
31 れた。

32
33 Johnston *et al.* (2007b)は、レプチンは食欲のみならず炎症反応と関連することが示唆され
34 ていることから、O₃ 曝露によって誘導される肺の炎症への効果について検討するため、絶
35 食させた 8 週齢の雄の C57BL/6J マウス及び自由に摂餌させたマウスに室内空気又は 2 ppm
36 の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露した。曝露の 24 時間後にメサコリン誘導による気道反応性

1 を測定し、4、24 時間後、BALF、血液を採取し、肺への炎症性細胞の集積、サイトカイン
2 産生、血清中レプチン量を調べた。絶食マウスへの急性 O₃ 曝露は、その後の気道反応性を
3 亢進したが、絶食マウスにレプチンを投与すると、O₃ 曝露による気道反応性亢進は抑制さ
4 れた。O₃ 曝露による炎症性細胞の集積、タンパク質の増加、sTNFR の増加には、絶食やレ
5 プチン投与は影響を及ぼさなかった。以上 の結果から、絶食によって O₃ 曝露による肺機
6 能への影響が増強することが示されたが、そのメカニズムは不明である。

7
8 Plopper *et al.* (2007)は、アカゲザル(性別記載なし、生後期間、匹数記載なし)に対し、O₃
9 を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、清浄空気群、ダニ抗原曝露群、O₃ 曝露群、ダ
10 ニ抗原 + O₃ 曝露群である。曝露濃度はメキシコシティの大気に基づき 0.05 ppm に設定し
11 た。吸入による曝露を 8 時間/日、5 日間 O₃ 曝露、9 日間フィルター空気曝露を 11 サイク
12 ル行い、呼吸器への慢性影響を調べた。生後 12 か月までの免疫応答、気道の発達、気道平
13 滑筋、気道の免疫機構を観察し、影響を評価した。生後 ~ 発達期のアカゲザルに O₃ 反復
14 曝露によるアレルギー性ぜん息発症への影響を検討したところ、気道過敏性の亢進や、好
15 酸球数の増加、気道壁の肥厚や内腔の狭小化を認め(EMTU) (気道のリモデリング)、アレ
16 ルギー反応を増長させた。肺の発達期間に有害物質の曝露により障害を生じると、その後
17 曝露を止めても障害は残るか成長とともに悪化していく。

18
19 Williams *et al.* (2007b)は、C57BL/6 マウス (雄、年齢記載なし、20~25 g、各群 6~8 匹)
20 に対し、O₃ を曝露する実験を行った。使用したマウスの遺伝子型は野生型、TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}、
21 MyD88^{-/-}である。トール様受容体 (TLR) は、自然免疫において最前線で働く分子であり、
22 O₃ 曝露によるシグナル伝達経路にある TLR2、TLR4、MyD88 の識別について検証した。
23 曝露群の構成は、各遺伝子型について清浄空気曝露群と O₃ 曝露群である。曝露濃度 3 ppm
24 で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露後 3 時間、
25 20~24 時間の気道反応性(PC250: 肺抵抗をベースラインから 250%増大させるアセチルコ
26 リン濃度)、BALF 中の総細胞数・細胞分画・タンパク質量・IL-6 発現、肺組織中の mRNA
27 発現を観察し、影響を評価した。分散分析は Kruskal-Wallis 検定を行い、分散分析で有意
28 差があれば Dunn 検定、Mann-Whitney 検定を行った。野生型マウスでは O₃ 曝露により気
29 道反応性が亢進した。欠損型マウスである TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}、MyD88^{-/-}では O₃ 曝露による気
30 道反応性亢進はみられなかった。O₃ 曝露による BALF 中好中球数の増加は TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}
31 型で O₃ 曝露後 3 時間では野生型よりも少なかったが 24 時間では差はなかった。一方、O₃
32 曝露による MyD88^{-/-}型の好中球数は 24 時間後も野生型よりも少なかった。肺組織における
33 IL-6、KC、TLR2、TLR4、MyD88mRNA 発現は、野生型では O₃ 曝露により時間依存的に
34 増大した。TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}、MyD88^{-/-}型では、IL-6、KC の遺伝子発現は抑制された。TLR2
35 と TLR4 は O₃ 曝露による気道反応性の亢進に関わっているが、MyD88 は O₃ 曝露による好
36 中球増多に関与する。TLR2 と TLR4 も好中球反応の速度の調節では重要な働きを担って

1 いる。以上、O₃ 曝露は、酸化性ストレスのような非感染刺激を識別するトール様受容体
2 経路の活性化を介して気道反応性の亢進や好中球増多を誘導していることが示唆された。

3
4 Pichavant *et al.* (2008)は、O₃ 曝露が適応免疫の欠損によってぜん息を引き起こし、好中
5 球増多を特徴としながら気道過敏性を出現させていることから、アレルゲン誘発の気道過
6 敏性に必要とされるナチュラルキラーT 細胞が O₃ 誘発の気道過敏性においても必要か否
7 かを調べるため、野生型 BALB/c マウス、ナチュラルキラーT 細胞欠損の CD1 d^{-/-}マウス、
8 Jα18^{-/-}マウス、IL-17 欠損の IL-17^{-/-}マウスに室内空気又は 1 ppm の O₃ を 3 時間/日で実
9 験第 0、2 及び 4 日に全身吸入曝露させた。曝露終了の 24 時間後に気道抵抗のベースラ
10 イン値及びメサコリン投与による気道抵抗の変化を測定し、その後、BALF、肺組織を採
11 取し、BALF 中の総細胞数、細胞分画、ナチュラルキラーT 細胞数の計測、肺細胞内染色
12 による解析を行った。野生型マウスでは、O₃ 反復曝露によって重度の気道過敏性が生じ、
13 気道においてナチュラルキラーT 細胞、好中球及びマクロファージが増加したが、ナチュ
14 ラルキラーT 細胞欠損 CD-1 d^{-/-}マウス、Jα18^{-/-}マウスでは O₃ 曝露による気道過敏性は誘
15 発されなかった。野生型マウスを抗 CD1 d モノクローナル抗体処理すると、ナチュラルキ
16 ラーT 細胞活性化を阻害し、O₃ による気道過敏性誘発が防御された。O₃ 誘発の気道過敏
17 性はナチュラルキラーT 細胞産生 IL-17 と関連するが、アレルゲン誘導気道過敏性は関連
18 せず、IL-17 欠損マウス及び抗 IL-17 モノクローナル抗体処理の野生型マウスでは O₃ に
19 よって気道過敏性は誘発されなかった。以上 の結果から、O₃ 誘発気道過敏性はナチュ
20 ルキラーT 細胞の存在及び IL-17 の産生を必要とし、O₃ 及びアレルゲンによる気道過敏
21 性という 2 つの異なる形態でナチュラルキラーT 細胞が必要とされることから、ナチュ
22 ルキラーT 細胞が複数の異なる形態のぜん息について単一の病理メカニズムを媒介し、効
23 果的なぜん息治療の標的となることが強く示唆される。

24
25 Williams *et al.* (2008b)は、BALB/c マウス (性別、齢数、匹数記載なし) に対し、O₃ を曝
26 露する実験を行った。使用したマウスの遺伝子型は、野生型、IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-} (IL-4/13
27 二重欠損型)、IL-13Tg (IL-13 過剰発現型) である。曝露群の構成は、清浄空気群と O₃ 曝
28 露群で、実験 1: IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}、野生型を供試、実験 2: IL-13Tg と IL-13Wt を供試した。
29 曝露濃度 3 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。
30 曝露後 3 時間に BALF を採取した。また肺組織を採取し mRNA を抽出した。別のマウスに
31 ついて曝露後 20~24 時間に BALF を採取し、RL とアセチルコリンに対する気道反応性を
32 測定した。BALF (総細胞数、細胞種類ごとの細胞数、マクロファージ、好酸球、リンパ
33 球、好中球を特定、IL-6、KC レベル)、気道過敏 (AHR)、肺組織中から抽出した mRNA
34 による遺伝子発現量を観察し、影響を評価した。T-helper cell Type 2 に由来するサイトカイン
35 である IL-4 と IL-13 が、O₃ 曝露による肺の反応を制御するか検証することを目的とした。
36 O₃ 曝露によって AHR が認められるが、IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}は、野生型と比較すると軽微であ

1 った。IL-13Tg は、野生型あるいは IL-13Wt と比較して AHR の程度が増した。O₃ 曝露は、
2 野生型マウスの BALF 中の総細胞数、好中球数、マクロファージ数を継時的に増加させ、
3 20~24 時間後には最大になった。IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}では、これら細胞の増加は緩和された。
4 IL-13Tg では、IL-13Wt と比較して BALF 中の好中球は O₃ 曝露によってより増加した。O₃
5 曝露は、IL-13^{-/-}、IL-4/13^{-/-}では IL-6 やケラチノサイトケモカインの mRNA の発現量を増加
6 させ、IL-13Tg では抑制的に作用した。マクロファージ炎症タンパク質 (MIP-3α) /CCL20
7 遺伝子の発現は、O₃ 曝露後、野生型マウスでは増加した。野生型と比較すると、IL-13^{-/-}、
8 IL-4/13^{-/-}における MIP-3α/CCL20 遺伝子の発現は抑制された。なお、IL-13Tg ではその発
9 現は増加した。同様の発現パターンは、リポ多糖の刺激で誘導されるサイトカイン (LIX
10 /CXCL5/ENA-78) でも認められた。以上、IL-13 は、O₃ 曝露により誘導されるサイト
11 カインを介して気道反応性や好中球炎症を亢進すると考えられる。

12

13 Wu *et al.* (2008)は、フェレット (雌、250~500 g、n=5) に対し、O₃ を曝露する実験を
14 行った。曝露群の構成は清浄空気 (Air)、O₃ (O₃)、清浄空気 + IL-1 Ra (IL-1 受容体アン
15 タゴニスト)、O₃ + IL-1 Ra である。2 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器
16 への急性影響を調べた。曝露後 3 時間の BALF 中炎症細胞所見 (*in vivo* のみ)、メサコリン
17 (Mch) および電気フィールド刺激 (EFS) による気管平滑筋反応性および収縮への O₃/IL-1
18 Ra の効果、SP (substance P) 陽性神経線維・細胞体、気管支平滑筋の神経線維密度 (NFD)
19 を観察し、影響を評価した。O₃ 曝露によって気道の炎症が起き、IL-1 が放出され、同時に
20 気道ニューロンの SP レベルの上昇と EFS に対する気道平滑筋の反応性が亢進することが
21 分かった。IL-1 受容体アンタゴニストで曝露前に処理を行ったところ、これらの影響は弱
22 まった。

23

24 Garantziotis *et al.* (2009)は、C57BL/6J マウス (雄、6~8 週齢、n=10) に対し、O₃ を曝露
25 する実験を行った。近年 O₃ 曝露による非感染性肺障害において、ヒアルロナンが中心的な
26 役割を担っていると考えられるようになってきた。2 ppm O₃ 曝露による気道過敏性 (AHR)
27 とヒアルロナンの関与を検証するため、O₃ 曝露によって呼吸器症状を示す C57BL/6J 系の
28 CD44 欠損マウス (CD44^{-/-})、IaI 欠損マウス (IaI^{-/-})、CCD10-HAS2 遺伝子転換動物モデ
29 ルマウスを用いて実験を行った。O₃ 曝露濃度 2 ppm で単回、3 時間吸入による曝露を行い、
30 呼吸器への急性影響を調べた。曝露終了後 24 時間の AHR、気道圧力 (airway pressure)、
31 換気量 (tidal volume)、気道抵抗、気道反応性、肺胞洗浄液中タンパク量、肺胞洗浄液中
32 のヒアルロナン濃度、CD44 とヒアルロナン結合タンパク質に対する抗体染色を行った組
33 織観察から影響を評価した。ヒアルロナンチャレンジは、O₃ 曝露前 1 時間と曝露後 23 時
34 間に高分子量ヒアルロナンを口腔咽頭に投与し、O₃ 曝露後 24 時間の AHR を測定した。そ
35 の結果、O₃ 曝露後 BALF 中のヒアルロナン濃度の上昇と AHR の亢進に関連性がみられた。
36 ヒアルロナン受容体である CD44 やインタ-α-トリプシンの阻害剤を投与すると、ヒアルロ

1 ナン濃度の上昇はみられるものの AHR の亢進からは保護された。ヒアルロナン結合性ペ
2 プチドで前処理されたマウスも O₃ 曝露による AHR 亢進から保護された。低分子量のヒア
3 ルロナンを気管内投与すると CD44 に依存して O₃ 曝露による AHR を引き起こしたが、高
4 分子量のヒアルロナンの投与は、O₃ 曝露による AHR 亢進から保護する作用を示した。以
5 上、ヒアルロナンは O₃ 曝露による AHR 亢進に関わることが示された。

6
7 Matsubara *et al.* (2009)は、O₃ 曝露による気道過敏性亢進における $\gamma\delta$ T 細胞の役割を検討
8 するために、ノックアウトマウスを用いた実験、抗体投与による $\gamma\delta$ T 細胞やそのサブセッ
9 トである V γ 1+ $\gamma\delta$ T 細胞の枯渇実験、更にノックアウトマウスに対する細胞移入実験を行っ
10 た。8~12 週齢の野生型の C57BL/6 マウス、TCR- δ (T-cell receptor - δ) 鎖欠損の
11 B6.129P2-*Tcrd*^{tm1Mom/J} マウス (TCR- $\delta^{-/-}$)、TCR- β 鎖欠損の B6: 129P2-*Tcrb*^{tm1Mom/J} マウス
12 (TCR- $\beta^{-/-}$)、TNF- α 欠損の B6: 129S-*Tnf*^{tm1Gkl/J} マウス (TNF- $\alpha^{-/-}$) に、HEPA フィルターに
13 よるろ過空気又は 2.0 ppm の O₃ を 3 時間、吸入曝露させた。曝露終了の 6 時間後又は 8 時
14 間後にメサコリン負荷後の気道抵抗 (R_L)、動的コンプライアンス (C_{dyn}) を観察し、
15 その直後に BALF、肺の病理組織を採取し、観察した。TCR- $\delta^{-/-}$ マウスでは、野生型マウス
16 と比べて O₃ 曝露後のメサコリン気道過敏性 (R_L, C_{dyn}) の亢進はみられなかったが、BALF
17 中や気道肺組織への好中球浸潤や上皮傷害は観察された。同様に、O₃ 曝露 3 日前に抗 TCR- δ
18 抗体を投与された野生型マウスでは気道過敏性の亢進はみられなかったが、好中球浸潤は
19 観察された。 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットに対する抗 V γ 1 細胞抗体を O₃ 曝露 3 日前に野生型マウス
20 に投与すると、O₃ による気道過敏性が消失した。さらに、O₃ 曝露の 16~20 時間前に、TCR- $\delta^{-/-}$
21 マウスに $\gamma\delta$ T 細胞又は V γ 1+ $\gamma\delta$ T 細胞を移入すると O₃ 曝露後の気道過敏性が回復した。
22 V γ 1+ $\gamma\delta$ T 細胞を移入しても抗 TNF- α 抗体を投与すると気道過敏性の亢進は消失した。しか
23 し TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスからの $\gamma\delta$ T 細胞を TCR- $\delta^{-/-}$ マウスに移入しても気道過敏性の回復がみら
24 れたことから、O₃ による気道過敏性に必要な TNF- α の由来は $\gamma\delta$ T 細胞ではないと考えられ
25 た。以上の結果から、O₃ 曝露による気道過敏性亢進には $\gamma\delta$ T 細胞のサブセットである
26 V γ 1+ $\gamma\delta$ T 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。さらに、気道過敏性機
27 序には好中球の浸潤は不要であるが、TNF- α の産生が必要であることも示唆されている。

28
29 Voynow *et al.* (2009)は、6~8 週齢の雄の野生型 C57BL/6J マウス及び NQO1 (NAD(P)H:
30 キノン酸化還元酵素) 欠損マウスにろ過空気又は 1 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露させ
31 た。曝露 24 時間後に気道抵抗のベースライン値及びメサコリン投与による変化を測定した。
32 また、曝露の直後又は 6、12、24、48 時間後、BALF 及び肺を採取し、BALF 中の総細胞
33 数、好中球数、KC 濃度、F2-イソプロスタノール濃度、肺における NQO1 タンパク質発現量、
34 NQO1 活性の経時的変化を検討した。NQO1 欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、O₃
35 曝露によって誘導される気道過敏性、好中球性気道炎症の低減、F2-イソプロスタノールや KC
36 の産生抑制がみられ、O₃ に対して耐性を示した。野生型マウスにおける NQO1 発現量及び

1 活性は O₃ 曝露によって変化しなかった。一方、NHBE (正常ヒト気管支上皮: normal human
2 bronchial epithelial) 細胞への O₃ の *in vitro* 曝露を行い、IL-8 mRNA 発現、F2-イソプロスタ
3 ン産生量を調べた結果、NQO1 阻害により O₃ 誘発の IL-8 mRNA 発現、F2-イソプロスタ
4 ン産生が抑制された。これらの結果は、O₃ 曝露による酸化ストレスには NQO1 が関与する
5 ことを示している。

6
7 Williams *et al.* (2009)は、BALB/c マウス (雄、6~8 週齢、各群 5~10 匹) に対し、O₃ を
8 曝露する実験を行った。O₃ 曝露が COPD やぜん息患者の症状を悪化させることから、O₃
9 曝露により誘導される気道反応性や炎症の誘導に肺リモデリングや炎症に関わることが報
10 告されているカテプシン S の関与について検証した。阻害剤として Compound A を用いた。
11 曝露群の構成は、(1) Compound A + 空気、(2) Compound A + O₃、(3) 溶媒 + 空気、
12 (4) 溶媒 + O₃ である。曝露濃度 3 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器
13 への急性影響を調べた。曝露後 3 時間、20~24 時間、48 時間の BALF 中の総細胞数、細
14 胞分画、上清サイトカイン、Cathepsin S 活性、気道反応性 (PC100: 肺抵抗をベースライ
15 ンから 100 %増大させるアセチルコリン濃度。曝露後 24 時間のみ) を観察し、影響を評
16 価した。Compound A は O₃ 曝露前 2 日、1 時間、曝露後 6 時間、16~18 時間に強制経口投
17 与した。対照には溶媒のみ投与した。O₃ 曝露はカテプシン S、気道反応性、BALF 中の炎
18 症性細胞数を増加した。Compound A 投与マウスは O₃ 曝露による気道反応性亢進や好中球
19 増多から防御された。溶媒投与マウスでは O₃ 曝露により曝露後 3 時間、20~24 時間の IL-6、
20 IFN- γ 、20~24 時間の TNF- α が空気曝露と比較し増大した。O₃ による曝露後 3 時間、20~
21 24 時間の IL-6、20~24 時間の TNF- α の増大は Compound A 投与により抑制されたが、IFN- γ
22 については Compound A による影響はなかった。これらの結果から、カテプシン S は O₃
23 曝露による気道反応性や好中球の浸潤機構を制御することが示され、カテプシン S が酸化
24 性ストレスによる気道反応性や炎症を抑制する標的になる可能性を示唆した。

25
26 Farraj *et al.* (2010)は、O₃、DEP (diesel exhaust particle) の曝露がアレルギー性の気道疾患
27 に及ぼす影響について検討するため、OVA で感作した 6 週齢の雄の BALB/c マウス及び溶
28 媒のみ投与の対照マウスにろ過空気又は 0.5 ppm の O₃、2.0 mg/m³ の DEP を単独あるいは
29 複合で感作 3 日後から 5 時間/回、1 回/週で 4 週間、鼻部吸入曝露させた (各群 10 匹)。気
30 道のアレルギー反応を起こさせるため、OVA 感作の 2、4 週間後に OVA エアロゾル、対照
31 マウスには生理食塩水エアロゾルを吸入させ、感作の 29 日後、気道反応性を測定し、その
32 後、血液、BALF、肺・鼻腔の組織を採取し、BALF 中の細胞数、傷害・炎症指標、サイト
33 カイン類、血清中 NGF (神経成長因子)、OVA 特異的 IgE の計測、組織の光学顕微鏡によ
34 る観察を行った。ろ過空気を曝露させた OVA 感作マウスはメサコリンに対する肺抵抗・
35 エラスタンス、肺の炎症細胞浸潤、肺の傷害指標のうち LDH、アルブミン、総タンパク質、
36 サイトカインの IL-4、IL-5、MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)、血清中 OVA 特異的

1 IgE、NGF が対照マウスと比較し増加した。OVA 感作マウスでは、OVA が誘導した炎症細胞の浸潤が O₃ 曝露によって亢進し、NAG (N-acetyl-β-D-glucosaminidase)、MCP-1 が増加したが、肺抵抗・エラスタンスには影響がなく、また、DEP 曝露は OVA 誘導の反応に影響しなかった。OVA 感作マウスにおける O₃、DEP の複合曝露は、対照マウスへのろ過空気曝露と比較し、肺エラスタンスへの影響はなかったが、肺抵抗を増加させ、感作マウスへの O₃ 曝露による MCP-1 増加は抑制された。感作マウスにおける血清中 IgE は O₃ 曝露及び O₃、DEP の複合曝露により、DEP 曝露と比較して増加した。以上の結果から、O₃ と DEP の複合曝露は気道過敏性を増悪するが、肺の炎症反応については DEP が O₃ による増悪を抑制することから、固有の機構を考える必要性が示唆された。

10
11 Garantziotis *et al.* (2010)は、O₃ 曝露による気道過敏性の惹起に、ヒアルロン酸が内因性の TLR4 のリガンドとして働くかどうかを検討した。6~8 週齢の雄の C57BL/6J マウス及び TLR4 欠損マウスに、ろ過空気又は 2 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露、又は低分子のヒアルロン酸又は溶媒を気管内投与し、気道過敏性の測定を行い、その後、肺の炎症、傷害について調べるため、BALF 中の総タンパク質、KC (keratinocyte-derived chemokine)、TNF-α、IL-1β、IL-6、MCP-1、可溶性ヒアルロン酸の濃度の測定、肺組織の免疫組織学的検討を行った。O₃ を曝露させた TLR4 欠損マウスと C57BL/6J マウスの細胞炎症、肺の傷害、可溶性ヒアルロン酸濃度は同程度であったが、O₃ あるいはヒアルロン酸を曝露させた TLR4 欠損マウスは気道過敏性の惹起が抑制された。O₃ あるいはヒアルロン酸を曝露した後の BALF 中の炎症性サイトカインは TLR4 依存性を有し、類似のパターンを示していた。O₃ 曝露は肺のマクロファージの TLR4 の発現を増加させた。*in vitro* で骨髄由来のマクロファージにヒアルロン酸を曝露すると、NF-κB や炎症性のサイトカイン類産生が TLR4 依存的に誘導された。以上の結果から、細胞外マトリックスのヒアルロン酸が O₃ 曝露による気道疾患に関与していること、炎症性サイトカインの産生や O₃ 曝露による気道過敏性の惹起への介在によるヒアルロン酸への生物学的反応に TLR4 が寄与していることが裏付けられた。

27
28 Liu *et al.* (2010)は、O₃ による気道過敏性亢進のメカニズムを明らかにすることを目的として、雄の Sprague-Dawley ラットに清浄空気又は 2 ppm の O₃ を 30 分/日で 1、2、4 日間、全身吸入曝露させた。O₃ を 4 日間曝露したラットの一部については 2、4 日間清浄空気曝露による回復期間をおいた (各群 6 匹)。曝露終了の 2 時間後、気道過敏性、インテグリン β4 の気道・肺における mRNA 及びタンパク質の発現を検討した。O₃ 曝露により、ストレスに依存してインテグリン β4 は発現が低下し、気道過敏性亢進と負の相関が認められた。さらに、インテグリン β4 を欠損させたヒト気道上皮細胞株を用いた *in vitro* による検討では、インテグリン β4 欠損気道上皮細胞では活性酸素種の産生が増大し、アポトーシスを誘導することが確認された。以上の結果から、O₃ 曝露による気道過敏性の亢進は、イン

(案)

1 テグリン $\beta 4$ 発現低下による酸化ストレス作用の増悪、気道上皮細胞のアポトーシス誘導
2 による可能性が示唆された。

3
4 Liu *et al.* (2010)は、 O_3 による気道過敏性亢進のメカニズムを明らかにすることを目的と
5 して、雄の Sprague-Dawley ラットに清浄空気又は 2 ppm の O_3 を 30 分/日で 1、2、4 日間、
6 全身吸入曝露させた。 O_3 を 4 日間曝露したラットの一部については 2、4 日間清浄空気曝
7 露による回復期間をおいた (各群 6 匹)。曝露終了の 2 時間後、気道過敏性、インテグリン
8 $\beta 4$ の気道・肺における mRNA 及びタンパク質の発現を検討した。 O_3 曝露により、ストレ
9 スに依存してインテグリン $\beta 4$ は 発現が低下し、気道過敏性亢進と負の相関が認められた。
10 さらに、インテグリン $\beta 4$ を欠損させたヒト気道上皮細胞株を用いた *in vitro* による検討で
11 は、インテグリン $\beta 4$ 欠損気道上皮細胞では ROS (活性酸素種: reactive oxygen species) の
12 産生が増大し、アポトーシスを誘導することが確認された。以上 の結果から、 O_3 曝露に
13 による気道過敏性の亢進は、インテグリン $\beta 4$ 発現低下による酸化ストレス作用の増悪、気
14 道上皮細胞のアポトーシス誘導による可能性が示唆された。

15
16 Li *et al.* (2011b)は、C57BL/6 マウス (雄、6~8 週齢) に対し、 O_3 、ヒアルロナンフラグ
17 メント (HA: hyaluronan; グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンからなる直鎖多糖) を
18 曝露する実験を行った。 O_3 曝露により誘導される気道反応性における TLR4 の役割と HA
19 に対する反応を検証するため、野生型マウスと、3 種のノックアウトマウス (TLR4^{-/-}、
20 MyD88^{-/-}、TIRAP^{-/-}) に O_3 と HA を曝露し、BALF 中の細胞数、メサコリンに対する気道反
21 応性、炎症性サイトカインの増減を調べた。曝露群の構成は、清浄空気曝露群と O_3 曝露群
22 である。曝露濃度 1 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を行った後、麻酔をかけた動物
23 に咽頭を介して 0.5 mg/mL の HA を 50 μ L 肺に注入し、呼吸器への急性影響を調べた。マ
24 ウスの BALF 中の細胞数、炎症性サイトカイン (TNF- α 、MCP-1、IL-1 β 、IL-6、KC)、総
25 タンパク量を観察し影響を評価した。メサコリン投与に対する気道反応性は O_3 曝露から
26 20~24 時間後に観察した。野生型のマウスでは、 O_3 曝露によって炎症細胞、肺障害、炎症
27 性サイトカイン、メサコリン投与に対する気道反応性が増加した。一方、TLR4^{-/-}などのノ
28 ックアウトマウスでは、気道反応性や炎症性サイトカイン量 (TNF- α 、MCP-1、IL-1 β 、IL-6、
29 KC) に野生型のマウスのような差異は認められなかった。HA は、野生型マウス及び 3 種
30 類のノックアウトマウスで O_3 曝露により増加していた。HA の直接投与では、野生型マウ
31 スで気道反応性が誘導されたが、3 種のノックアウトマウスでは誘導されなかった。同様
32 に、HA 投与により野生型のみみられたサイトカイン産生は、ノックアウトマウスでは抑制
33 された。以上、 O_3 曝露によって誘導される気道反応性の亢進は、HA-TLR4-MyD88-TIRAP
34 信号系に依存していることを示唆する。

35
36 Verhein *et al.* (2011)は、モルモット (雄・雌、300~450 g、n=4~12) に対し、 O_3 を曝露

(案)

1 する実験を行った。曝露群の構成は、O₃ 曝露群、フィルター空気 (FA) 曝露群である。
2 NGF 実験系では、曝露 1 時間前に AbNGF (NGF 抗体) またはヤギ IgG (対照群) を投与、
3 48 時間前に AbNGF を投与した。NKR 実験系では、生理学的測定の前 30 分前に NK1R 阻害
4 薬 (ニューロキニン 1 レセプターアンタゴニスト) または NK2R 阻害薬を投与した。2.0 ppm
5 で単回、4 時間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。NGF 実験系では
6 曝露後 1 日、3 日、NKR 実験系では曝露後 1 日、2 日、3 日に観察を行った。肺膨張圧、
7 安静時心拍数、安静時血圧、迷走神経刺激 / アセチルコリン / メサコリンによる気管支収
8 縮、気道反応性、BALF、上記の O₃ 曝露による影響に対する AbNGF、NK1R 阻害薬、NK2R
9 阻害薬の効果から影響を評価した。O₃ 曝露から 24 時間後に迷走神経を介した気道反応性
10 亢進は増強され、この効果は 3 日後も持続していた。NGF 抗体で前処理したものは 1 日後
11 では気道反応性亢進の増強に対する効果がみられなかったが、3 日後では完全に阻害して
12 おり、神経束の substance P も減少していた。NK1 および NK2 レセプターアンタゴニスト
13 も 3 日後の気道反応亢進性を阻害した。NK2 レセプターの阻害は O₃ による影響とは関係
14 のないものであったが、NK1 レセプターアンタゴニストは O₃ による迷走神経の反応性亢
15 進を阻害していた。これらの結果から、O₃ による気道反応性亢進の機序は時間を経て変わ
16 り、3 日後の気道反応性の亢進には NGF を介した substance P、もしくは NK1 レセプター
17 アゴニストによるアセチルコリンの放出増加が関わっていることが分かった。

18

19 Moore *et al.* (2012) は、アレルギー性の幼児アカゲザルを HDMA、O₃、その複合に曝露
20 すると 5-HT 受容体を介して作用し、節後コリン作動性 ASM 収縮の 5-HT 調節が増強され
21 るという仮説をたて、検証した。24 匹の HDMA 感作乳児サルを 1 か月齢で 4 つの群に分
22 け、ろ過空気 (FA)、HDMA、0.5 ppm O₃、またはそれらの組み合わせ (HDMA + O₃) で曝
23 露した。6 ヶ月齢で、気道リングが採取され、節後神経および副交感神経を介した ASM
24 収縮が電界刺激 (EFS) を使用して評価された。5-HT は、すべての曝露群において EFS 応
25 答を悪化させたが、FA 群では効果は認められなかった。5-HT₂、5-HT₃ および 5-HT₄ 受
26 容体アゴニストは反応を悪化させた。特定の受容体拮抗薬とのインキュベーション後に実
27 施された 5-HT 濃度-応答曲線により、5-HT₂、5-HT₃、および 5-HT₄ 受容体の関与が確認さ
28 れた。反対に、5-HT₁ 受容体アゴニストはすべての群において EFS 中と外因性アセチルコ
29 リンを介する ASM 収縮の緊張を弱めた。小児アレルギー性喘息のモデルにおける
30 HDMA、O₃ および HDMA + O₃ 曝露は、5-HT₂、5-HT₃、および 5-HT₄ 受容体を介した EFS
31 誘発 ASM 収縮を増強する。曝露の影響を受けない、ASM 上に存在する 5-HT₁ 受容体を
32 介した非神経性抑制経路が存在する。

33

34 Bao *et al.* (2013) は、急性オゾン曝露が、最も悪化したアレルギー性気道炎症の発症を前
35 提とした喘息モデルの病態生理学的特徴に及ぼす影響について検討した。6~8 週齢の雌の
36 BALB/c マウスに OVA 感作を行い喘息モデルとした後、2ppm の O₃ を 3 時間曝露させ、マ

1 ウスにおけるエンハンスドポーズ (Penh)、総細胞数および細胞百分率、可溶性メディショ
2 ナー濃度、病理組織、および Muc5ac mRNA 発現を観察した。解析の結果、オゾンは、コ
3 ントロールにおける気道過敏性(AHR)を誘導し、喘息マウスにおける既存の AHR をさらに
4 増幅させる可能性があることが示された。オゾンへの曝露により、喘息マウスは、コント
5 ロールよりも気管支肺胞洗浄において好中球、TNF- α 、IL-13、およびヒアルロン酸をより
6 発現した。喘息マウスとコントロールマウスは、いずれも近位気道および遠位気道におけ
7 る上皮細胞密度の低下を示した。オゾンは、喘息を有するマウスにおける粘液産生および
8 ムチン遺伝子発現の増加を悪化させた。これら結果は、喘息を有する個体が高レベルの大
9 気中オゾンに曝露された場合、健常個体とは違った病態を引き起こし悪化に向かう可能性
10 を示唆している。

11

12 Barreno *et al.* (2013)は、C57BL/6 マウス (雌、4~8 週齢、n=6~10) に対し、O₃ を曝露
13 する実験を行い、O₃ 曝露による肺での障害、炎症、気道反応性の亢進の過程でのオステオ
14 ポンチン (OPN) の関与について検証した。使用したマウスの遺伝子型は、野生型とオス
15 テオポンチン (OPN) 欠損型である。曝露濃度 2 ppm で単回、3 時間、吸入による曝露を
16 行い、呼吸器への急性影響を調べた。曝露後 6 時間、24 時間の BALF および血清中 OPN
17 レベル、肺胞マクロファージ中 OPN の局在、BALF 中細胞パラメーター、IL-6、IL-17、IP-10、
18 KC、MIP-2 レベル、メタコリン吸入後の気道抵抗 (Raw)・肺組織減衰率 (G)・肺組織エ
19 ラスタンス (H)、気道・肺血管のコラーゲン構成、BALF 中コラーゲン量を観察し、影響
20 を評価した。野生型マウスの BALF 中 OPN は O₃ 曝露によって増加したが免疫組織学的観
21 察の結果では OPN 陽性の肺胞マクロファージ数は対照群と変化がなかった。BALF 中の上
22 皮細胞数、タンパク量、好中球数は野生型と欠損型それぞれ対照群に比べ増加していたが、
23 好中球数は欠損型が野生型に比べ著しく少なかった。メサコリン吸入後の反応性亢進は野
24 生型の気道と肺実質でみられたが欠損型ではみられなかった。以上 の結果から O₃ の急性
25 曝露により気腔 (air space, 呼吸細気管支から肺胞まで) で OPN が増加し O₃ 曝露により誘
26 導される肺炎症と気道 (Raw) および肺実質 (G・H) のメサコリン反応性亢進に対して機
27 能的に関わっていることを示している。

28

29 Murphy *et al.* (2013) は、O₃ 曝露が、セロトニンとその輸送体 (5-HTT)、および出生後の
30 気道の神経、上皮、免疫プロセスに関与する経路である 2 つの主要な受容体 (5-HT2A お
31 よび 5-HT4) の正常な発現パターンを変化させると仮定し、以下の解析を行った。アカゲ
32 ザルを生後 2 か月または 6 か月の間に、急性的または反復的に O₃ 曝露した。3 つの曝露グ
33 ループ/年齢がつけられた: (1) ろ過空気、(2) 急性 O₃ 曝露、および (3) 反復+急性 O₃
34 曝露。肺は部位特異的な qRT-PCR、免疫組織化学、および立体的形態計測のために調整し
35 た。解析の結果、気道上皮セロトニン免疫陽性の染色はすべての曝露群で増加し、2 か月
36 の中位気道および 6 か月の遠位気道で最も顕著だった。5-HTT、5-HT2AR、および 5-HT4R

1 の遺伝子発現は年齢依存的に増加した。全体的な発現量は中位気道と比較して遠位気道で
2 大きかった。O₃曝露は気道における 5-HT2AR および 5-HT4R タンパク質発現を抑制し、
3 平滑筋において 5-HT2AR (2 か月齢) および 5-HT4R (6 か月齢) の免疫陽性の染色を強め
4 た。O₃曝露は、気道の部位、年齢、および曝露履歴に関係なく気道上皮のセロトニンを増
5 加させ、部位、年齢、および曝露履歴に依存してセロトニン受容体タンパク質 (5-HT2A
6 および 5-HT4) および 5-HTT 遺伝子発現の空間分布を変化させた。以上 より著者らは、
7 セロトニンが O₃曝露によって悪化する可逆性気道閉塞の構成要素をどのように調節する
8 のか理解することは、臨床的に関連する気道疾患の治療法を開発するための基礎をつくる
9 とした。

10
11 Sunil *et al.* (2013)は、細気管支上皮に対するオゾンの影響を分析した。ラットをオゾン (2
12 ppm、3 時間) に曝露すると、細気管支上皮において急速 (3 時間以内) および持続的 (最
13 大 72 時間) に、細胞過多、繊毛の喪失、細気管支炎の壊死などを含む組織学的変化が生じ
14 た。血管周囲の浮腫および血管のうっ血も明らかであり、加えて気管支肺胞洗浄液中では
15 クララ細胞分泌タンパク質の減少が認められ、これは曝露後 24 時間で最大になった。オゾ
16 ンはまた、細気管支上皮において 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン、Ym1 およびヘム
17 オキシゲナーゼ-1 の発現を誘導した。これは切断されたカスパーゼ-9 とベクリン-1 の発現
18 増加に付随しており、アポトーシスとオートファジーの開始を示す。上皮細胞アポトーシ
19 スの調節因子であるガレクチン-3 の急速かつ持続的な増加も認められた。オゾン曝露後 (3
20 ~24 時間)、シクロオキシゲナーゼ-2、誘導型一酸化窒素シンターゼおよびアルギナーゼ-1
21 の発現の増加が細気管支上皮に認められた。細気管支上皮におけるオゾン誘発性損傷およ
22 び酸化ストレスは、呼吸力学におけるメタコリン誘発性変化に関連していた。それゆえに、
23 高用量のメタコリンでは、肺コンプライアンスおよび一回換気量の減少とともに、肺抵抗
24 およびエラスタンスの増加が認められた。これは気道の変化の結果として、オゾンが肺の
25 剛性の増加を引き起こすことを示している。本研究は、細気管支上皮が、オゾンへの急性
26 曝露によって誘発される傷害および酸化ストレスに非常に感受性が高いことを示している。
27 さらに、これは肺機能の変化を伴う。

28
29 Verhein *et al.* (2013)は、p38 と JNK MAPK のオゾン誘発気道過敏症への寄与について調べ
30 るため、モルモットを曝露 60 分前に p38 および JNK MAPK の二重阻害剤(30mg /kg、ip)
31 で前処置し、その後オゾン 2 ppm または濾過空気に 4 時間曝露した。1 日後、麻酔動物に
32 ついて気道反応性を測定した。曝露 1 日後、オゾンは気道過敏症を引き起こし、p38 およ
33 び JNK MAPK の遮断はオゾン誘発気道化反応性を完全に防止した。p38 および JNK MAPK
34 の遮断はまた、空気曝露動物における副交感神経活性を抑制した。よって、p38 と JNK
35 MAPK が気道副交感神経によるアセチルコリン放出に寄与することが示唆された。オゾン
36 は神経細胞 M2 ムスカリン受容体を阻害し、p38 と JNK の両方を遮断することにより M2

1 受容体機能障害が予防された。気管支肺胞洗浄への好中球の流入は、MAPK 阻害物質の影
2 響を受けなかった。p38 および JNK MAPK は、神経細胞 M2 受容体の機能障害の予防を含
3 む複数のメカニズムを通じてオゾン誘発気道過反応を媒介する。

4
5 Barker *et al.* (2015)は、特に、マウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)における IL-1 β 、NGF、
6 および SP レベルに対する O₃ の影響と、これらのメディエーターが *in vivo* の炎症性神経細
7 胞カスケードに関連する可能性があるかどうかに焦点を当て研究を行った。8 週齢の雄の
8 ICR マウスに 2ppm の O₃ を 3 時間曝露させ、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の IL-1 β 、NGF、
9 および SP レベルに対する O₃ の影響と、これらのメディエーターが *in vivo* の炎症性神経細
10 胞カスケードに関連する可能性を評価した。解析の結果、*in vivo* O₃ 曝露により BALF 中タ
11 ンパク質の 3 つ全てに誘導が増加したことが示された。また、NGF および SP の両方にお
12 ける O₃ の誘発による増加は、炎症性サイトカイン IL-1 β によって媒介されることが示され
13 た。さらに、NGF の阻害は、肺 BALF および肺組織の両方の SP の O₃ 誘発増加を減少させ、
14 NGF が SP に対する IL-1 β 作用のメディエーターとして働くことが示された。これらデータは、
15 IL-1 β が *in vivo* マウスにおける NGF およびそれに伴う SP 放出における O₃ の誘発による増
16 加の初期メディエーターであることを示すものである。

17
18 Kasahara *et al.* (2015)は、2つの ROCK アイソフォームである ROCK1 と ROCK2 のオゾン
19 誘導 AHR への寄与を調べるため、野生型マウス、ROCK1+/-マウス、ROCK 2+/-マウスを
20 空気あるいはオゾン(3 時間、2ppm)に曝露し、24 時間後にマウスを観察した。ROCK1 また
21 は ROCK2 のハプロ不全は、空気曝露マウスの気道反応性には影響を与えなかったが、気
22 管支肺胞洗浄(BAL)炎症細胞の増加にもかかわらず、オゾン誘発 AHR を減少させ、とりわ
23 け ROCK2+/-マウスで大きな減少を示した。野生型マウスと比較して、オゾン誘発 AHR に
24 関与するマトリックスタンパク質である BAL 中ヒアルロنانのオゾン誘発性増加は野生
25 型マウスよりも ROCK1+/-でのみ小さかった。オゾン誘導 AHR に寄与すると報告されてい
26 る他の炎症性分子(IL-17A、オステオポンチン、TNF- α)のオゾン誘発性の増加は、野生型と
27 ROCK1+/-あるいは ROCK2+/-マウスとで差異が見られなかった。また、炎症の誘導後に
28 ROCK1/ROCK2 阻害剤であるファスジルを投与することで、ファスジルによる治療後のオ
29 ゾン誘発 AHR の用量依存的な減少が観察された。オゾンは ROCK2 の肺における発現を増
30 加させたが、ROCK1 または RhoA は増加しなかった。ROCK2 阻害剤である SR3677 は、
31 ヒトの気道平滑筋細胞における収縮力を低下させたことから、気道平滑筋収縮における
32 ROCK2 の役割が確認された。これら結果により、オゾン誘導 AHR が ROCK を必要とする
33 ことが示された。一方、ヒアルロنانの ROCK1 依存性の変化が O₃ 誘導 AHR における
34 ROCK1 の役割に貢献している一方で、ROCK2 の役割は気道平滑筋収縮レベルという炎症
35 のより下流にあることが示唆された。

36

1 Zhu *et al.* (2016)は、BALB/c マウスに 0.1 から 1.0 ppm の O₃ を 3 時間/日で 7 日間曝露
2 した。酸化ストレス (活性酸素種とマロンジアルデヒド) と肺のサイトカイン、血清 IgE、
3 さらに病理組織学的検査と気道過敏性 (AHR) 試験により、オゾン曝露マウスの肺におけ
4 る炎症と損傷を評価した。更に、オゾン誘発肺障害の根本的なメカニズムを探るため、オ
5 ゾンの有効濃度における、ビタミン E (VE) の効果を評価した。免疫学的・炎症学的バイ
6 オマーカー (総免疫グロブリン (Ig) E および Th サイトカイン)、病理組織学的検査、AHR
7 評価の結果から、0.5ppm 以上の O₃ はマウスに炎症と肺障害を誘導し、この誘導は VE の
8 同時投与によって打ち消された。酸化ストレスの除去、Th2 反応と Ig 産生の減少、およ
9 び肺損傷の緩和が考えられた。また、Nrf2 の発現を増強し、抗酸化遺伝子である HO-1 お
10 よび NQO1 をアップレギュレートする抗酸化物質である VE が、酸化ストレスレベルを低
11 下させ、オゾン誘発肺障害を抑制することを示した。

12

13 Stober *et al.* (2017)は、TSG-6 が HA 誘発 AHR およびオゾン誘発 AHR の発症に不可欠で
14 あると仮定し、以下の解析を行った。TSG-6^{-/-}および TSG-6^{+/+}マウスを 2ppm の O₃ に 3
15 時間またはショートフラグメント HA (sHA) に曝露し、flexiVent を用いて AHR を解析し
16 た。sHA に対する AHR 応答は、外因性 TSG-6 の添加の有無および Rho-関連阻害剤、コイ
17 ルドコイル含有プロテインキナーゼ (ROCK) 阻害剤、ERK 阻害剤、または PI3K 阻害剤
18 の有無にかかわらず、TSG-6^{-/-}または TSG-6^{+/+}由来の気管リングの分離気管リング解析を
19 用いて評価した。シグナル伝達経路について、マウス気管由来の平滑筋細胞を *in vitro* で解
20 析した。TSG-6 の欠乏は、オゾン (*in vivo*) または sHA (*in vitro* および *in vivo*) 曝露後に
21 AHR を防ぐことが明らかになった。さらに、TSG-6^{-/-}気管リングの sHA に対する非応答性
22 は外因性 TSG-6 の添加によって逆転した。sHA は気道平滑筋細胞において、TSG-6 の存在
23 下でのみ RhoA、ERK、および Akt を急速に活性化した。ROCK、ERK、または PI3K/Akt
24 の阻害は、sHA/TSG-6 を介した AHR を阻害した。以上 の結果より、TSG-6 は、HA-HC
25 複合体の迅速な形成を促進するため、オゾンまたは sHA に応答する AHR に必要である。
26 sHA/TSG-6 効果は、RhoA、ERK、および PI3K/Akt シグナル伝達によって仲介される。

27

28 Wicher *et al.* (2017)は、O₃ は迷走神経を介して気道の過剰な反応と、好酸球を含む炎症細
29 胞の肺への動員を引き起こすことと、誘導された炎症細胞は曝露後 1 日では O₃ 誘発性の反
30 応を媒介するが、3 日後には保護的に作用することから、アレルギー感作および非感作モ
31 ルモットにおいて、新たに増殖誘導した好酸球の O₃ 誘発性の気道過敏症における役割につ
32 いて検証することを目的とし、卵白アルブミン感作または非感作の雌の Dunkin-Hartley モ
33 ルモットを 5-ブromo-2-デオキシウリジン (BrdU) で処理した後、空気または 2ppm の O₃
34 に 4 時間曝露させ、1 日後または 3 日後に迷走神経を介して誘発された気管支収縮を測定
35 するとともに骨髄、血液、および気管支肺胞洗浄液から炎症細胞を採取した。O₃ 曝露は非
36 感作モルモットにおいて好酸球の産生を誘導した。O₃ 曝露 1 日後の非感作モルモットでは、

1 成熟した好酸球が優勢であり、迷走神経を介して誘発される気管支収縮が増強された。非
2 感作モルモットにおいて、抗 IL-5 抗体またはエタネルセプト (TNF- α アンタゴニスト) 処
3 理により新たに増殖誘導する好酸球を枯渇させると曝露 3 日後の気管支収縮が悪化したこ
4 とから、O₃ 曝露により肺に新たに増殖誘導する好酸球が O₃ 誘発性の気道過敏性を抑制す
5 ると考えられた。感作モルモットでは、O₃ 誘発性の好酸球産生と、新たに増殖誘導された
6 好酸球の肺への動員の両方が起こらなかったことから、感作モルモットでは成熟した好酸
7 球が O₃ 誘発性の炎症反応を支配していると考えられた。抗 IL-5 抗体またはエタネルセプ
8 ト処理により成熟した好酸球を枯渇させると、感作モルモットにおける O₃ 誘発性の気道過
9 敏症が抑制された。O₃ 誘発性の好酸球産生は、抗 IL-5 抗体および TNF- α アンタゴニスト
10 処理またはアレルギー感作によって阻害される。今回用いた動物種では、成熟した好酸球
11 は気道過敏反応の増強と関連していたが、新たに増殖誘導された好酸球は気道過敏反応に
12 抑制的に働いていた。したがって、好酸球を標的とした介入は、アトピー性の患者では有
13 益であるが、非アトピー性の患者においては気道過敏性の解消を遅らせる可能性がある。
14

15 Michaudel *et al.* (2018)は、マウスでの急性オゾン曝露に対する肺の炎症における IL-33 及
16 びその受容体である ST2 の役割について研究を行った。ST2 欠損および IL33 欠損、IL-33
17 シトリンレポーター、および C57BL/6 (野生型) マウスを用い、すべての研究で一回のオ
18 ゾン曝露 (1 ppm, 1 時間) を行った。肺組織および気管支肺胞腔における細胞動員と、炎
19 症パラメーター、上皮バリア損傷、および気道過敏性 (AHR) を測定した。野生型マウス
20 において一回のオゾン曝露により、1 時間以内に上皮バリアが急速に破壊され、その後第 2
21 段階として、好中球動員、活性酸素種産生、AHR、および上皮および骨髄細胞における IL-33
22 発現の増加を伴う呼吸バリア損傷が起きた。IL-33 または IL-33 受容体/ST2 非存在下におい
23 て、タンパク質の漏出を伴う上皮細胞の損傷、骨髄細胞の補充および炎症がさらに増加す
24 るが、好中球における密着結合タンパク質である E-カドヘリンと密着結合タンパク質 1、
25 および活性酸素種の発現と AHR は減少した。ST2 中和は増強されたオゾン誘発性好中球
26 性炎症を再現した。しかしながら、GR-1 抗体を用いた骨髄細胞の欠乏は、オゾン誘発性の
27 肺の炎症、上皮細胞の損傷、およびタンパク質の漏出を減少させたが、組換えマウス IL-33
28 の投与は IL33 欠損マウスにおいて好中球の動員を減少させた。以上 の結果は、IL-33/ST2
29 軸の制御下でオゾンが骨髄細胞性の炎症性損傷に先行する即時のバリア損傷を引き起こす
30 ことを示している。それゆえに IL-33/ST2 シグナル伝達は、無傷の上皮バリアの維持と炎
31 症に重要である。
32

33 1. 1. 6. 宿主防御及びアレルギー反応に関する知見

34 Bouthillier *et al.* (1998)は、都市の粒子状物質と O₃ の吸入に対するラット肺の急性反応を
35 調べた。雄の Specific-pathogen-free Fischer 344 ラットに 0.8 ppm の O₃ 及び又は 40 mg/m³
36 の EHC-93 粒子を 4 時間/日で、1 日又は 3 日吸入曝露させ、曝露から 20 時間後に肺組織お

1 よび、中央腺房の中隔細胞の形態、BALF 中成分 (タンパク質、フィブロンectin、好中
2 球、マクロファージ) および、BAL からの洗浄細胞 (一酸化窒素、TNF- α 、MIP-2、ET-1)、
3 及び血中 ET-1 を解析した。EHC-93 粒子への曝露後に清浄空気に 20 時間曝露しても、急
4 性肺損傷は生じなかったが、EHC-93 粒子曝露により、肺胞マクロファージからの一酸化
5 窒素の産生が減少し、肺胞洗浄液中の細胞からの **macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)**
6 の分泌が増加した。O₃ を吸入すると、肺洗浄液中の好中球とタンパク質が増加した。O₃
7 単独曝露でも肺胞マクロファージの食作用と一酸化窒素産生が減少した。肺洗浄液中の細
8 胞による ET-1 分泌は 1 日の曝露では減少したが、3 日間の曝露では増加した。MIP-2 の分
9 泌に変化はなかった。EHC-93 粒子との複合曝露は、中央腺房における O₃ 誘発性の中隔細
10 胞性 (**septal cellularity**) を増強したが、O₃ 曝露に関連した肺胞好中球増加および BALF 中
11 タンパク質に測定可能な相乗効果はなかった。強化された中隔肥厚の増悪は、肺洗浄細
12 胞による MIP-2 と ET-1 の両方の産生増加と関連していた。興味深いことに、EHC-93 粒子
13 の吸入は ET-1 の血漿中濃度を増加させたが、この応答は、中心窩中隔組織の変化に対す
14 る O₃ と EHC-93 粒子の相乗効果とは関連していなかった。これは、毛細血管内皮生成ある
15 いは血管収縮性物質の透過性に対して、遠位に分布している粒子状物質の量が影響してい
16 ることを示唆している。総じて、汚染物質への単回曝露または 3 日間の連続曝露後で、同
17 様の影響パターンが観察された。これらの結果は、O₃ と粒子状物質の肺への急性影響に
18 関する疫学的証拠と一致しており、EHC-93 粒子曝露によって心血管への影響が誘発され
19 るメカニズムを示唆している。

20

21 Laskin *et al.* (1998a)は、O₃ の急性曝露が組織の損傷部位へのマクロファージの蓄積によ
22 って特徴付けられる炎症反応に関連しており、これらの細胞は、肺胞上皮細胞とともに活
23 性化され、一酸化窒素 (NO) などの細胞毒性を示す炎症性メディエーターを放出すること
24 から、O₃ 吸入後に増大する肺マクロファージおよび II 型上皮細胞の NO シンターゼの調節
25 機構について解析した。雌の Sprague-Dawley (**specific pathogen-free**) ラットに 2 ppm の O₃
26 を 3 時間吸入曝露させ、曝露から 24 時間後に単離した肺胞マクロファージおよび II 型上皮
27 細胞の NO 産生能力を評価した。炎症性メディエーターであるリポ多糖およびインターフ
28 ェロンガンマに応答して、肺胞マクロファージおよび II 型上皮細胞による NO 産生量が増
29 加した。O₃ 曝露は肺胞マクロファージおよび II 型上皮細胞における誘導性 NO シンターゼ
30 (**iNOS**) タンパク質および mRNA の発現を増加させるとともに、転写因子 NF- κ B 活性を
31 亢進させた。O₃ 曝露による肺胞マクロファージと II 型上皮細胞の NO 産生および iNOS タ
32 ンパク質の発現増加は、NF- κ B の活性を抑制するピロリジンジチオカルバメート (PDTC)
33 によって阻害されたが、O₃ 曝露群から単離したラットの細胞では、対照群と比較して PDTC
34 に対する感受性が低かった。ゲルシフトアッセイを使用した細胞核抽出物における NF- κ B
35 結合活性の測定では、O₃ 曝露は肺胞マクロファージおよび II 型上皮細胞における NF- κ B
36 結合活性を時間依存的に増加させ、O₃ 曝露後 12~24 時間で分離された場合に最大に達し

1 た。これらのデータから、著者らは NF- κ B シグナル伝達の活性の変化が、O₃ 吸入後の起炎
2 刺激に対する肺マクロファージおよび II 型上皮細胞の応答において重要であることを示唆
3 しているとした。

4
5 Laskin *et al.* (1998b)は、O₃ 曝露による肺傷害の誘導にかかわる肺マクロファージへの
6 影響機構について、サイトカインや NO 産生の面から検討した。特定病原体未感染の雌の
7 Sprague-Dawley ラットに 2 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露し、O₃ 曝露終了の 3~48 時
8 間後に、肺マクロファージを取り出し培養して、NO 産生、TNF- α 産生、タンパク質合
9 成について調べた。O₃ 曝露によって肺マクロファージからの NO 産生は増加し、LPS 及
10 び IFN- γ の存在下では、より増加が誘導されたが、iNOS の阻害剤である aminoguanidine
11 を加えると抑制された。TNF- α 産生については培養時間に依存的な増強がみられた。曝露
12 部位ではない肝臓における影響を調べるため、O₃ 曝露後に肝細胞を培養して NO 産生を測
13 定したところ、増加が認められ、急性期影響も誘導していることが示された。

14
15 Foster and Freed (1999)は、O₃ の肺におけるクリアランス機能への影響を探るため、1~3
16 才の雄のイヌの肺小葉下に ^{99m}Tc でラベル化した DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid)
17 を曝露した後、ろ過空気又は 400 ppb の O₃ を 6 時間、局所曝露し、O₃ 曝露終了の 1、7、
18 14 日後の DTPA 取り込みを調べた。その結果、O₃ 曝露終了の 1 日後に DTPA の取り込み
19 が上昇したが、7、14 日後には差がみられなかった。

20
21 Kleeberger *et al.* (2000)は、O₃ 曝露は、ヒトや動物に肺の血管透過性亢進と炎症を誘導す
22 ることから、O₃ 曝露による透過性亢進に関与する遺伝的要因を明らかにするために、O₃
23 に対して高感受性の C57BL/6J マウス、低感受性の C3H/HeJ マウス、及びその交配マウス
24 を用いて、量的形質遺伝子座の解析を行った。雄で 6~8 週齢の C57BL/6J マウス、C3H/HeJ
25 マウス、C3H/HeOuJ マウスに清浄空気又は 0.3 ppm の O₃ を 24、48、72 時間、BXH 組替
26 え近交系マウスには 72 時間吸入曝露させ、曝露終了後 1 時間以内に屠殺し、BALF 中のタ
27 ンパク質、多形核白血球割合により肺透過性及び炎症について評価した。これらの交配マ
28 ウスでは、第 4 染色体上に量的形質座位が同定され、TLR-4 がその原因遺伝子と考えられ
29 た。TLR の発現型の異なる C3H/HeJ と C3H/HeOuJ マウスへの 72 時間曝露の結果、
30 C3H/HeOuJ マウスでは BALF 中のタンパク質濃度がより高く、さらに、C3H/HeJ マウスの
31 みで曝露後の TLR-4 遺伝子発現の減少が認められた。以上 の結果から、第 4 染色体上の
32 量的形質座位、特に TLR-4 遺伝子が O₃ 曝露による透過性亢進に関与することが示された。

33
34 Neuhaus-Steinmetz *et al.* (2000)は、IgE 応答性の異なるマウスにおける OVA 感作への O₃
35 曝露の影響について検討するため、IgE 高応答性の BALB/c マウス及び低応答性の C57BL/6
36 マウスの雌 (6~8 週齢) に室内空気又は 180、250、500 μ g/m³ の O₃ を 4 時間/日、3 日/週

1 で4週間全身吸入曝露させると共に、OVAエアロゾルを20分/回、5回/週でO₃曝露中の4
2 週間吸入させることにより感作させた。OVAエアロゾル最終曝露の24時間後、メサコリ
3 ン刺激に対する気道反応性、皮膚過敏性を調べた。また、BALF、血液を採取し、血清中
4 抗体価、BALF中の細胞数、サイトカイン及びLTの産生について調べた。その結果、BALB/c
5 マウスでは、O₃曝露による濃度依存的な血清中IgE産生、サイトカイン産生、好酸球、リ
6 ンパ球の気道への集積によるTh(T-helper) 2型の反応の増加が見られた。BALB/cマウス
7 のO₃曝露+OVA感作群では、それらの反応は増強し、気道抵抗の上昇、皮膚反応の陽性率
8 増加も見られた。一方、C57BL/6マウスでは、O₃曝露+OVA感作群でのみTh2型の反応増
9 加が見られた。

10
11 Cohen *et al.* (2001)は、肺における細胞性免疫へのO₃曝露の影響におけるサイトカイン産
12 生の役割について検索した。雄のFISHER344ラットに清浄空気又は0.1、0.3 ppmのO₃を
13 4時間/日、5日/週で1、3週間、全身吸入曝露させた。最終曝露の24時間後、*Listeria*
14 *monocytogenes*を気管内投与し、1、48、72、96時間後、体調及び菌のクリアランスを観察
15 した。また、同時にBALF中のサイトカイン産生について測定した。一部のラットは曝露
16 終了後、*Listeria*菌の投与を行わず、1、48、72、96時間後の活性酸素代謝物の産生につい
17 て調べた。O₃の1週間曝露により、菌感染後の体調不良指標(息遣い、体のふるえ、目脂、
18 下痢、鼻水)には濃度依存的な悪化がみられ、肺における残存細菌量についても、濃度依
19 存的なクリアランス能低下がみられた。しかしながら、O₃の3週間曝露ではこれらは観察
20 されなかった。O₃の1週間曝露では0.1 ppmで、3週間曝露では0.3 ppmでBALF中のIL-1 α 、
21 TNF- α 、IFN- γ (interferon- γ)産生量の上昇がみられた。IFN- γ 存在下でのH₂O₂産生は、O₃
22 曝露による抑制が認められた。

23
24 Iijima *et al.* (2001)は、5週齢の雄のHartleyモルモット30匹にろ過空気又は0.4 ppmの
25 O₃を24時間/日、6.5日/週で5週間、全身吸入曝露させた。曝露期間中、OVA又は生理食
26 塩水を週1回、鼻腔内投与した。曝露期間中、モルモットをチャンバーから出して、OVA
27 投与後20分間のくしゃみ回数、鼻汁分泌量を調べ、OVA最終投与の24時間後に鼻上皮、
28 上皮組織中の好酸球、特定抗OVA-IgG、抗OVA-IgE抗体価を調べた。O₃曝露はOVA誘
29 発くしゃみと鼻分泌を増加させ、鼻過敏症を惹起した。また、鼻上皮下への好酸球浸潤を
30 増大させた。抗OVA-IgG産生はO₃曝露による増加傾向を示した。以上により、O₃曝露
31 は鼻の過敏症、好酸球浸潤を引き起こし、抗OVA-IgG産生を増加させることによってアレ
32 ルギー様症状を悪化させると結論した。

33
34 Koike *et al.* (2001)は、気道内細胞の抗原提示に関連する細胞表面分子の発現および補助
35 活性(accessory activity)に対するO₃吸入曝露の影響を調べた。Wistarラット(雄、8-10週齢、
36 n=3/群)にO₃を1.0ppmで3日間曝露させた後、採取したBALF中細胞の細胞表面分子発

1 現および補助活性を評価した。O₃ 曝露は、BALF 細胞上の Ia、B7.1、B7.2、および CD11b/c
2 の発現を増加させるとともに、末梢血単球における Ia、B7.1、B7.2 および CD11b/c の発現
3 を増加させた。また、単球の Ia 発現は O₃ 曝露ラットから得た BALF で処理することで増
4 加した。常在性肺泡マクロファージでは、Ia 抗原はほとんど発現されておらず、O₃ 曝露ラ
5 ットの BALF で共培養しても増加はしなかった。O₃ 曝露に応答して浸潤した好中球では、
6 Ia、B7.1 および B7.2 を発現していなかった。また、O₃ 曝露は、BAL 細胞とリンパ節細胞
7 及び抗原感作 T 細胞との混合リンパ球反応(MLR)における補助活性を増強した。これらの
8 結果は、O₃ 曝露に応答して浸潤する単球が、Ia および共刺激分子の発現および BAL 細胞
9 の補助的活性の増強を引き起こすことを示唆している。

10
11 Wagner *et al.* (2001a)は、O₃ 及びエンドトキシンの複合曝露が、それぞれの単独曝露にお
12 いて認められる炎症等の生体影響にどのように影響するか、また、その機構に好中球が関
13 与するかを検討するため、ウサギ抗ラット好中球抗血清を腹腔内投与し、好中球を排除し
14 た 10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラット及び正常ラットにろ過空気又は 0.5 ppm の O₃
15 を 8 時間/日で 3 日間吸入曝露させ、一部は曝露終了の 2 時間後又は 4 日後に屠殺した。
16 残りは O₃ 曝露の後、生理食塩水又は 20 µg のエンドトキシン(エンドトキシンとして LPS
17 を使用)を 1 回/日で 2 日間、鼻部投与し、投与の 6 時間後又は 3 日後に屠殺した。鼻部、
18 肺の組織を採取し、好中球数、粘液物質密度、ムチン遺伝子 rMuc5AC mRNA の解析、及
19 び組織形態学的検討を行った結果、上皮や炎症性の反応は、O₃ あるいはエンドトキシン
20 を単独で曝露するよりも複合曝露する方が大きくなること、その機構に好中球が関わる場
21 合と関わらない場合があることが示された。

22
23 Wagner *et al.* (2001b)は、O₃ 曝露による粘液細胞への影響に対するエンドトキシンの増強
24 効果に好中球が関与しているかを検討するため、10~12 週齢の雄の FISHER344/N ラット
25 にろ過空気又は 0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日で 3 日間吸入曝露させ(実験第 1~3 日)、曝露
26 終了直後にウサギ抗ラット好中球抗血清又はウサギ正常血清で処置し(第 3 日)、翌日から
27 生理食塩水又は 100µg のエンドトキシン(LPS)を 1 回/日で 2 日間鼻部投与した(実験第
28 4~5 日)。エンドトキシン又は生理食塩水の 2 日目の投与の 6 時間後又は 3 日後に鼻部組
29 織を採取し、鼻移行上皮の好中球数と粘液物質濃度、ムチン遺伝子 rMuc-5AC mRNA の発現
30 の解析及び病理組織学的解析を行った。O₃ 曝露の有無に関わらず、エンドトキシン曝露に
31 による好中球の一時的浸潤がみられ、また、O₃ 曝露による粘液物質の増加反応をエンドトキ
32 シンが増強させたが、好中球を欠損させたラットでは、これらの影響は抑制された。O₃ 曝
33 露により鼻移行上皮における rMuc-5AC mRNA 発現は増加し、エンドトキシンはこれを増
34 強させたが、エンドトキシンによる rMuc-5AC mRNA 発現の増加に対し、好中球欠損は影
35 響しなかった。

36 Cohen *et al.* (2002)は、低濃度の O₃ 曝露による肺における感染防御機構への影響に関し、

1 時間依存的な適応機構、濃度依存的な適応機構について肺胞マクロファージとリンパ球機
2 能に着目して検討した。特定病原体未感染の雄の FISHER344 ラットに清浄空気又は 0.1、
3 0.3 ppm の O₃ を 4 時間/日、5 日/週で 1、3 週間全身吸入曝露した。最終曝露の 24 時間後、
4 *Listeria monocytogenes* を気管内投与し、48、96 時間後に、クリアランス能を観察した。0.1
5 ppm の O₃ は 1 週間曝露により自然免疫の *Listeria* 感染抵抗性に影響し、0.3 ppm では 1 週
6 間曝露により自然免疫、獲得免疫での *Listeria* 感染抵抗性に影響し、3 週間の曝露でも影響
7 が認められた。自然免疫と獲得免疫では、O₃ 曝露の期間、濃度でそれぞれ異なる反応パ
8 ターンを示した。別ラットについて、最終曝露の 24 時間後、リンパ球、肺胞マクロファージ
9 を採取し、リンパ球増殖、リンパ球表面マーカーを観察したところ、肺から単離したリン
10 パ球の増殖反応では、0.1 ppm の 1 週間曝露で ConA (concanavalin A) 刺激に対する増殖
11 反応の増加が顕著であった。細胞表面マーカー検索では、IL-2 受容体である CD25 陽性細
12 胞が 0.1 ppm の 3 週間曝露で上昇した。Zymosan 刺激実験で、O₃ の 1 週間曝露によって肺
13 胞マクロファージからの O₂⁻ 産生は増加し、H₂O₂ 産生は抑制された。一方、O₃ の 3 週間曝
14 露でラットの肺胞マクロファージにそれらの影響がみられなかった。

15

16 Depuydt *et al.* (2002)は、OVA (ovalbumin) 感作、誘発によるアレルギーモデルを用いて、
17 O₃ 曝露が感作に影響するのか、誘発に作用するのかを検討した。雄の C57BL/6 マウスを 6
18 群に分け、実験第 1~3 群では、実験第 0 日に *in vitro* で OVA 刺激した樹状細胞をそれぞれ
19 10⁶ (1 群)、10⁵ (2 群)、10⁴ 個 (3 群)、気管内投与した。樹状細胞投与の 2 日前~2 日後
20 (実験第-2 日~第 2 日) に 0.1 ppm の O₃ 又は清浄空気を 4 時間/日で曝露させ、第 14~20
21 日に OVA エアロゾルによる感作を行った。実験第 4~6 群は、実験第 0 日に OVA 刺激し
22 た樹状細胞を 10⁵ 個、気管内投与し、第 14~20 日に OVA エアロゾル又は PBS (リン酸緩
23 衝生理食塩水: phosphate buffered saline) による感作及び 0.1 ppm の O₃ 又は空気の 4 時間/
24 日での曝露を行った (4 群: OVA+O₃、5 群: OVA+空気、6 群: PBS+O₃)。いずれのマウスも
25 実験第 21 日に BALF、肺組織を採取し、細胞学的、組織学的指標により気道炎症について
26 観察した。その結果、抗原感作中に O₃ 曝露を行っても気道炎症には影響を与えないが (1
27 ~3 群)、既に感作されているマウスに対し、抗原誘発時に O₃ を曝露することにより (4
28 群) 好酸球やリンパ球の増加がみられた。

29 Fakhrzadeh *et al.* (2002)は、O₃ により誘導された肺炎症と肺組織の傷害における NO の作
30 用について検討するため、8~16 週齢の雌の野生型の C57BL6X129 マウス及び iNOS (誘導
31 型一酸化窒素合成酵素: inducible nitric oxide synthase) 欠損マウスに清浄空気又は 0.8 ppm
32 の O₃ を 3 時間全身吸入曝露させた。曝露終了直後、24、48、72 時間後に BALF、肺胞マ
33 クロファージを採取し、BALF 中のタンパク質と細胞数、24~72 時間培養した肺胞マクロ
34 ファージの NO、ペルオキシ亜硝酸、スーパーオキシドアニオン、プロスタグランジン E2
35 の産生について観察した。野生型マウスにおいて、BALF 中のタンパク質、細胞は O₃ 曝露
36 後 24~48 時間後をピークに時間依存的に上昇した。肺胞マクロファージにおける NO、ペ

1 ルオキシ亜硝酸の産生量については、IFN- γ 、LPS と共に培養すると、O₃ 曝露後 24~48 時
2 間後をピークに時間依存的に上昇し、72 時間後までには対照レベルに向けて減少を始めた。
3 肺胞マクロファージにおけるスーパーオキシドアニオンとプロスタグランジン E₂ の産生
4 も上昇した。一方、iNOS 欠損マウスから採取された肺胞マクロファージは O₃ 曝露によっ
5 ても反応性中間体であるペルオキシ亜硝酸の産生は認められなかった。BALF 中のタンパ
6 ク質と細胞の測定結果によると iNOS 欠損マウスは、O₃ による炎症と組織傷害から防御さ
7 れた。これらの結果により、NO は iNOS を介して産生され、その反応性酸化物であるペル
8 オキシ亜硝酸は O₃ により誘発される炎症性メディエーターの放出と組織傷害に重要な役
9 割を果たしている可能性が示唆された。

10
11 Johnston *et al.* (2002)は、O₃ 曝露による気道傷害をエンドトキシンが増悪するかを検討す
12 るため、8 週齢の雄の C57BL/6J マウス 12 匹に、ろ過空気又は 1.0 ppm の O₃ を 24 時間、
13 別のマウス 12 匹にろ過空気又は LPS 37.5 EU (1 EU = 100 pg LPS) のエアロゾルを 10 分
14 間、全身吸入曝露させた。さらに、12 匹のマウスに O₃ を 24 時間曝露させ、曝露終了直後
15 に LPS エアロゾルを 10 分間曝露させた。エアロゾルの粒径は空気動力的中央粒子径 0.6
16 μm であった。いずれのマウスについても曝露終了の 4、24 時間後に BALF、肺組織を採取
17 し、BALF 中の細胞数、タンパク質量、LDH、 β -グルクロニダーゼ、肺組織のサイトカイン、
18 ケモカイン遺伝子発現について検討した。O₃ 及び LPS に曝露した群では、24 時間の
19 回復期間の後、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2、MCP-1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-6、MIF をコ
20 ードする mRNA が、O₃ 又は LPS の単独曝露群と比較して増加した。この結果から、LPS
21 は O₃ の炎症惹起作用を増強することが示された。

22
23 Laskin *et al.* (2002)は、O₃ 曝露による肺胞マクロファージ活性化機構を解明するため、8
24 ~16 週齢の雌の C57BL6 マウス、iNOS 欠損の C57BL6x129 マウス、Cu, Zn SOD 過剰発現
25 の C57BL6xCBA/J マウス及び NF- κ B p50 欠損の C57BL6x129 マウスに清浄空気又は 0.8 ppm
26 の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露した。曝露終了の 48 時間後に BALF を採取し、炎症性細胞
27 数、タンパク質量を調べた。また、曝露終了の直後又は 3、6、24、48 時間後に肺胞マク
28 ロファージを採取し、肺胞マクロファージの産生する NO 及びペルオキシ亜硝酸量 (曝露 48
29 時間後のマクロファージのみ)、NF- κ B 及び STAT (シグナル伝達兼転写活性化因子: signal
30 transducer and activator of transcription) -1 のシグナル伝達、STAT-1、PI3- K (Phosphoinositide
31 3-kinase) 及び PK (protein kinase) B の発現 (曝露 0~24 時間後のマクロファージのみ) に
32 ついて検討した。O₃ 曝露により肺胞マクロファージの iNOS、NO、ペルオキシ亜硝酸産生
33 は増加するが、iNOS 欠損マウス及び Cu, Zn SOD 過剰発現マウスではこの影響はみられな
34 かった。iNOS 欠損マウス及び Cu, Zn SOD 過剰発現マウスでは BALF 中のタンパク質量を
35 指標とした O₃ の毒性もみられなかった。iNOS 遺伝子の promoter/enhancer 部位に NF- κ B と
36 STAT-1 の結合部位があり、O₃ 曝露によって、この NF- κ B の急速かつ持続的な活性化が認

められた。PI3-K、PKB は NF- κ B の活性を調節しているが、これらについても O₃ に曝露したマウスから採取した肺胞マクロファージにおける増加が認められた。O₃ 曝露した NF- κ B p50 欠損マウスから採取した肺胞マクロファージでは、このような反応性中間体の産生が認められず、O₃ 毒性から防御されていたことから、肺傷害における NF- κ B シグナル情報伝達経路が重要であることが示された。さらに、O₃ 曝露により肺胞マクロファージにおける STAT-1 活性や発現が上昇していることが示された。以上の結果から、炎症過程において重要な遺伝子の発現を調整するシグナル情報伝達経路が O₃ 毒性に関与していることが示唆された。

Schlesinger *et al.* (2002a) は、雌雄の Hartley モルモットに清浄空気又は 0.1、0.3 ppm の O₃ を 4 時間/日、4 日/週で 24 週間吸入曝露させた。既存のアトピーや曝露中の感作の影響を検討するため、正常動物、OVA の 4 日間吸入曝露により感作させることでアトピーを誘導し O₃ 曝露まで 28 日間おいたモルモット、O₃ 曝露開始と同時に OVA 感作させたモルモットを用いた。曝露終了 1 週間後、又は 9 週間後に屠殺、血液を採取し、抗体価を調べた。また、BALF、肺組織を採取し、気道炎症、酸化ストレスに関する指標を調べた。気道反応性については、O₃ 曝露中は 4 週間毎に測定し、曝露終了 9 週間後まで飼育したモルモットについては曝露後 4、8 週目にも測定した。O₃ 曝露は正常モルモットに気道過敏性を誘発しなかったが、OVA による感作が O₃ 曝露前か同時かによらず、アトピーを誘導したモルモットの気道過敏性を増悪させ、この影響は曝露終了後、少なくとも 4 週間は持続した。O₃ による気道過敏性への増悪影響と BALF や肺組織における気道炎症の指標との間には相関は認められなかったが、抗原特異的抗体価とは相関が認められた。

Wagner *et al.* (2002) は、O₃ への反復曝露によって実験動物の鼻粘膜では炎症及び粘液細胞異形成が起き、ヒトにおいても、アレルギー性鼻炎の場合には同様の反応が起こることから、O₃ 曝露がアレルギー性鼻炎に関連する炎症反応及び上皮反応を亢進する、という仮説を検証するため、10~12 週齢の雄の Brown Norway ラットにろ過空気又は 0.5 ppm の O₃ を 8 時間全身吸入曝露させ、その直後に生理食塩水又は 1% の OVA を 50 μ L 鼻腔に投与する手続きを 1 回のみ実施、あるいは連続 3 日間反復した。処理終了の 24 時間後に屠殺、鼻組織を採取し、上皮細胞、好中球、好酸球の数及び上皮（上顎甲介鼻部移行上皮、鼻部隔膜気道上皮）細胞間における粘液物質の体積密度の光学顕微鏡検査及び形態計測解析を行った。また、屠殺 2 時間前に BrdU を腹腔内投与し、上皮 BrdU 標識化細胞数を調べた。1 回の OVA 投与により、好中球及び好酸球がすべての鼻組織の粘膜下組織へと浸潤した。O₃ 曝露は、OVA 投与マウスの顎骨鼻甲介において更に好酸球性を増加させたが、その他の鼻組織では炎症を促進しなかった。O₃ 及び OVA の 3 日間曝露の後には、通常、粘液分泌細胞を含まない領域に粘液を含む細胞（すなわち粘液細胞化生）が出現すると共に、顎骨鼻甲介に沿って並んでいる鼻の移行上皮で上皮細胞数が増加した。OVA の複数回投与では、

1 中隔に沿う呼吸上皮中で上皮粘液物質が増加したが、上皮細胞数は増加しなかった。また、
2 O₃及びOVAの3日間曝露により、中隔における上皮内粘液物質はOVA単独曝露よりも大
3 きく増加した。以上の結果は、O₃曝露がアレルゲン投与と関連する上皮反応及び炎症反
4 応を増悪させることを明らかにした。さらに、O₃及びアレルゲンの複合曝露により、いず
5 れか一方の物質のみの曝露によって誘導された鼻の粘液物質産生が促進された。

6
7 Yamauchi *et al.* (2002)は、6週齢、雄のC57BL/6マウスに対し、実験第0日及び第7日に
8 それぞれ50 µgのOVA+1 mgのAl(OH)₃を腹腔内投与することで感作させ、第14、21、
9 28、35日にOVAエアロゾルを30分ずつ3回曝露させた。非感作マウスはAl(OH)₃を腹
10 腔内投与し、生理食塩水エアロゾルを曝露させた。最終のエアロゾル曝露の24時間後に気
11 道反応性を測定した。また、最終エアロゾル曝露の3時間後に感作マウス及び非感作マウ
12 スにろ過空気又は1 ppmのO₃を1時間吸入曝露させた。曝露開始前及び曝露中の肺機能
13 指標について観察し、曝露終了後、BALF、動脈血を採取し、BALF中のICAM-1、TNF-α
14 の発現について調べた。アレルギー性気道炎症を起こしたマウスにO₃を急性曝露すると、
15 ろ過空気の曝露と比較して、肺コンプライアンスの低下や呼吸回数の減少、動脈血酸素分
16 圧低下といった肺機能障害が顕著に認められた。

17
18 Schelegle *et al.* (2003a)は、O₃曝露がサル呼吸器神経の発達に及ぼす影響を調べるため、
19 HMDA (House dust mite allergen, ハウスダストダニ抗原) 感作によるぜん息様病態発症モ
20 デルとしたアカゲザルと、非感作のアカゲサル(30日齢)にろ過空気又は0.5 ppmのO₃
21 を8時間/日で5日間全身吸入曝露させ、その後9日間ろ過空気回復させるサイクルを11
22 回反復した(各群6匹)。ぜん息様病態発症モデルのアカゲサルは、生後14日及び28日に
23 HDMAを皮下投与することにより感作させ、曝露サイクル中のろ過空気又はO₃曝露第3
24 ~5日にHDMAエアロゾルを2時間/日、曝露させた。血清IgE、ヒスタミン、気道抵抗性、
25 気道反応性、及び肺組織の病理組織学的検索による構造のリモデリングについて調べた。
26 また、BALFを採取し、好酸球の浸潤を調べた。O₃曝露、HDMA感作それぞれ単独の処置
27 では、好酸球の上気道、終末気管支への浸潤が顕著な増加を示したが、それ以外の気道へ
28 の影響は軽度のものしか認められなかった。一方、O₃曝露とHDMA感作処置を両方実施
29 したサルでは血清IgE、血清ヒスタミン量、気道への好酸球の浸潤など、アレルギー症状
30 の指標が増加し、気道抵抗性や反応性に関連して気道構造の変化が認められた。

31
32 Wagner *et al.* (2003)は、大気中汚染物質への複合曝露は、単一汚染物質の吸入曝露よりも
33 気道上皮への中毒性が高くなる可能性があり、既報においてO₃及びアレルゲンや細菌のエ
34 ンドトキシン等、生物由来の炎症性物質への経鼻吸入による複合曝露によってラットの上
35 皮反応及び炎症反応が増大していたことから、げっ歯類の肺気道中の呼吸上皮に及ぼすO₃
36 及びエンドトキシンの毒性相互作用を検討した。10~12週齢の雄のFISHER344/Nラット

1 に 0、2、20 μg のエンドトキシン (LPS) を鼻腔に投与し、6 時間後にろ過空気又は 1.0 ppm
2 の O_3 を 8 時間/日で全身吸入曝露させる手続きを 2 日間反復した。実験第 5 日目に BALF
3 を採取し、BALF 中のマクロファージ数、リンパ球数、好中球数、粘液物質分泌量及びエ
4 ラスターゼ量を調べ、さらに、肺組織を処理し、上皮内粘液物質密度、上皮細胞密度の光
5 学顕鏡検査及び形態計測解析を行った。また、誘導気管支を顕微解剖し定量的 RT-PCR
6 により分析し、呼吸上皮に存在する定常状態のムチン遺伝子 rMuc-5AC mRNA 濃度を定量
7 した。エンドトキシン投与によって BALF 中の好中球数が用量依存的に増加し、20 μg の
8 エンドトキシンを投与された O_3 曝露ラットでは 2 倍に増加した。20 μg のエンドトキシン
9 を投与されたラットの BALF 中に含まれる rMuc-5AC mRNA は増加したが、2 μg のエンド
10 トキシン投与ラットでは増加しなかった。 O_3 への曝露のみでは粘液過分泌が起こらなかつ
11 たが、20 μg 又は 2 μg のエンドトキシンを投与されたラットでは O_3 曝露によって粘液分泌
12 が促進された。空気又は O_3 のみに曝露させたラットの気道中上皮内粘液物質量は少なかつ
13 たが、エンドトキシン投与により気道上皮内粘液物質量は用量依存的に増加し、エンドト
14 キシン投与後に O_3 曝露させたラットでは 2 倍に増加した。2、20 μg のエンドトキシン投
15 与によって軸性の肺気道中で rMuc5AC の形質発現が誘導され、20 μg のエンドトキシン投
16 与ラットでは O_3 への曝露によって更に発現が増加した。以上 の結果から、ラット肺気道
17 中では O_3 への曝露によって生物由来物質に起因する好中球性の炎症、粘液産生と分泌が促
18 進されることが示された。

19

20 Funabashi *et al.* (2004)は、OVA によって感作させた 6 週齢の雄の C57BL/6 マウス及び対
21 照マウスに清浄空気又は 1.0 ppm の O_3 を 6 時間/日、5 日/週で 5 週間、全身吸入曝露させ
22 た (各群 6~8 匹)。感作マウスには実験第 0、7 日に OVA を腹腔内投与し、第 14、21、
23 28、35 日に OVA エアロゾルを 30 分ずつ 3 回吸入曝露させた。対照マウスは $\text{Al}(\text{OH})_3$
24 を腹腔内投与し、生理食塩水エアロゾルを吸入曝露させた。最終の感作の 3 時間後、肺機
25 能ベースライン値を測定した。引き続き、1.0 ppm の O_3 を 1 時間、気管内挿管により吸引
26 させ、曝露中の肺機能を測定し、曝露終了直後に血液ガス測定、及び肺の病理組織学検討
27 を行った。 O_3 反復曝露、OVA 感作による肺機能のベースライン値への影響はなかった。1
28 時間の O_3 曝露中の肺機能については、対照マウスではベースライン値からの変化は認めら
29 れず、OVA 感作群でも他群との差はみられなかった。OVA 感作+ O_3 反復曝露群では O_3 曝
30 露中、肺抵抗は増加、動的コンプライアンスは低下し、 O_3 曝露群との差がみられた。 O_3
31 の反復曝露によって肺胞上皮の増生も認められた。以上 の結果により、呼吸器のアレルギー
32 ーは O_3 の反復曝露により増悪するリスク要因である可能性が示唆された。

33

34 Koike *et al.* (2004)は、 O_3 の反復吸入曝露が、抗原提示活性、BAL 細胞中の抗原提示と関
35 連する細胞表面分子(Ia, B7.1, B7.2 and CD11b/c)の表面発現、アレルギー性喘息様症状に与
36 える影響を調べた。Wistar ラット (雄、8-10 週齢、n=4/群) に 2 週間ごとに 3 日間、0.3、

1 0.56、1 ppm の O₃ またはろ過空気を曝露するサイクルを 3 回繰り返した。抗原提示活性は
2 抗原特異 T 細胞増殖により評価し、細胞表面分子発現はフローサイトメトリーによって評
3 価した。また、O₃ 曝露後に 1%OVA または生理食塩水のエアロゾルを 10 分間吸入させ、
4 気道抵抗の変化を評価した。O₃ の反復曝露は、BALF 細胞の抗原提示活性、細胞表面分子
5 (Ia, B7.1, B7.2, CD11b/c) の発現、共刺激分子(Ia と B7.1, Ia と B7.2, Ia と CD11b/c) の発現を濃
6 度依存的に上昇させた。また、O₃ 反復曝露は気道抵抗を増加させた。気道抵抗の増加は
7 OVA 吸入群で生理食塩水吸入群よりも高かった。これらの結果は、O₃ 曝露が抗原提示活
8 性を濃度依存的に増加し、それによって気道抵抗を含むアレルギー症状を悪化させること
9 を示唆している。

10
11 Koike and Kobayashi (2004) は、O₃ 曝露がアレルギー症状を悪化させるメカニズムについ
12 て調べるため、ラットに O₃ を亜急性で吸入曝露させ、肺における抗原提示活性に与える影
13 響を評価した。Wistar ラット (雄、8-10 週齢、n=3/群) を 1 ppm の O₃ に 3 日間曝露し、全
14 肺細胞及び樹状細胞の抗原提示活性を T 細胞の増殖によって評価した。また肺切片から調
15 製した肺全細胞における Ia 及び共刺激分子(B7.1, B7.2, CD11b/c)発現をフローサイトメト
16 リーによって測定し、肺間質の Ia 陽性細胞、樹状細胞、マクロファージ、B 細胞の数を免
17 疫組織化学的に評価した。O₃ 曝露は肺全細胞と肺樹状細胞の抗原提示活性、抗原提示関連
18 分子の発現 (B7.2 単独発現、Ia と B7.2 の共発現、Ia と CD11b/c の共発現)、および肺組織
19 における Ia 発現細胞数および樹状細胞数を増加させた。これらの結果は、O₃ 曝露が、細
20 胞表面上の抗原提示に係る分子の発現増加および肺における抗原提示細胞の数を増加させ
21 ることで、肺細胞の抗原提示活性を増強することを示唆している

22
23 Last *et al.* (2004)は、アレルギー誘発性気道炎症モデルマウスを用いて、O₃ の吸入曝露に
24 よる気道炎症及びリモデリングへの影響を検討した。OVA 感作した BALB/c マウス (n=3-6
25 匹) に 0.2 または 0.5ppm の O₃ を 8 時間/日で 2 週間曝露し、その 4 週間前または 4 週間後
26 に OVA エアロゾルを曝露した。別のマウス群では、O₃ の連続または断続的曝露と並行し
27 て OVA エアロゾルを 6 週間曝露した。曝露期間後に肺洗浄液中の細胞分画評価および染
28 色肺切片の組織学的評価によって肺の炎症状態を調べた。また、肺構造の変化 (気道線維
29 化) を肺ホモジネートを用いた定量的生化学分析によって調べた。4 週間の O₃ 曝露と並行
30 して OVA エアロゾルに曝露したマウスでは、非 O₃ 曝露群と比べて肺洗浄液中の総細胞数
31 が減少しており、また OVA 単独曝露マウスの肺洗浄液とも差異が認められた。OVA 曝露
32 の前に O₃ を 2 週間曝露させたマウスの肺洗浄液では、マクロファージの割合が高く、リン
33 パ球および好酸球の割合が低かった。OVA 曝露後に 2 週間 O₃ を曝露させたマウスの肺洗
34 浄液では、マクロファージの割合は中程度で、好酸球の割合が低く、リンパ球の割合が高
35 かった。O₃、OVA 同時曝露マウスの肺洗浄液では、マクロファージの割合が O₃0.2ppm で
36 高く、好酸球の割合が高かった。OVA と 0.2 ppm O₃ の同時曝露群は、OVA 単独曝露群と

(案)

1 比較して、気道における杯細胞の増加が生じた (OVA+O₃6 週間曝露では総細胞の 43%、
2 OVA 単独曝露では 25%)。試験した O₃ 濃度では気道線維化に変化は見られなかったが、
3 OVA と 0.2 ppm O₃ の同時曝露マウスでは、杯細胞過形成が増強した。これらの結果から、
4 OVA と O₃ の同時曝露により杯細胞過形成が増強されることが示唆された。

5
6 Steerenberg *et al.* (2004)は、粒子状物質が T ヘルパー2 (Th2) 応答に対する T 細胞性免疫
7 応答を増強させる可能性があり、その結果 Th1 応答の発達は抑制されることで感染抵抗性
8 が抑制される可能性がことから、ラットにおけるリステリア菌呼吸器感染症に対するディー
9 ゼル排気粒子 (DEP) と都市粒子状物質 (EHC-93、オタワダスト) への曝露の影響を調べ
10 た。この仮説は O₃ で既に確認されていることから、O₃ をポジティブコントロールとして
11 使用した。Wistar ラットを O₃ (2 mg/m³, 24 時間/日、7 日間)、DEP または EHC-93 (50 µg/
12 ラット、鼻腔内に 7 日間連続投与) に曝露させた。最後の曝露から 24 時間後、ラット気管
13 内に *L. monocytogenes* (1 x 10⁶ L) を投与し、*L. monocytogenes* の数を 3、4 および 5 日後
14 に測定した。O₃ に曝露されたラットにおいて *L. monocytogenes* 数の増加が、肺と脾臓にお
15 いて 3 回の測定すべてで観察された。ただし、DEP または EHC-93 に曝露したラットで見
16 つかった細菌数については、いずれの測定においても生理食塩水処理グループと比較して
17 差はなかった。これらの結果は、DEP または EHC-93 への曝露がラットの呼吸器感染に対
18 する耐性を低下させるという仮説を支持しなかった。

19
20 Feng *et al.* (2006)は、O₃ 曝露が胸腺の未熟な T 細胞の分化に与える影響を検討するために、
21 5 週齢の雄の BALB/c マウスにろ過空気又は 0.6 ppm の O₃ を 10 時間/日で 15 日間、全身吸
22 入曝露させた。O₃ 曝露マウスの一部に、64mg/kg のカテキン又は 20ml/kg の紅茶抽出物を
23 1 回/日で曝露 2 日前から曝露終了まで胃挿管によって投与した。曝露後、脾臓、胸腺の単
24 核細胞を採取し、脾臓単核細胞についてコンカナバリン A 刺激による脾臓リンパ球系細胞
25 の増殖、リンパ球サブセット、サイトカイン産生、ナチュラルキラー細胞活性、胸腺単核
26 細胞についてマウス IL-7 刺激による CD4-CD8-胸腺細胞増殖を観察した。O₃ 曝露はコンカ
27 ナバリン A 刺激による脾臓 T 細胞の増殖を抑制したが、抗酸化物質であるカテキンや紅茶
28 抽出物の投与で増殖が回復した。また、O₃ により脾臓細胞中の CD4+あるいは CD28+細胞
29 の割合が減少し、Con A 刺激による脾臓細胞からの IL-2 産生は減少し、IFN-γ 産生は増加
30 した。ナチュラルキラー細胞を活性化する IL-2 の減少のため、ナチュラルキラー細胞活性
31 も減少した。O₃ 曝露により胸腺の未熟な T 細胞の IL-7 刺激による増殖は顕著に亢進した。
32 次に 10 週齢の雌の BALB/c マウス (8 匹) に OVA を最初に腹腔内投与した日を第 0 日と
33 して、第 7 日に再度腹腔内投与、第 19 日に静脈注射し、ろ過空気又は O₃ を-5 日~第 22
34 日まで曝露させた。第 22 日に屠殺し、脾臓単核細胞を採取し、OVA と共に 5 日間培養し、
35 抗原特異的 T 細胞増殖について測定した結果、OVA で感作したマウスに O₃ を曝露した場
36 合に抗原特異的 T 細胞の増殖は減少した。

1
2 Jang *et al.* (2006)は、5～6 週齢の雌の BALB/c マウスに 10 μ g の OVA とアジュバント
3 KAl(SO₄)₂を実験開始第 1、14 日に腹腔内投与し、第 21～23 日に 30 分/日で 1 %の OVA
4 エアロゾルに曝露させることによってアレルギー性気道疾患モデルを作成し、第 24 日から、
5 ろ過空気又は 2 ppm の O₃を 8 時間/日で 4、8、12 週間、全身吸入曝露した。対照群には、
6 アジュバント KAl(SO₄)₂投与、生理食塩水エアロゾル曝露を行った。O₃曝露直前、直後
7 に Penh(enhanced pause)、肺組織変化、BALF 中の炎症細胞、サイトカイン産生の分析を行
8 った。Penh は、4、8、12 週間の O₃曝露によって低下が認められ、気管支、肺胞における
9 粘液分泌細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞等は時間依存性の増加を示した。IL-4/IFN- γ の
10 比は、O₃曝露群では、ろ過空気曝露群と比較して増加した。以上の結果から、アレルギー
11 気道炎症と関連する気道過敏性の亢進は O₃長期曝露中持続せず、大気汚染物質反復曝露
12 による気道リモデリングや適応機構が、気道過敏性に対する防御として働くことが示唆さ
13 れた。

14
15 Joad *et al.* (2006)は、抗原により感作した動物の抗原反復吸入曝露による気管支、呼吸細
16 気管支におけるアレルギー反応惹起に対する O₃曝露の影響を検討するため、生後 14、28
17 日に HDMA (ハウスダストダニ抗原)による感作を行った生後 1 か月のアカゲサル 23 匹
18 に対し、(1) ろ過空気曝露、(2) 抗原エアロゾルを 2 時間/日で 3 日間(第 3～5 日)曝露させ、
19 残りの 11 日間休息させるサイクル、(3) 0.5 ppm の O₃を 6 時間/日で 5 日間曝露させ、9
20 日間休息させるサイクル、(4) O₃を 5 日間、そのうち最後の 3 日間は抗原エアロゾルも
21 曝露させ、9 日間休息させるサイクル、のいずれかの全身吸入曝露サイクルを 11 回反復し
22 た。最終曝露の 3～5 日後、気管支、呼吸細気管支を採取し、メサコリンに対する反応性、
23 好酸球数、肺神経内分泌細胞について観察した。メサコリンに対する反応性については、
24 気管支では抗原曝露により、呼吸細気管支では O₃及び抗原の曝露により亢進した。好酸球
25 については、気管支では抗原単独あるいは O₃及び抗原の曝露により、呼吸細気管支では抗
26 原曝露により増加した。気道反応性は、気管支では好酸球数、肺神経内分泌細胞数と相関
27 したが、呼吸細気管支では相関しなかった。以上の結果から、抗原曝露によるアレルギー
28 反応に伴う気道反応性への影響に及ぼす O₃の影響が、気道の部位により異なることが示さ
29 れた。

30 Johnston *et al.* (2006a)は、環境汚染物質による肺の発達への影響について調べるため、4、
31 10、56 日齢の C57BL/6 マウスに O₃、LPS (リポ多糖類)を単独又は複合で曝露させた。
32 LPS 曝露群については LPS エアロゾルを 10 分間、全身吸入曝露させ (用量 26EU (1 EU =
33 100 pg LPS) 相当)、0.5、1、4 時間回復させてから屠殺した。O₃曝露群については 1、2.5 ppm
34 の O₃を 4 時間、全身吸入曝露させ、曝露終了直後に屠殺した。LPS+O₃連続曝露群につい
35 ては、LPS 曝露後、直ちに 2.5 ppm の O₃を曝露させ、曝露終了直後に屠殺した。対照群に
36 はろ過空気を曝露させた。肺における遺伝子発現を調べた結果、O₃曝露により、c-fos、c-jun

1 の遺伝子発現は、すべての日齢のマウスで濃度に依存して増加したが、TLR4、TLR2 の遺
2 伝子発現は 10、56 日齢のマウスでのみ増加した。一方、LPS 曝露による c-fos、c-jun の遺
3 伝子発現の増加は、曝露 0.5、1 時間後の 10、56 日齢マウスでのみ認められた。LPS と O₃
4 の連続曝露では、10、56 日齢のマウスで IL-1 β 、TNF- α 、TLR2、TLR4、c-jun、c-fos の遺
5 伝子が増加し、4 日齢マウスでは TNF- α 、c-jun、c-fos の遺伝子のみが増加した。以上 の
6 結果は、LPS 及び O₃ の連続曝露は年齢に依存する複数のシグナル伝達経路を誘導すること
7 を示唆する。

8 Hollingsworth *et al.* (2007)は、O₃ 急性曝露による肺における自然免疫への影響について解
9 明するため、6~8 週齢の雄の C57BL/6J マウスにろ過空気又は 2 ppm の O₃ を 3 時間全身吸
10 入曝露し、その後 0、4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の LPS エアロゾルを 2.5 時間吸入曝露した。O₃ 曝露の 1、2、
11 3 日後にメサコリン誘導による気道反応性を測定し、1、2、3、7 日後に肺組織、BALF を
12 採取し、肺組織変化、BALF 中の液性因子、炎症性細胞集団の構成細胞の変動、1 日後の
13 肺、血液におけるマクロファージ、単球のアポトーシス、BALF 中マクロファージ表面の
14 TLR4 発現分布について検討した。気道過敏性については、O₃ 曝露によって亢進し、LPS
15 の投与によって更に増悪し、曝露 7 日後まで継続した。炎症性タンパク質や血清中 IL-6 量
16 の増加も同様な変動を示した。しかしながら、LPS を投与した群における曝露 1、2 日後の
17 炎症性細胞の変化をみると、O₃ 曝露群では、ろ過空気曝露群と比較して細胞数の低下が認
18 められた。O₃ 曝露によって、マクロファージ上の TLR4 の発現が変化し、マクロファージ
19 や単球はアポトーシスを起こして減少することが明らかとなった。以上 の結果から、O₃
20 急性曝露は、肺における LPS に対する自然免疫系の反応を増強することが示された。

21 Kierstein *et al.* (2008)は、O₃ 曝露によるぜん息悪化の要因を明らかにするため、真菌
22 *Aspergillus fumigatus* によって感作、チャレンジを行った 8~12 週齢の雌の BALB/c マウス
23 及び感作を行わないマウスに室内空気又は 3 ppm の O₃ を 2 時間、全身吸入曝露した。O₃
24 曝露終了の 12 時間後 (アレルゲンチャレンジの 96 時間後) に、気道反応性、炎症性細胞
25 の集積、サイトカイン産生、Fas 及び Fas リガンドの発現、アポトーシス反応誘導につい
26 て検討した。O₃ 曝露は、好中球、及び好酸球の増加を伴ってアレルゲン感作による気道過
27 敏性を増悪させた。アレルゲンと O₃ との曝露によって、Fas-Fas リガンド系が抑制され、
28 好酸球のアポトーシス誘導が阻害された。IL-5、GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony
29 stimulating factor) などのサイトカイン産生は増加した。以上 の結果から、O₃ 曝露が好酸
30 球の生存能力や好酸球依存の病理学的変化に影響を与えることでぜん息悪化に結びつくこ
31 とが示唆された。

32
33 Mikerov *et al.* (2008a)は、C57BL/6 マウス (雄および雌、8~12 週齢) に対し、O₃ を曝露
34 する実験を行った。用いた匹数は、生存試験 16 回 (雌雄各 8 種) 各群 5 匹 (手術による死
35 亡等を除き総数 130 匹)、貪食能試験 10 回各群各 3 匹である。曝露群の構成は清浄空気群
36 と O₃ 群である。曝露濃度 2 ppm で単回、3 時間の吸入曝露を行い、呼吸器への急性影響を

1 調べた。曝露直後に肺炎桿菌 (*K. pneumoniae*) を気管内投与し、感染後第 14 日までの生
2 存を観察した。また、曝露直後に肺炎桿菌に感染させ、1 時間後に BALF を採取した。肺
3 炎桿菌感染後の死亡と肺胞マクロファージの肺炎桿菌貪食能から影響を評価した。肺炎桿
4 菌感染後生存率は O₃ 曝露群が清浄空気曝露群よりも低かった。性差をみると、雌は肺炎桿
5 菌に感染しにくい、雌は雄よりも O₃ 曝露後の肺炎桿菌感染に対して感受性が高く、死亡
6 リスクも高かった。清浄空気曝露群では肺胞マクロファージの貪食指数 (細菌陽性
7 マクロファージの%×陽性マクロファージ中の平均細菌数) に性差はなかったが、
8 O₃ 曝露群では雌で貪食指数の低下がより大きかった。

9
10 Mikerov *et al.* (2008b)は、C57BL/6 マウス野生型 (WT) と Surfactant protein A 欠損型 (SP-A^{-/-})
11 に対し、O₃ を曝露する実験を行った。年齢は WT が 12 週齢、SP-A^{-/-} が 8 ~ 12 週齢、匹数
12 は生存試験に 149 匹、貪食能試験に 31 匹、BALF 成分分析試験に 39 匹であり、雌雄、系
13 統別に清浄空気あるいは 2 ppm で単回、3 時間の吸入曝露を行った。野生型については清
14 浄空気あるいは O₃ 曝露後に肺炎桿菌を投与しない (PBS 投与群) 群を作り、BALF の成分
15 分析に供した。曝露直後、肺炎桿菌 (*K. pneumoniae*) を気管内投与し、14 日間の生存状況
16 を観察した。また、曝露直後に肺炎桿菌を気管内投与し 1 時間後の BALF 中細胞の貪食能
17 を、PBS を気管内投与し 1 時間後の BALF 中細胞等を観察した。死亡、肺胞マクロファ
18 ジの肺炎桿菌貪食能、マクロファージ/単球、リンパ球、多型核好中球 (PMNs)、総タン
19 パク質、酸化総タンパク質、SP-A、SP-A 酸化から影響を評価した。O₃ 曝露後肺炎桿菌に
20 感染させた SP-A^{-/-} マウスは、清浄空気曝露群と比べて、生存率及び肺胞マクロファージの
21 貪食能が低下した。この傾向は雌に強くみられた。SP-A^{-/-} マウスは、WT マウスよりも肺
22 炎桿菌の感受性が高かった。清浄空気曝露 SP-A^{-/-} マウスの肺胞マクロファージの貪食能は、
23 O₃ 曝露 WT マウスと同等であった。O₃ 曝露は WT マウスの PMNs 浸潤、総タンパク質、
24 SP-A の酸化を増加させる傾向がみられ、PMNs 浸潤、総タンパク質酸化については雌でよ
25 り顕著であった。WT マウスの O₃ 曝露による SP-A 酸化は、雌が雄よりも多かった。SP-A
26 の欠損あるいは SP-A 機能の抑制 (SP-A の酸化) は、O₃ 曝露後の肺炎桿菌感染の感受性を
27 高め、この傾向は雄よりも雌において強くみられた。

28
29 Wagner *et al.* (2009)は、O₃ 曝露によるアレルギー性副鼻腔炎の増悪における γ -トコフェロ
30 ールの効果について検討した。実験第 1 日に 10~12 週齢の雄の Brown Norway ラットを
31 OVA 感作させ、第 14、15 日に生理食塩水又は OVA の鼻腔内投与によるチャレンジを行い、
32 第 15~18 の 4 日間、0、100mg/kg の γ -トコフェロールを経口投与し、第 17、18 日にろ過
33 空気又は 1 ppm の O₃ を 8 時間/日 (午前 7 時 30 分~午後 3 時 30 分) の全身吸入曝露した
34 (各群 7 匹、合計 56 匹)。実験第 19 日に鼻部組織試料を採取し、病理組織、ムチン糖蛋白
35 5AC mRNA を観察した。鼻腔粘膜への軽度から中程度の好酸球浸潤が OVA 感作ラットで
36 認められ、OVA 感作ラットに O₃ を曝露することで、上顎洞、鼻涙管、近位中隔における

1 更なる好酸球増加を誘導した。アレルギーモデル動物への O₃ 曝露により、中隔、上顎洞で
2 の上皮内粘液物質の増加もみられた。γ-トコフェロール投与は、O₃ とアレルギーの相乗効
3 果による粘液物質や好酸球の増加を抑制するとともに、ムチン遺伝子 rMuc5AC 発現増加
4 も抑制した。

5 Farraj *et al.* (2010)は、O₃、DEP (diesel exhaust particle) の曝露がアレルギー性の気道疾患
6 に及ぼす影響について検討するため、OVA で感作した 6 週齢の雄の BALB/c マウス及び溶
7 媒のみ投与の対照マウスにろ過空気又は 0.5 ppm の O₃、2.0 mg/m³ の DEP を単独あるいは
8 複合で感作 3 日後から 5 時間/回、1 回/週で 4 週間、鼻部吸入曝露させた (各群 10 匹)。気
9 道のアレルギー反応を起こさせるため、OVA 感作の 2、4 週間後に OVA エアロゾル、対照
10 マウスには生理食塩水エアロゾルを吸入させ、感作の 29 日後、気道反応性を測定し、その
11 後、血液、BALF、肺・鼻腔の組織を採取し、BALF 中の細胞数、傷害・炎症指標、サイト
12 カイン類、血清中 NGF (神経成長因子)、OVA 特異的 IgE の計測、組織の光学顕微鏡によ
13 る観察を行った。ろ過空気を曝露させた OVA 感作マウスはメサコリンに対する肺抵抗・
14 エラスタンス、肺の炎症細胞浸潤、肺の傷害指標のうち LDH、アルブミン、総タンパク質、
15 サイトカインの IL-4、IL-5、MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)、血清中 OVA 特異的
16 IgE、NGF が対照マウスと比較し増加した。OVA 感作マウスでは、OVA が誘導した炎症細
17 胞の浸潤が O₃ 曝露によって亢進し、NAG (N-acetyl-β-D-glucosaminidase)、MCP-1 が増加
18 したが、肺抵抗・エラスタンスには影響がなく、また、DEP 曝露は OVA 誘導の反応に影
19 響しなかった。OVA 感作マウスにおける O₃、DEP の複合曝露は、対照マウスへのろ過空
20 気曝露と比較し、肺エラスタンスへの影響はなかったが、肺抵抗を増加させ、感作マウス
21 への O₃ 曝露による MCP-1 増加は抑制された。感作マウスにおける血清中 IgE は O₃ 曝露及
22 び O₃、DEP の複合曝露により、DEP 曝露と比較して増加した。以上の結果から、O₃ と
23 DEP の複合曝露は気道過敏性を増悪するが、肺の炎症反応については DEP が O₃ による増
24 悪を抑制することから、固有の機構を考える必要性が示唆された。

25
26 Li *et al.* (2010)は、C57BL/6J マウス (雄、6~8 週齢、6~10 匹×2/実験群) に対し、O₃
27 を曝露する実験を行った。曝露群の構成は、①対照群 (フィルター空気: FA 曝露群)、②
28 O₃ 曝露群、③FA 又は O₃+ リポ多糖 (LPS: 4.3~4.8 μg/m³ 2.5 時間) 曝露群、④生理食塩水
29 又は 0.22 mg ヒアルロナン酸結合ペプチド (HABP) 又は scrambled-binding peptide (SBP)
30 口腔咽頭投与後+FA 又は O₃+LPS 曝露群、⑤Vehicle control (対照群) 又はヒアルロナン
31 (HA: 25 μg) 口腔咽頭投与+/-LPS 曝露群である。O₃ の曝露濃度は 1 ppm で、単回、3 時
32 間の吸入曝露を行い、呼吸器への急性影響を調べた。観察は①②O₃ 曝露のみ: 曝露後 24
33 時間に観察、③④O₃+LPS 曝露、HABP 又は SBP+O₃+LPS: O₃ 曝露後 24 時間に LPS に曝露
34 し、曝露開始後 4~7 時間に観察、⑤HA+LPS: HA 投与 2 時間後に LPS に曝露し、曝露開
35 始後 4~7 時間に観察した。BALF 中の細胞数、マクロファージ数、好中球数、サイトカイ
36 ン・ケモカイン (IL-1β、IL-6、KC、MCP-1、TNF-α)、タンパク質量、HA 量、気道過敏性

1 (AHR) から影響を評価した。また、骨髄由来マクロファージ、肺泡マクロファージを用
2 いた *in vitro* 試験を実施した。O₃ 曝露されたマウスは、BALF 中の細胞数、マクロファージ
3 数、好中球数、タンパク質量、AHR の増加がみられた。O₃ 曝露後 LPS に曝露されたマウ
4 スは、LPS 単独曝露よりも BALF 中の総細胞数、マクロファージ数、好中球数、タンパク
5 質量、HA が増加し、AHR が亢進した。また、前炎症性サイトカインの増加がみられたこ
6 とから、O₃ は低濃度 LPS 曝露に対してより強い生体反応を引き起こすことが示唆された。
7 O₃ による炎症反応と HA の関係を調べるため、O₃ 曝露の直前に HABP を投与したところ、
8 BALF 中の細胞数、AHR、炎症の前兆を示すサイトカインが未投与時と比べ減少した。HA
9 を気管内投与し LPS に曝露したところ、O₃ 曝露時と同様の反応がみられた。骨髄由来マク
10 ロファージを用いた *in vitro* 試験では、HA が LPS への反応を強化することが TNF- α の測
11 定で示唆され、肺泡マクロファージの試験では、HA は TLR4 の細胞膜表面への局在およ
12 び lipid raft への共存を誘引した。以上 より、O₃ は、HA 増加により誘発された肺マク
13 ファージの TLR4 の細胞膜表面への集積により、LPS の低用量曝露へのマクロファージの反
14 応を強化することが示唆された。

15
16 Maniar-Hew *et al.* (2011)は、アカゲザル (雄、30 日齢、n = 4~9) に対し、O₃ を曝露する
17 実験を行った。曝露濃度 0.5 ppm で吸入による曝露を 8 時間/日、5 日間曝露のち 9 日間
18 フィルター空気 (FA) 曝露/サイクルを 11 サイクル (曝露期間は約 6 か月) 繰返して行
19 い、呼吸器への亜慢性/慢性影響を調べた。曝露 6 か月後の最終曝露終了後 2.5 時間およ
20 び 6 か月 (*最終曝露の 6 ヶ月後に LPS 負荷を行い、その 6~24 時間後) の末梢血、BALF
21 中の細胞パラメーター・細胞所見・サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6) 量、末梢血単核
22 白血球 (PBMC) 中の LPS 刺激に対する反応 (6 か月後のみ) を観察し影響を評価した。
23 曝露によりアカゲザルの末梢血中の白血球数、多形核白血球 (PMN) 数の減少、好酸球数
24 の増加がみられた。BALF 中総細胞数は変化がなかったが、好酸球が増え、リンパ球が著
25 しく減少していた。さらに 6 か月間清浄空気を曝露したものは、単球数のみ増加した。PMN
26 および BALF 中の細胞数は LPS 負荷により対照群では細胞数が減少したが、O₃ 曝露群では
27 その影響が認められなかった。*in vitro* での PBMC の刺激実験では IL-6、IL-8 の分泌量が減
28 少した。幼少期の O₃ 曝露は肺及び全身性の免疫系に永続的な影響を与えると考えられた。

29
30 Brand *et al.* (2012)は、C57BL/6 マウス (雄、8~12 週齢、匹数記載なし) に対し、O₃ を
31 曝露する実験を行った。曝露群の構成は清浄空気 (FA) 曝露群と O₃ 曝露群である。0.8 ppm
32 で 8 時間の O₃ 吸入曝露の後 16 時間 FA 曝露し、これを 1、3、5 日間行い、呼吸器への急
33 性影響を調べた。曝露終了直後に BALF、気道領域及び縦隔リンパ節 (MLN) の樹状細胞
34 (DC) 数、DC 発現型、CD11c+ MHC II+ DC 活性マーカー、T 細胞数を観察し、影響を評
35 価した。3 日間の O₃ 曝露後に気管と縦隔リンパ節でのみ樹状細胞数が増加した。気管では
36 CD103+と CD11b+表現型の DC が、MLN では CD103+表現型の DC が最も増加していた。

1 MLN では DC の CD80、CD40、CCR7 の発現が O₃ 曝露後に顕著に減少し、MLN の総 T 細
2 胞数は増加していた。O₃ は肺と局部リンパ節の DC 数と表現型を変化させることがわかっ
3 た。O₃ による MLN の DC 上共刺激分子の減少は耐性メカニズムを誘発しているものと考え
4 えられるが、O₃ 曝露による気管の DC 数の増加は免疫感作やぜん息を悪化させる可能性が
5 ある。

6
7 Durrani *et al.* (2012)は、ろ過空気 (FA) または O₃ 曝露後のマウスの生存に対する性腺ホル
8 モン 5 α -ジヒドロテストステロン (DHT) および 17 β -エストラジオール (E2) の役割に
9 ついて研究を行った。性腺摘出雌マウス (GxF) および性腺摘出雄マウス (GxM) につい
10 て対照またはホルモンペレット (GxF には DHT、GxM には E2) を皮下埋設し、O₃ (2 ppm、
11 3 時間) または FA に曝露した後、肺炎桿菌に感染させ、生存率を記録した。結果、GxF
12 の生存率は FA 曝露後と O₃ 曝露後で同じだった。GxM の O₃ 曝露群では、FA 曝露群と比
13 較して生存率が低下した。O₃ 曝露では、無処置雌群または GxM + E2 群と比較して、性腺
14 摘出雌群において生存率が増加した。同様の効果が GxF + DHT で観察された。生存率に対
15 する酸化ストレスとホルモンの複合的な負の効果は、E2 の方が高かった。性腺摘出術は、
16 以前に観察された酸化ストレスに応答する生存率の性差を排除 (雌) または最小化 (雄)
17 し、ホルモン処理は性腺摘出による変化を元に戻した。これらの所見は、性腺ホルモンや
18 酸化ストレスがマウスの生存に大きな影響を与えることを示している。

19
20 Bao *et al.* (2013)は、急性オゾン曝露が、最も悪化したアレルギー性気道炎症の発症を前
21 提とした喘息モデルの病態生理学的特徴に及ぼす影響について検討した。6~8 週齢の雌の
22 BALB/c マウスに OVA 感作を行い喘息モデルとした後、2ppm の O₃ を 3 時間曝露させ、マ
23 ウスにおけるエンハンスドポーズ (Penh)、総細胞数および細胞百分率、可溶性メディショ
24 ナー濃度、病理組織、および Muc5ac mRNA 発現を観察した。解析の結果、オゾンは、コ
25 ントロールにおける気道過敏性(AHR)を誘導し、喘息マウスにおける既存の AHR をさらに
26 増幅させる可能性があることが示された。オゾンへの曝露により、喘息マウスは、コント
27 ロールよりも気管支肺胞洗浄において好中球、TNF- α 、IL-13、およびヒアルロン酸をより
28 発現した。喘息マウスとコントロールマウスは、いずれも近位気道および遠位気道におけ
29 る上皮細胞密度の低下を示した。オゾンは、喘息を有するマウスにおける粘液産生および
30 ムチン遺伝子発現の増加を悪化させた。これら結果は、喘息を有する個体が高レベルの大
31 気中オゾンに曝露された場合、健常個体とは違った病態を引き起こし悪化に向かう可能性
32 を示唆している。

33
34 Sunil *et al.* (2015)は、オゾンに対する肺マクロファージの応答における Gal-3 の役割につ
35 いて解析した。WT および Gal-3^{-/-}マウスを空気または 0.8 ppm のオゾンに曝露 (3 時間)
36 してから 24-72 時間後に、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液および肺組織を採取した。WT マウ

1 スにおいて、オゾン吸入は肺における炎症誘発性 (Gal-3 +, iNOS +) マクロファージ数お
2 よび抗炎症性 (MR-1 +) マクロファージ数の増加をもたらした。Gal-3-/-マウスではオゾン
3 による iNOS +マクロファージの蓄積は減弱したが、MR-1 +マクロファージ増加の増大が
4 認められた。これは、BAL 中のマクロファージの増加と相関していた。フローサイトメト
5 リー解析は、これらの細胞が CD11b+であり、主に (>97%) 成熟 (F4/80+CD11c+) 炎症
6 誘発性 (Ly6G-Ly6Chi) マクロファージおよび抗炎症性 (Ly6G-Ly6Clo) マクロファージか
7 らなることを示した。オゾン吸入後、両方のマクロファージ亜集団の増加が観察された。
8 Gal-3 の喪失は、Ly6Clo マクロファージに影響を与えず、Ly6Chi マクロファージ
9 の減少をもたらした。CD11b+Ly6G+Ly6C+顆粒球 (G) および単球 (M) 骨髄由来サプレ
10 ッサー細胞 (MDSC) も、オゾン後の肺で確認された。Gal-3-/-マウスでは、オゾンに対
11 する G-MDSC の応答は弱められ、一方で M-MDSC の応答は高められた。オゾン処理され
12 た Gal-3-/-マウスの肺における炎症性細胞集団の変化は、シトクロム b5 発現によって評価
13 された組織損傷の減少と相関があった。これらのデータは、オゾン曝露後の肺において
14 Gal-3 が炎症誘発性マクロファージの蓄積と毒性を促進する役割を果たすことを示してい
15 る。

16

17 Crowley *et al.* (2017) は、幼少期の発達モデルとしてアカゲザル乳児における 4 週齢か
18 ら 25 週齢まで、0.5ppm の O₃ を 8 時間/日、5 日間/週で 11 サイクル単独または HDM エ
19 アロゾルと複合曝露し、25 週齢で末梢血液の免疫プロファイルを肺胞洗浄液と比較した。
20 解析の結果、曝露とは関係なく、末梢血細胞数は動物の年齢とともに変動するが、IFN γ
21 および IL-4 の mRNA レベルは経時的線形で増加した。12 週齢では、総白血球数、リンパ
22 球数、FoxP3 mRNA、IL-12 mRNA は初期の時点と比較して劇的に減少したが、年齢と
23 ともに定常状態まで増加した。O₃ 曝露により末梢血中の単球数が減少し、CCR3、FoxP3
24 の mRNA レベルが増加した。細胞表面マーカーとサイトカイン発現における差は、*in vitro*
25 での HDM または PMA/イオノマイシン刺激後の HDM またはオゾンのいずれかに曝露さ
26 れた動物から単離した末梢血単核球(clear cells: PBMC)で細胞表面マーカーとサイトカイン
27 発現における差が検出された。気管支肺胞洗浄では、HDM とオゾン曝露の組み合わせ
28 が、FoxP3、IFN γ 、好酸球増加の混合免疫表現型に関連することを明らかにしたが、これ
29 は血液では認められなかった。これらの発見は、出生後の発達段階における大気汚染物質
30 曝露が、末梢血において時間の経過とともに測定可能な細胞およびサイトカインの変化を
31 誘発するが、曝露によって誘発される免疫プロファイルは肺に反映されないことを示して
32 いる。

33

34 Francis *et al.* (2017a)は、オゾン反応時における肺への炎症性細胞輸送における CCR2 の
35 役割を解析した。マウスをオゾン (0.8 ppm、3 時間) で処理すると、24 時間で肺の炎症促
36 進性 CCR2+マクロファージが増加し、24 時間および 48 時間で炎症促進性 CD11b+ Ly6CHI

1 および iNOS+マクロファージが増加した。マンノース受容体+抗炎症マクロファージは、
2 オゾンの 24 時間後と 48 時間後にも肺で認められた。CCR2 の喪失は、肺における炎症促
3 進性マクロファージの数の減少と、炎症促進性サイトカインである IL-1b および TNF α の
4 発現の減少に関連していた。抗炎症性 CD11b+ Ly6C^{Lo} マクロファージの減少は、オゾン処
5 理 CCR2^{-/-}マウスの肺でも認められたが、マンノース受容体+マクロファージの蓄積は遅れ、
6 反対に、CX3CL1 と CX3CR1 は増加した。CCR2^{-/-}マウスにおける肺マクロファージ亜集
7 団および炎症性遺伝子発現の変化は、気管支肺胞洗浄タンパク質含有量の減少およびヘム
8 オキシゲナーゼ-1、4-ヒドロキシノネナール、チトクローム b5 の肺発現の減少によって表
9 されるように、オゾン毒性および酸化ストレスの減少と相関していた。これらのデータは、
10 CCR2 がオゾン曝露後の肺における炎症促進性マクロファージおよび抗炎症性マクロー
11 ファージの蓄積の両方で役割を果たすことを示している。しかし CCR2^{-/-}マウスにおいてオゾ
12 ン誘発性の肺損傷と酸化ストレスが減少するという事実は、炎症誘発性マクロファージに
13 対する CCR2 のより顕著な効果を示唆している。

14

15 1.1.7. その他の呼吸器影響に関する知見

16 Clay *et al.* (2016) は、雄の New Zealand white ウサギと雄の Dunkin-Hartley モルモットに
17 クエン酸を吸入させ、クエン酸投与に対する咳の感受性を調べた。7 日後に無作為に O₃ (ウ
18 サギ: 2 ppm×1 時間、モルモット: 2 ppm×30 分) または空気に曝露させ、14 日後にクロスオ
19 ーバーして再び曝露させた。ウサギについては更にクロスオーバーした。肺機能の測定は、
20 最後の咳実験が終了してから 7 日後に実施した。肺機能実験の 1 日目に、動物のグループ
21 をランダム化して、空気またはオゾンのいずれかを曝露させ、4 時間後に肺機能を測定し
22 た。また、ウサギ及びモルモットにクエン酸を曝露させ、クエン酸に対する感受性を調べ
23 た後、7 日毎のオゾン曝露の前に喘息治療薬 (サルブタモール、ロフルミラスト、コデイ
24 ン、レボドロプロピジン、クロルフェニラミン) の投与を交互に行った。最後の咳の観察
25 から 7 日後に全肺抵抗と動肺コンプライアンスの測定を行い、気管支肺胞洗浄液を回収し
26 た。また、ウサギおよびモルモットに気管支拡張薬チオトロピウム投与後、2 時間後に空
27 気または O₃ に曝露し、全肺抵抗と動肺コンプライアンスの測定を行った。さらにカプサイ
28 シンと TRPA1 の拮抗薬を投与後の咳反応についても計測を行った。解析の結果、モルモッ
29 トとウサギの両方において、O₃ 曝露は咳の頻度を増加させ、クエン酸を吸入させてから最
30 初に咳をするまでの時間を短縮した。この反応は、鎮咳薬であるコデインおよびレボドロ
31 プロピジンによって阻害された。モルモットとは対照的に、ウサギの咳反応は気管支拡張
32 薬チオトロピウムおよびサルブタモール (ムスカリン受容体拮抗薬および β 2 作動薬) で
33 は阻害されず、ウサギの咳反応は気管支収縮に由来するものではないことが示唆された。
34 ウサギでの O₃ 誘発性の咳反応は、カプサイシンによる長期間の前処理によって抑制され、
35 気道感覚神経の関与が示唆された。ただし、この反応における TRPA1 の関与を示す結果は
36 見つけることはできなかった。O₃ 誘発性の咳反応は、気道への好中球動員を伴っていたが、

1 咳反応は、抗炎症活性を明確に示す用量の抗炎症性ホスホジエステラーゼ 4 阻害剤ロフル
2 ミラストを投与しても阻害されなかった。これらの結果は、今回の実験系が、クエン酸に
3 対する O₃ 誘発性の咳反応における治療のための新しい薬物の評価に有用なモデルとなり
4 うることを示すとともに、気管支拡張薬に対する感受性に関して 2 つの種の間でいくつか
5 の重要な違いがあることを示した。

6
7 Crowley *et al.* (2017) は、幼少期の発達モデルとしてアカゲザル乳児における 4 週齢から
8 25 週齢まで、0.5ppm の O₃ を 8 時間/日、5 日間/週で 11 サイクル単独または HDM エアロ
9 ゴルと複合曝露し、25 週齢で末梢血液の免疫プロファイルを肺胞洗浄液と比較した。解析
10 の結果、曝露とは関係なく、末梢血細胞数は動物の年齢とともに変動するが、IFN γ および
11 IL-4 の mRNA レベルは経時的線形で増加した。12 週齢では、総白血球数、リンパ球数、
12 FoxP3 mRNA、IL-12 mRNA は初期の時点と比較して劇的に減少したが、年齢とともに定常
13 状態まで増加した。O₃ 曝露により末梢血中の単球数が減少し、CCR3、FoxP3 の mRNA レ
14 ベルが増加した。*in vitro* での HDM または PMA/イオノマイシン刺激後の HDM またはオ
15 ゴンのいずれかに曝露された動物から単離した末梢血単核球(clear cells: PBMC)では、細胞
16 表面マーカーとサイトカイン発現における差が検出された。気管支肺胞洗浄では、HDM
17 とオゾン曝露の組み合わせが、FoxP3、IFN γ 、好酸球増加の混合免疫表現型に関連するこ
18 とを明らかにしたが、これは血液では認められなかった。これらの発見は、出生後の発達
19 段階における大気汚染物質曝露が、末梢血において時間の経過とともに測定可能な細胞お
20 よびサイトカインの変化を誘発するが、曝露によって誘発される免疫プロファイルは肺に
21 反映されないことを示している。

22 23 1.1.8. 呼吸器影響における感受性要因に関する知見

24 Depuydt *et al.* (1999)は、大気レベルの O₃ 曝露によって惹起される気道過敏性のラットに
25 おける系統差を検討するため、雄の Long-Evans ラット、Sprague-Dawley ラット、FISHER344
26 ラット、Brown-Norway ラット、BDII ラット、BDE ラット、DA ラット、Lewis ラット、
27 Wistar ラットに、室内空気又は 0.05 ppm の O₃ を 4 時間吸入曝露させた。曝露終了 90 分後
28 に 5-HT (Hydroxytryptamine) に対する気道反応性を測定し、BALF を採取した。また、
29 Long-Evans ラットについては曝露終了 4、8、12、24 時間後、FISHER344 ラットについては
30 は曝露終了 4、8、12 時間後に気道反応性の測定及び BALF の採取を行った。さらに、
31 Long-Evans ラットは曝露終了 12 時間後に Evans blue 染料を頸静脈注入し、5 分後の溢出を
32 調べた。曝露 90 分後の観察では、Lewis ラット、BDII ラット、Long-Evans ラットにおい
33 て気道過敏性の亢進を認めた。一方、どの系統のラットにおいても明らかな気道炎症は認
34 められなかった。Long-Evans ラットにおいては、明らかな気道炎症や細胞傷害を認められ
35 なかったが、気道過敏性亢進の持続が最大 12 時間認められた。結論として、高度の近交系
36 ラットにおいては大気レベルの O₃ の曝露により、気道炎症を起こすことなく気道過敏性が

1 生じる系統があり、観察された O₃ 曝露への気道の感受性の相違を遺伝要因によって説明で
2 きると考えられるとした。

3
4 Dormans *et al.* (1999)は、肺傷害及び修復の程度と時間経過をげっ歯類 3 種間で比較する
5 ために、7 週齢の雄の Wistar RIV: Tox ラット、NIH マウス、Hartley CrI: (HA) BR モル
6 モットに清浄空気又は 400、800 µg/m³ (0.2、0.4 ppm) の O₃ を 3、7、28、56 日間連続で全
7 身吸入曝露させた。各曝露期間の終了直後、又は 28 日間連続曝露の後、3、7、28 日の回
8 復期間において、肺を採取し、小葉中心性マクロファージ数、小葉中心性隔膜厚、細気管
9 支上皮肥厚など組織病理学的変化、形態計測的变化の観察及び生化学アッセイによる抗酸
10 化酵素の発現の観察を行った。また、肺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、胸腺の重量測定を実
11 施した。げっ歯類 3 種のすべてにおいて、O₃ 濃度と関連する小葉中心性の炎症が起こり、
12 3 日間の曝露後に最大となった。肺泡マクロファージ数及び小葉中心部の肺細胞密度は曝
13 露 56 日目まで進行的に増加し、もっとも感受性が高い種はモルモットであった。マウスの
14 みにあって、濃度及び曝露時間依存性の細気管支上皮の肥厚が示された。ラット及びモル
15 モットでは、800 µg/m³ の O₃ への 56 日間曝露後にタイプ II 細胞中で巨大な層状体が認めら
16 れた。環境濃度に近い濃度の O₃ への 3 日間、及び 7 日間の曝露により、マウスでは肺酵素
17 活性が増加し、げっ歯類 3 種のすべてにおいて組織学的及び形態計測的变化が認められた。
18 ラット及びモルモットでは、56 日間の曝露後に肺泡管の線維形成が認められた。マウスで
19 は生化学反応が最も高く、O₃ 曝露からの回復が最も遅かった。組織学的検査、形態計測及
20 び生化学検査から、ラットは 28 日間の曝露から 28 日後には完全に回復したが、モルモッ
21 トでは管隔膜は肥厚したままであり、マウスではすべての酵素活性が対照値と比較して上
22 昇したままであった。結論として、O₃ への反応が最も激しく上昇したのはマウスで、その
23 次がモルモットであり、ラットにおける反応が最小であった。

24
25 Dye *et al.* (1999)は、高齢(生後 14 か月)の雄の FISHER344 ラットにろ過空気又は 2 ppm
26 の O₃ を 2 時間吸入曝露させ、曝露終了 2 時間以内に気道反応性を測定した。また、生後
27 90 日の雄の FISHER344 ラット、Sprague-Dawley ラット、Wistar ラットにろ過空気又は 0.5
28 ppm の O₃ を夜間 8 時間吸入曝露させた。曝露終了の 2 時間後に BALF を採取し、総タン
29 パク質、LDH、フィブロネクチン、細胞分画算定、IL-6、プロスタグランジン E2 について
30 観察した。高齢 FISHER344 ラットへの 2 ppm の O₃ 曝露後、明らかな気道過敏性亢進が認
31 められた。0.5 ppm の O₃ 曝露後には、Wistar ラットでは、Sprague-Dawley ラット及び
32 FISHER344 ラットと比較し、肺傷害、好中球性炎症が進展し、BALF 中の IL-6 濃度が上昇
33 することが認められた。Sprague-Dawley ラットにおいて、BALF 中のプロスタグランジン
34 E2 がより高く、FISHER344 ラットでは一貫して影響が最も小さかった。Wistar ラット由来
35 の気管支上皮を、*in vitro* において 0.1~1.0 ppm の O₃ に 1 時間曝露させ、類似の影響につ
36 いて検討した結果、多種の炎症性メディエーターを介する経路が O₃ 曝露により影響される

1 ことが確認された。これらの作用はぜん息患者のように気道炎症を既に有する者の
2 morbidity を悪化させ得る。

3
4 Gunnison *et al.* (1999)は、O₃曝露による各種呼吸器応答が肺下部領域における O₃到達量
5 により説明できるかどうかを調べた。Sprague-Dawley ラット (雌、妊娠中、授乳中、妊娠
6 歴なし、n=5-7 匹)に 0.5、0.8、1.1ppm の 16O₃または 18O₃を 1~4 時間曝露させた。O₃(16O₃)
7 曝露 20 時間後に採取した BALF における炎症細胞中 PMN 比率は、同一 O₃濃度において
8 授乳ラット>妊娠ラット>バージンラットの順で差が認められた。O₃曝露後の BALF 中タ
9 ンパク質量は、授乳ラットで妊娠ラット、バージンラットよりも高かった。肺サーファク
10 タント画分および細胞ペレットにおける 18O の存在量は、18O₃の曝露時間増加に伴い直線
11 的に増加した。また、肺サーファクタント画分でのみ、18O の存在量が、18O₃の曝露濃度
12 増加に伴い直線的に増加した。妊娠、授乳、バージンラットにおける O₃曝露後の BALF
13 中 PMN 細胞割合およびタンパク質量は、肺サーファクタント中の O₃度合いに対して正の
14 直線性を示した。ろ過空気を曝露させた場合、BALF 中アスコルビン酸濃度はバージンラ
15 ットよりも妊娠中、授乳中のラットで低かった。また妊娠、授乳、バージンラットいずれ
16 においても、0.8 ppm O₃曝露直後に、BALF 中のアスコルビン酸濃度が減少していた。こ
17 れらの結果により、肺における O₃用量と炎症反応の度合いが相関すること、また BALF
18 中や肺組織のアスコルビン酸濃度が炎症反応と逆相関することが示された。

19
20 Johnston *et al.* (2000a)は、新生児期の哺乳動物には、肺の酸化的ストレスに起因するいく
21 つかの毒物に対する耐性が成体よりも高いものもあり、高濃度の酸素曝露による傷害に関
22 する研究では、新生マウスにおける傷害発生初期には急速なケモカイン及びサイトカイン
23 の反応が認められたが、成体マウスでは死亡直前までサイトカイン存在量がほとんど変化
24 しなかったことから、新生マウスと成体マウスとの間の反応の変化が炎症反応の調節にお
25 ける変化ではなく、むしろ特異な細胞損傷と関連している、という仮説を立てた。上皮細
26 胞傷害を引き起こす O₃、直接的な上皮細胞傷害に依存せずに肺の炎症を引き起こすエンド
27 トキシンという異なる 2 種類の肺毒性誘発モデルを用いて、この仮説を検証した。新生 (生
28 後 36 時間) 及び成体 (生後 8 週間) の C57BL/6J マウスにろ過空気又は 1.0、2.5 ppm の
29 O₃を 4、20、24 時間、全身吸入曝露させ、曝露終了直後に屠殺した。また、別の新生マウ
30 ス及び成体マウスにろ過空気又は LPS エアロゾルを 10 分間、全身吸入曝露させ (マウス
31 あたり 10 ng 相当)、曝露の 2、6、24 時間後に屠殺した。肺組織を採取し、ケモカイン、
32 サイトカイン、抗酸化剤などの mRNA レベル {IL-12 p 35、IL-12p40、IL-10、IL-1α、IL-1β、
33 IL-1Ra、IL-6、MIF (マクロファージ遊走阻止因子: macrophage migration inhibitory factor)、
34 IFN-γ、IFN-β、L32、GAPDH、TNF-β、TNF-α、LT-β、TGF-β、Ltn、RANTES、エオタキシン
35 (eotaxin)、MIP-1、MIP-2、IP-10 (IFN-inducible protein-10)、MCP-1、TCA (T cell activation
36 gene) -3、メタロチオネイン、HO-1、iNOS} を調べた。成体マウスではエオタキシン、

1 MIP-1 α 、MIP-2、IL-6 及びメタロチオネインをコードしている mRNA 存在量が増加したこ
2 とから、O₃ に対する感受性が増加した。新生マウスでは、メタロチオネインのみが曝露か
3 ら 4 時間後に増加した。これとは対照的に、新生マウス及び成体マウスではエンドトキシ
4 ン曝露後 2 時間で同様に反応し、TNF- α 、エオタキシン、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2、IP-10
5 (IFN- γ : inducible protein) 及び MCP-1 をコードする mRNA が誘導された。さらに、成体
6 マウスでは IL-6 が増加したが、新生マウスでは増加しなかった。上皮の損傷を引き起こさ
7 ないエンドトキシンに対するケモカイン及びサイトカインの反応が新生マウス及び成体マ
8 ウスで類似していたことから、O₃ 曝露後の炎症における新生マウスと成体マウスの感受性
9 の相違にも上皮細胞傷害が関与していることが示唆された。

10
11 Kleeberger *et al.* (2000)は、O₃ 曝露は、ヒトや動物に肺の血管透過性亢進と炎症を誘導す
12 ることから、O₃ 曝露による透過性亢進に関与する遺伝的要因を明らかにするために、O₃
13 に対して高感受性の C57BL/6J マウス、低感受性の C3H/HeJ マウス、及びその交配マウス
14 を用いて、量的形質遺伝子座の解析を行った。雄で 6~8 週齢の C57BL/6J マウス、C3H/HeJ
15 マウス、C3H/HeOuJ マウスに清浄空気又は 0.3 ppm の O₃ を 24、48、72 時間、BXH 組替
16 え近交系マウスには 72 時間吸入曝露させ、曝露終了後 1 時間以内に屠殺し、BALF 中のタ
17 ンパク質、多形核白血球割合により肺透過性及び炎症について評価した。これらの交配マ
18 ウスでは、第 4 染色体上に量的形質座位が同定され、TLR-4 がその原因遺伝子と考えられ
19 た。TLR の発現型の異なる C3H/HeJ と C3H/HeOuJ マウスへの 72 時間曝露の結果、
20 C3H/HeOuJ マウスでは BALF 中のタンパク質濃度がより高く、さらに、C3H/HeJ マウスの
21 みで曝露後の TLR-4 遺伝子発現の減少が認められた。以上 の結果から、第 4 染色体上の
22 量的形質座位、特に TLR-4 遺伝子が O₃ 曝露による透過性亢進に関与することが示された。

23
24 Neuhaus-Steinmetz *et al.* (2000)は、IgE 応答性の異なるマウスにおける OVA 感作への O₃
25 曝露の影響について検討するため、IgE 高応答性の BALB/c マウス及び低応答性の C57BL/6
26 マウスの雌 (6~8 週齢) に室内空気又は 180、250、500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の O₃ を 4 時間/日、3 日/週
27 で 4 週間全身吸入曝露させると共に、OVA エアロゾルを 20 分/回、5 回/週で O₃ 曝露中の 4
28 週間吸入させることにより感作させた。OVA エアロゾル最終曝露の 24 時間後、メサコリ
29 ン刺激に対する気道反応性、皮膚過敏性を調べた。また、BALF、血液を採取し、血清中
30 抗体価、BALF 中の細胞数、サイトカイン及び LT の産生について調べた。その結果、BALB/c
31 マウスでは、O₃ 曝露による濃度依存的な血清中 IgE 産生、サイトカイン産生、好酸球、リ
32 ンパ球の気道への集積による Th(T-helper) 2 型の反応の増加が見られた。BALB/c マウス
33 の O₃ 曝露+OVA 感作群では、それらの反応は増強し、気道抵抗の上昇、皮膚反応の陽性率
34 増加も見られた。一方、C57BL/6 マウスでは、O₃ 曝露+OVA 感作群でのみ Th2 型の反応増
35 加が見られた。

1 Shore *et al.* (2000)は、成体ラットでは O₃ 曝露中に分時換気量が減少するが、肺の発達段
2 階にある若齢動物では影響が大きいと推測されることから、O₃ に対する呼吸反応に週齢に
3 よる相違があるかどうかを決定するため、2、4、6、8、12 週齢の雌雄の Sprague-Dawley
4 ラットに 2 ppm の O₃ を 3 時間鼻部吸入曝露させた。プレチスモグラフィを用いて、曝
5 露開始前 20 分間及び曝露中の分時換気量、一回換気量、呼吸回数、吸気時間、呼気時間、
6 呼気終末休止期を測定した。体重で標準化した分時換気量のベースライン (VE/g) は週齢
7 とともに減少したが、特に 2 週齢ラットと 4 週齢ラットでは VE/g が大きかった。これは、
8 若齢の動物ほど代謝速度が大きいことと一致する。8、12 週齢ラットでは、分時換気量は
9 O₃ 曝露によって減少したが、6 週齢ラットでは減少量が少なく、2、4 週齢ラットではほと
10 んど変化がなかった。一回換気量、呼吸回数、吸気時間、呼気時間、呼気終末休止期など
11 の呼吸機能についても同じ傾向で、8、12 週齢ラットで変化が大きかった。また、O₃ 曝露
12 を同様に行った別ラットについて、曝露終了の直後又は 4 時間後に BALF を採取し、BALF
13 中のタンパク質、PGE₂、好中球比率を観察した。その結果、曝露 4 時間後におけるタンパ
14 ク質濃度の増加が観察され、2 週齢ラットで増加した。プロスタグランジン E₂ 濃度は曝露
15 直後に 2 週齢のラットでより増加した。BALF 中の好中球は 12 週齢では増加したが、2 週
16 齢では変化がなかった。この結果は、若齢ラットは成体ラットと比較して O₃ に対する呼吸
17 機能の調節ができないために肺への傷害が大きいことを示している。

18
19 Sterner-Kock *et al.* (2000)は、O₃ 曝露による影響の哺乳類動物種間の差異について調べる
20 ため、フェレット (雄、月齢 18 か月)、アカゲサル (雄、4 歳) 、Sprague-Dawley ラッ
21 ト (10 週齢) に 1 ppm の O₃ 又はろ過空気を 8 時間、吸入曝露させ、曝露終了後、1 時間
22 ろ過空気に曝露させてから屠殺し、BALF、肺組織を採取した。全ての動物種で BALF 中
23 の好中球数が増加したが、特にサルとフェレットで顕著であった。また、組織病理学的観
24 察においても、サルとフェレットで、壊死を起こした上皮細胞に一致して好中球の浸潤が
25 観察された。以上の結果から、フェレットの O₃ に対する呼吸器における感受性はサルと
26 極めて類似していることが示唆された。

27
28 Huffman *et al.* (2001)は、甲状腺機能亢進症が O₃ 誘発肺毒性の増加と関係する可能性につ
29 いて検討するため、生後 37~40 日の雄の Sprague-Dawley ラットに溶媒又は 1.00 mg/kg の甲
30 状腺ホルモン (チロキシン) を 7 日間投与した後、ろ過空気又は 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、
31 3.0 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露させた (各濃度 6 匹)。また、甲状腺ホルモン投与
32 量のチロキシン等、LDH 活性等への影響について検討するため、0.00、0.25、0.50、1.00 mg/kg
33 の甲状腺ホルモンを投与した後、2.0 ppm の O₃ を 3 時間吸入曝露させた。曝露開始前及び
34 終了直後に呼吸回数、一回換気量、分時換気量を測定した。曝露終了 18 時間後に血液、
35 BALF を採取し、血清中のチロキシン濃度、BALF 中、マクロファージ数、多核白血球数、
36 LDH 活性、アルブミン濃度を観察し、また、肺の乾湿重量を測定した。甲状腺機能亢進ラ

1 ットでは、O₃曝露によってBALF中のLDH活性及びアルブミン濃度が3~6倍増加し、多
2 核白血球数が増加した。各種の肺傷害指標はO₃濃度に依存して増加し、また、チロキシ
3 ン処理濃度の上昇により増加する傾向があった。甲状腺ホルモン処理によるこれらの結果は、
4 ホルモンによる全身の代謝亢進やO₃吸入量増加からは十分には説明できない(つまり、チ
5 ロキシンの作用がおよぼすO₃傷害増強の機序は不明)。これらの結果から、O₃誘発肺毒性
6 のリスクは甲状腺機能亢進状態で増加することが分かり、O₃曝露による肺傷害の感受性は、
7 個人の甲状腺ホルモン状態によって大きく影響を受けることが示唆された。

8
9 Huffman *et al.* (2002)は、これまでの研究により甲状腺機能亢進症がO₃誘発性の肺毒性
10 を高めることが示されていることから、甲状腺機能亢進症によるO₃の肺炎症反応の増強
11 プロセスをより理解するために、O₃曝露後の甲状腺機能亢進症ラットにおける気管支肺胞
12 洗浄液中のサイトカインレベルを評価した。また、O₃吸入後の甲状腺機能亢進症ラットか
13 からの気管支肺胞洗浄液によって採取された細胞に、NF-κB結合活性の増加が見られるかどう
14 かを評価した。甲状腺機能亢進状態は、7日間のチロキシ(0.5 mg/kg)の投与によって
15 誘発された。その後、ラットにO₃を2 ppmで3時間曝露させ、曝露から18時間後に影
16 響を調べた。MIP-2とMCP-1の気管支肺胞洗浄液レベルは、コントロールラットと甲状
17 腺機能亢進症ラットの両方でO₃曝露により増加した。ただし、甲状腺機能亢進症ラット
18 における増加は、コントロールのレベルと比較してMIP-2が1.5倍、MCP-1が11倍大き
19 かった。インターロイキン(IL)-6、IL-4、およびIL-10の気管支肺胞洗浄液レベルは、
20 曝露後18時間時点で、すべてのグループで検出されないか著しく低かった。また、甲状
21 腺機能亢進症ラットの気管支肺胞洗浄細胞抽出物におけるNF-κB結合活性は、コントロ
22 ール群と比較して、O₃曝露後4時間と18時間の両方で増加していた。これらの結果は、
23 甲状腺機能亢進症がO₃曝露による肺の炎症性応答増強に寄与するメカニズムには、NF-κB
24 活性の増加とケモカイン産生のアップレギュレーションが含まれていることを示唆してい
25 る。

26
27 Schlesinger *et al.* (2002a)は、雌雄のHartleyモルモットに清浄空気又は0.1、0.3 ppmのO₃
28 を4時間/日、4日/週で24週間吸入曝露させた。既存のアトピーや曝露中の感作の影響を
29 検討するため、正常動物、OVAの4日間吸入曝露により感作させることでアトピーを誘導
30 しO₃曝露まで28日間おいたモルモット、O₃曝露開始と同時にOVA感作させたモルモ
31 ットを用いた。曝露終了1週間後、又は9週間後に屠殺、血液を採取し、抗体価を調べた。
32 また、BALF、肺組織を採取し、気道炎症、酸化ストレスに関する指標を調べた。気道反
33 応性については、O₃曝露中は4週間毎に測定し、曝露終了9週間後まで飼育したモルモ
34 ットについては曝露後4、8週目にも測定した。O₃曝露は正常モルモットに気道過敏性を誘
35 発しなかったが、OVAによる感作がO₃曝露前か同時かによらず、アトピーを誘導したモ
36 ルモットの気道過敏性を増悪させ、この影響は曝露終了後、少なくとも4週間は持続した。

1 O₃による気道過敏性への増悪影響と BALF や肺組織における気道炎症の指標との間には相
2 関は認められなかったが、抗原特異的抗体価とは相関が認められた。

3
4 Shore *et al.* (2002)は、成体マウスでは O₃ 曝露中の分時換気量が減少する反応がみられる
5 ことから、O₃ に対する呼吸反応に週齢による相違があるかどうかを決定するため、2、4、
6 8、12 週齢の雌雄の A/J マウスに、ろ過空気、又は 0.3、0.5、1.0、2.0、3.0 ppm の O₃ を 3
7 時間鼻部吸入曝露させ、プレチスモグラフィにより O₃ 曝露前 20 分間及び曝露中の分時
8 換気量、一回換気量、呼気終末休止期、呼吸回数、曝露前日及び曝露終了後 3 時間の Penh
9 の測定を実施した。体重で標準化した分時換気量のベースライン (VE/g) は週齢とともに
10 減少した。これは、若齢の動物ほど代謝速度が大きいことと一致する。全ての週齢のマウ
11 スにおいて、分時換気量は、O₃ 濃度に相関して減少したが、2 週齢のマウスの反応は 4 週
12 齢以上のマウスと比較して小さかった。未成熟マウスでは VE/g のベースラインが増加し、
13 O₃ による分時換気量の減少が小さいことから、体重で標準化した O₃ の総吸入量は成体マ
14 ウスよりも 3~4 倍多くなった。8 週齢及び 12 週齢のマウスでは O₃ 曝露量に相関して気道
15 反応が増加したが、2 週齢及び 4 週齢のマウスでは気道過敏症は発症しなかった。また、
16 生後 2、8 週の雌雄の A/J マウスにろ過空気、又は 2.0 ppm の O₃ を 3 時間鼻部吸入曝露さ
17 せ、曝露終了の 4 時間後又は 24 時間後に BALF を採取し、タンパク質、TNF- α 、IL-6、MIP-2、
18 総細胞数、好中球比率、マクロファージ数比率、好酸球比率を観察した結果、8 週齢のマ
19 ウスでは O₃ 曝露 4 時間後の IL-6 濃度と MIP-2 濃度が 2 週齢のマウスより増加した。以上 の
20 結果は、少なくとも気道過敏症の誘導及びある種のサイトカインの遊離促進においては、
21 若齢マウスは成体マウスと比較して O₃ に対する感受性が低いことを示している。

22
23 Broeckert *et al.* (2003)は、CC16 (クララ細胞タンパク質) は細気管支のクララ細胞によ
24 り分泌され、抗酸化ストレスと炎症作用により気道を防御すると考えられることから、近
25 親交配のマウスにおける O₃ に対する感受性が CC16 の経上皮の漏出と関連するか否かにつ
26 いて、気道における CC16 の mRNA、タンパク質レベル、及び特定のタンパク質アイソフ
27 ォームによって検討した。O₃ への感受性の高い順に C57BL/6J マウス、CBA/ca マウス、SJL/J
28 マウス、AKR/J マウス、C3H/HeJ マウスの 6~8 週齢の雌に清浄空気又は 1.8 ppm の O₃ を 3
29 時間全身吸入曝露させ (各群 5~8 匹) 、曝露終了の直後又は 6 時間後に BALF、血清、
30 肺組織を採取し、BALF 中の総タンパク質、アルブミン、LDH (乳酸脱水素酵素: lactic
31 dehydrogenase)、炎症性細胞分画、血清中の CC16、肺組織の CC16mRNA 発現について観
32 察した。また、最も感受性の高い C57BL/6J マウスと最も感受性の低い C3H/HeJ マウスに
33 は、0.11 ppm の O₃ を 24、48、72 時間曝露させ、曝露直後又は 24 時間後に同様の観察を行
34 った。O₃ 曝露後、血清中 CC16 は曝露直後をピークとして一時的に上昇し、BALF のマー
35 カーにより評価した肺傷害の程度と関連していた。血清中の CC16 或いは BALF マーカー
36 に基づいて解析した上皮細胞傷害は、曝露前の BALF 中 CC16 のレベルとの負の関連が示

1 された。曝露前の CC16 の mRNA のレベルは系統間で同じであり、肺上皮の傷害は O₃ 曝
2 露前の BALF 中のアルブミンとも負の関連であることから、基底の肺上皮の透過性は O₃
3 に対する感受性の決定因子であることが確認された。これらの結果は 肺上皮バリアの透過
4 性は O₃ に対する感受性の決定因子であり、CC16 及び他の抗酸化/炎症タンパク質などの肺
5 内のレベルを制御している可能性が示唆された。

6
7 Shore *et al.* (2003)は、体重過多の成人及び小児ではぜん息や気道過敏性の発生率が増加す
8 ることが疫学的データにより示唆されていることから、ぜん息の誘因物質である O₃ を野生
9 型マウスと、レプチン欠損肥満マウスに曝露し、O₃ 誘導性の気道過敏症の発症を比較した。
10 雌雄、生後 8~12 週齢の野生型の C57BL/6J マウス及び ob/ob マウス (C57BL/6J マウスをバ
11 ックグラウンドとし、レプチン遺伝子の 105 コドンの変異によりレプチンが生成されず、
12 過食による肥満を生じている) にろ過空気又は 2 ppm の O₃ を 3 時間吸入曝露させた。ま
13 た、レプチン腹腔内投与の影響を検討するため、レプチン又は溶媒を実験第 1 日に 3.5 時
14 間間隔で 2 回、実験第 2 日に 2 ppm の O₃ への 3 時間曝露を行う 0.5 時間前及び曝露終了直
15 後の 2 回、腹腔内投与した。曝露終了の 24 時間後、肺機能 (分時換気量、一回換気量、呼
16 気終末休止期、呼吸回数) 及び気道反応性 (肺抵抗のベースライン、肺抵抗がベースライ
17 ンの 200%となるメサコリン投与量) を測定した。また、別のマウスについて、曝露終了
18 の 4、24 時間後に BALF を採取し、BALF 中のタンパク質濃度、サイトカイン (エオタキ
19 シン、MIP-2、KC、IL-6)、好中球比率について観察した。ob/ob マウスは過剰に食べ、体
20 重が同一の年齢、性別の野生型マウスの二倍になっていた。ろ過空気曝露では、野生型マ
21 ウスと比較して ob/ob マウスの肺抵抗のベースラインは大きく、肺抵抗を 2 倍にするため
22 に必要なメサコリンの投与量は少なかった。O₃ 曝露によって、両マウスで気道過敏性と気
23 道炎症が発症したが、ob/ob マウスでは野生型マウスと比較して O₃ に対する反応が増強し
24 した。レプチン腹腔内投与により、ob/ob マウスで増強した炎症反応は回復しなかったが、
25 野生型マウスでは炎症反応が増大した。O₃ 吸入量は O₃ 濃度、曝露時間、分時換気量から
26 求められ、肺組織の単位重量 (g) 当たりの O₃ 吸入量は、野生型マウスよりも ob/ob マウ
27 スの方が多かった。以上 の結果は、ob/ob マウスでは O₃ に起因する気道反応が亢進するこ
28 とを示しており、O₃ 吸入量がこの差の要因の一つである可能性、及び肥満体におけるレプ
29 チンホルモンの増加が気道炎症を増悪させる可能性を示唆している。

30
31 Johnston *et al.* (2004)は、肺の発達過程における大気汚染物質の影響の変化を評価するた
32 め、2、4、7、10、14、28、56 日齢の C57BL/6 マウスに 2.5 ppm の O₃ を 4 時間、またはリ
33 ポ多糖 (LPS) を 10 分間 (推定沈着量 26 EU) 吸入曝露させ、曝露から 2 時間後に肺組織
34 を採取し、RNA を抽出した。4、7 日齢マウスの LPS 曝露後の肺組織をメチルグリーン染
35 色または HE 染色、抗 ED-1(マクロファージマーカー)と抗好中球マーカーの免疫染色し評
36 価した。炎症誘発性サイトカインおよびケモカインの mRNA 量は RNase 保護アッセイに

1 よって測定した。測定の結果、2、4、7日齢のマウスではO₃曝露後の肺組織からインター
2 ロイキン (IL) -6 mRNA は検出されなかったが、10、14、28、および56日齢のマウスで
3 は18~20倍の増加がみられた。マクロファージ抑制タンパク質 (MIP) -2 とサイトカイン
4 誘発好中球走化性誘引物質 (KC) の mRNA はわずかに上昇したが、2日齢と56日齢で違
5 いはなかった。LPS 曝露後、IL-6 mRNA は2日および4日齢のマウスでは検出されなかつ
6 たが、7、14、および28日齢のマウスで8~10倍の増加が測定され、56日齢のマウスでは
7 約20倍であった。IL-1beta mRNA は、生後2~4日齢では約4倍に上昇したが、7、14、28
8 および56日齢のマウスでは25~30倍に上昇した。MIP-2 と KC の mRNA の存在量は、25
9 から30倍に上昇したが、2日齢と56日齢のマウスで違いはなかった。LPS 曝露後の肺の
10 免疫染色結果より、4日齢と7日齢ともに好中球の分布が肺全体に見られた。一方マクロ
11 ファージは4日齢の肺には少なく、7日齢の肺では著しく増加していた。これらの結果か
12 ら著者らは、吸入された環境汚染物質の影響には、肺の発達過程で特に重要な時点が存在
13 しており、炎症および上皮防御機構の成熟に違いが存在していることを示しているとし
14 た。

15

16 Savov *et al.* (2004)は、遺伝的要因がO₃急性曝露後の肺損傷の時間経過及び程度に影響す
17 るか否かを判断するため、遺伝的に異なる9種類の近交系の6~8週齢の雄のマウス
18 (C57BL/6J、129/SvIm、BTBR、BALB/cJ、DBA/2J、A/J、FVB/NJ、CAST/Ei、C3H/HeJ)
19 に清浄空気又は2.0 ppm のO₃を3時間、全身吸入曝露させ、曝露終了の6、24時間後に生
20 理学的、生物学的反応を評価した。Penh (enhanced pause) はメサコリンを投与し、全身
21 プレチスモグラフィーで分時換気量、残気量、呼吸回数、呼気時間、吸気時間、最大呼気
22 流量、最大吸気流量、弛緩時間を測定し、算出した。その結果、C57BL/6J、BALB/cJ、129/SvIm、
23 BTBR マウスはO₃に対する感受性が高く、曝露6時間後、24時間後にメサコリン刺激に
24 対してPenhが増加した。一方、DBA/2J、A/J、FVB/NJ、CAST/Ei、C3H/HeJ マウスでは、
25 曝露6時間後にはメサコリン刺激に対するPenhの反応の感度が上昇したが、24時間後
26 には反応が曝露前に近いレベルに戻った。BALF中の多形核白血球比率、総タンパク質濃度、
27 IL-6濃度への影響を観察した結果、129/SvIm、BTBR、DBA/2J、FVB/NJ マウスでは多形核
28 白血球の増加が曝露6時間後に最大となったが、C57BL/6J及びCAST/Ei マウスでは曝露
29 24時間後に最大となった。A/J、C3H/HeJ マウスは、多形核白血球の増加が最も小さかつ
30 た。BALB/cJ マウスでは、リンパ球の流入が顕著であった。IL-6濃度は多形核白血球の流
31 入と相関したが、総タンパク質量は細胞の割合と必ずしも関連しなかった。肺組織におけ
32 るPCNA染色によって上皮細胞の増殖を評価したところ、曝露から24時間後に上皮細胞
33 の増殖が明白に認められた。C57BL/6J、A/J マウスのPCNA陽性細胞は4%であったが、
34 129/SvIm、DBA/2J、FVB/NJ マウスでは1~3%、TBR、BALB/cJ、CAST/Ei、C3H/HeJ マウ
35 スでは1%未満であった。さらに、6種類の近交系で表現型から、Roche マウスデータベー
36 スに基づく *in silico* ゲノム解析を実施したところ、染色体1、7、15の上の遺伝子座が表現

1 型と相関することが確認されたものと一致していた。以上 の結果から、O₃ 低感受性の系
2 統 (C3H/HeJ と A/J)、及び O₃ 高感受性の系統 (C57BL/6J と 129/SvIm) が確認され、感受
3 性決定に関与する新規のゲノム遺伝子座が決定された。これは、吸入した O₃ に対する肺反
4 応性に明白な遺伝的根拠があることが示された。

5
6 *Servais et al.* (2005)は、肺のミトコンドリアの呼吸機能、活性酸素産生及び抗酸化状態に
7 対する O₃ 曝露の影響について、年齢による影響の受けやすさを明らかにするために、3
8 週齢 (幼若)、6 か月齢 (成獣)、20 か月齢 (高齢) の雄の Sprague-Dawley ラットにろ過空
9 気又は 500 ± 50 ppb の O₃ を 12 時間/日 (夜間) で 7 日間、全身吸入曝露させた (各群 9 匹。
10 3 週齢ラットは各群 36 匹)。曝露前、曝露期間中の体重変化について観察し、第 6 日の曝
11 露の 1~2 時間後、呼吸機能を測定し、分時換気量を定めた。最終曝露終了直後に肺組織を
12 採取し、ミトコンドリアの O₂ 消費と H₂O₂ 産生、抗酸化酵素 (SOD)、グルタチオンペルオ
13 キシダーゼ、カタラーゼ) の活性変化、DNA の酸化傷害、脂質過酸化を観察した。成獣ラ
14 ットの抗酸化状態には変化がなかったが、幼若ラットでは O₃ 曝露により、抗酸化酵素の誘
15 導はなく、8-oxo-dG と HSP (heat shock protein) 27 が高くなった。高齢ラットではミトコ
16 ンドリアの軽度の脱共役がおこり、SOD とグルタチオンペルオキシダーゼの活性が増加し、
17 8-oxo-dG が高くなった。以上 の結果から、幼若ラットは、換気機能や、抗酸化酵素の誘
18 導が起こらないことにより、O₃ の影響を受けやすく、高齢ラットでは、O₃ による SOD 及
19 びグルタチオンペルオキシダーゼの活性増加がミトコンドリアの機能障害や DNA の酸化
20 傷害を防ぐのに不十分であったために O₃ の影響が大いことが示された。

21 *Huffman et al.* (2006)は、甲状腺機能亢進症における O₃ 誘導の肺傷害のリスク増大につい
22 て示した過去の報告を受け、他の酸化ストレス因子である SiO₂ による肺傷害における甲状
23 腺機能亢進の影響を調べるため、甲状腺機能亢進症モデル及び正常の雄の Sprague-Dawley
24 ラットに生理食塩水又は 0.1、1.0 mg/100 g の SiO₂ を気管内投与した。また、別の甲状腺機
25 能亢進症モデルラット及び正常ラットにろ過空気又は 1 ppm の O₃ を 4 時間、全身吸入曝露
26 させた。曝露開始の 24 時間後、血液、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、血清中のチ
27 ロキシシン濃度の測定、BALF 中の細胞数の計測、アルブミン濃度、リン酸脂質量、重飽和
28 ホスファチジルコリン量、肺胞マクロファージからの肺胞マクロファージ反応性酸素/窒素
29 種産生の分析を行った。SiO₂ 曝露の結果、BALF 中にアルブミンの漏出や好中球の浸潤な
30 ど用量依存性の炎症作用がみられたが、モデルラットと正常ラットの間には差は認められな
31 かった。一方、O₃ 曝露では、甲状腺機能亢進症モデルにおいて正常ラットよりも炎症マー
32 カーが増加した。

33
34 *Johnston et al.* (2006a)は、環境汚染物質による肺の発達への影響について調べるため、4、
35 10、56 日齢の C57BL/6 マウスに O₃、LPS (リポ多糖類) を単独又は複合で曝露させた。
36 LPS 曝露群については LPS エアロゾルを 10 分間、全身吸入曝露させ (用量 26EU (1 EU =

1 100 pg LPS) 相当)、0.5、1、4 時間回復させてから屠殺した。O₃ 曝露群については 1、2.5 ppm
2 の O₃ を 4 時間、全身吸入曝露させ、曝露終了直後に屠殺した。LPS+O₃ 連続曝露群につい
3 ては、LPS 曝露後、直ちに 2.5 ppm の O₃ を曝露させ、曝露終了直後に屠殺した。対照群に
4 はろ過空気を曝露させた。肺における遺伝子発現を調べた結果、O₃ 曝露により、c-fos、c-jun
5 の遺伝子発現は、すべての日齢のマウスで濃度に依存して増加したが、TLR4、TLR2 の遺
6 伝子発現は 10、56 日齢のマウスでのみ増加した。一方、LPS 曝露による c-fos、c-jun の遺
7 伝子発現の増加は、曝露 0.5、1 時間後の 10、56 日齢マウスでのみ認められた。LPS と O₃
8 の連続曝露では、10、56 日齢のマウスで IL-1 β 、TNF- α 、TLR2、TLR4、c-jun、c-fos の遺
9 伝子が増加し、4 日齢マウスでは TNF- α 、c-jun、c-fos の遺伝子のみが増加した。以上 の
10 結果は、LPS 及び O₃ の連続曝露は年齢に依存する複数のシグナル伝達経路を誘導すること
11 を示唆する。

12

13 Valacchi *et al.* (2007)は、SKH-1 マウス (雌、若齢: 8 週齢、老齢: 18 か月齢、n = 6) に対
14 し、O₃ およびタバコ煙を曝露する実験を行った。曝露群の構成は各種試験について各々清
15 浄空気群と O₃ 曝露群である。曝露濃度は O₃: 0.25 ppm、タバコ煙 (エイジングした副流煙
16 と主流煙) : 60 mg/m³ で、6 時間/日、4 日間、吸入による曝露を行い、呼吸器への急性影響
17 を調べた。血漿、肺組織中の α トコフェロール (AT)、コレステロール (HDL、LDL、VLDL)
18 リポタンパク質、肺組織中の mRNA (SRB1、CD36、ABCA1、ABCA3、ATTP)、肺組織中
19 のタンパク質 (SRB1、ABCA1、ATTP) を測定し、影響を評価した (観察した時点につい
20 ての記載なし)。血漿中の α トコフェロールは老齢マウスで若齢マウスよりも高かったが、
21 肺では老齢マウスが低かった。タバコ煙や O₃ 曝露によるこれらへの影響はみられなかった。
22 老齢マウスでは若齢マウスと比べて肺 ATTP、SRB1、ABCA3 発現は低く、CD36 と ABCA1
23 発現は高かった。老齢マウスと若齢マウスでともに ATTP 発現はタバコ煙や O₃ 曝露で低下
24 した。老齢マウスの SRB1 発現はタバコ煙や O₃ で低下したが、若齢マウスはタバコ煙の影
25 響は受けなかった。CD36 発現はタバコ煙や O₃ 曝露による中程度の増加が老齢マウスでの
26 み認められた。老齢マウスの ABCA1 発現はタバコ煙曝露で増加した。ACA3 発現は若齢
27 マウスでのみ O₃ 曝露によって低下した。肺 SRB1 タンパクは O₃ 曝露で低下したことから、
28 肺への AT 輸送が年齢や汚染物質曝露により影響を受けることが明らかになった。

29

30 Dormans *et al.* (2008)は、オゾンへの急性曝露及び反復曝露による肺毒性における年齢、
31 性別に関わる相違を調べた。様々な月齢(1、3、9、18 ヶ月齢)の雌雄ラットに 0.8 mg/m³ オ
32 ゾンを 12 時間/日で 1 日または 7 日間曝露し、BAL、生化学的、組織病理学的、免疫学的
33 検査により肺における浸潤、抗酸化能、組織形態、炎症の程度を評価した。形態学的評価
34 の結果、オゾン 1 日曝露および 7 日曝露の後の肺病変の程度に年齢に関連した差異が認め
35 られ、3 ヶ月齢以降のラットではオゾンの影響を受けにくくなった。対照ラットでは、肺
36 抗酸化酵素活性は 3 ヶ月齢以降、年齢と関連した低下を示した一方、オゾン曝露ラットで

1 は、9 および 18 ヶ月齢において酵素活性が上昇した。オゾン曝露に対する年齢と関連した
2 反応には、性別間で異なるパターンが認められた。急性オゾン曝露後の BALF 中のタンパ
3 ク質およびアルブミン濃度の上昇率は、1 ヶ月齢でピークに達し、9、18 カ月齢では上昇
4 率は低下した。また、雄ラット曝露後の BALF 中の多形核白血球 (PMN) 比率が加齢に伴
5 い漸減しており、加齢による感受性低下が示唆された。オゾン曝露は肺におけるリステリ
6 ア菌のクリアランスを低減させたが、オゾン曝露後のリステリア菌感染抵抗性に各月齢群
7 間の差はなかった。以上より著者らは、肺組織傷害、透過性亢進、炎症などのオゾンの毒
8 性影響に関して、若齢の動物の反応がより顕著であると結論づけた。調査したパラメータ
9 のいずれについてもオゾンへの反応の性差は観察されず、これらのデータから、年齢はオ
10 ゾンに対する肺反応の重要な予測因子であり若齢者はより感受性が強いとの見解が支持さ
11 れるとした。

12
13 Johnston *et al.* (2008)は、遺伝的肥満マウスでは先天性の気道過敏症 (AHR) と O₃ 誘発性
14 肺炎を高めることが報告されてきたが、これらの遺伝子の欠損はヒトでは稀であることか
15 ら、食事性肥満を有するマウスでも AHR および O₃ に対する肺反応の増加が観察されるか
16 を調べた。雄および雌の C57BL/6 マウス (n=5-14) に離乳後からカロリーの 10%または 60%
17 がラード脂肪に由来する食餌で 20-22 週齢または 30 週齢以上まで飼育した後、2 ppm O₃
18 に 3 時間曝露させた。20-22 週齢および 30-38 週齢のマウスの体重は、60%脂肪食群は 10%
19 脂肪食群よりも約 40%大きかった。静脈内メタコリン投与に対する気道反応性は、20-22
20 週齢では 10%脂肪食群と 60%脂肪食群で差は認められなかったが、30 週齢以上では 10%
21 脂肪食群よりも 60%脂肪食群で大きかった。室内空気または O₃ に曝露した後の肺透過性
22 および炎症について調べたところ、O₃ 曝露終了 4 時間後時点で、60%脂肪食マウスでは 10%
23 脂肪食マウスよりも BALF 中の IL-6、KC、MIP-2、インターフェロン- γ 誘導性タンパク質
24 -10 およびエオタキシンの増加が大きかった。離乳から 30 週齢まで 60%脂肪食で育成した
25 マウスでは、上記のような AHR や O₃ 曝露による炎症応答の増強が観察されたが、離乳か
26 ら 20 または 22 週まで 60%脂肪食で飼育されたマウスでは、これらの影響は認められな
27 かった。以上の結果は、食餌誘発性肥満を有するマウスが、遺伝的に肥満のマウスと同様に、
28 生来の AHR および O₃ 誘発性の肺炎症を増強させることを示している。しかし、この肺表
29 現型が観察されるまでには、長期間肥満である必要があることが示唆された。

30
31 Mikerov *et al.* (2008a)は、C57BL/6 マウス (雄および雌、8~12 週齢) に対し、O₃ を曝露
32 する実験を行った。用いた匹数は、生存試験 16 回 (雌雄各 8 種) 各群 5 匹 (手術による死
33 亡等を除き総数 130 匹)、貪食能試験 10 回各群各 3 匹である。曝露群の構成は清浄空気群
34 と O₃ 群である。曝露濃度 2 ppm で単回、3 時間の吸入曝露を行い、呼吸器への急性影響を
35 調べた。曝露直後に肺炎桿菌 (*K. pneumoniae*) を気管内投与し、感染後第 14 日までの生
36 存を観察した。また、曝露直後に肺炎桿菌に感染させ、1 時間後に BALF を採取した。肺

1 肺炎桿菌感染後の死亡と肺胞マクロファージの肺炎桿菌貪食能から影響を評価した。肺炎桿
2 菌感染後生存率は O₃ 曝露群が清浄空気曝露群よりも低かった。性差をみると、雌は肺炎桿
3 菌に感染しにくい、雌は雄よりも O₃ 曝露後の肺炎桿菌感染に対して感受性が高く、死亡
4 リスクも高かった。清浄空気曝露群では肺胞マクロファージの貪食指数 (細菌陽性
5 マクロファージの%×陽性マクロファージ中の平均細菌数) に性差はなかったが、
6 O₃ 曝露群では雌で貪食指数の低下がより大きかった。

7
8 Mikerov *et al.* (2008b)は、C57BL/6 マウス野生型 (WT) と Surfactant protein A 欠損型 (SP-A^{-/-})
9 に対し、O₃ を曝露する実験を行った。年齢は WT が 12 週齢、SP-A^{-/-} が 8 ~ 12 週齢、匹数
10 は生存試験に 149 匹、貪食能試験に 31 匹、BALF 成分分析試験に 39 匹であり、雌雄、系
11 統別に清浄空気あるいは 2 ppm で単回、3 時間の吸入曝露を行った。野生型については清
12 浄空気あるいは O₃ 曝露後に肺炎桿菌を投与しない (PBS 投与群) 群を作り、BALF の成分
13 分析に供した。曝露直後、肺炎桿菌 (*K. pneumoniae*) を気管内投与し、14 日間の生存状況
14 を観察した。また、曝露直後に肺炎桿菌を気管内投与し 1 時間後の BALF 中細胞の貪食能
15 を、PBS を気管内投与し 1 時間後の BALF 中細胞等を観察した。死亡、肺胞マクロファ
16 ジの肺炎桿菌貪食能、マクロファージ/単球、リンパ球、多型核好中球 (PMNs)、総タン
17 パク質、酸化総タンパク質、SP-A、SP-A 酸化から影響を評価した。O₃ 曝露後肺炎桿菌に
18 感染させた SP-A^{-/-} マウスは、清浄空気曝露群と比べて、生存率及び肺胞マクロファージの
19 貪食能が低下した。この傾向は雌に強くみられた。SP-A^{-/-} マウスは、WT マウスよりも肺
20 炎桿菌の感受性が高かった。清浄空気曝露 SP-A^{-/-} マウスの肺胞マクロファージの貪食能は、
21 O₃ 曝露 WT マウスと同等であった。O₃ 曝露は WT マウスの PMNs 浸潤、総タンパク質、
22 SP-A の酸化を増加させる傾向がみられ、PMNs 浸潤、総タンパク質酸化については雌でよ
23 り顕著であった。WT マウスの O₃ 曝露による SP-A 酸化は、雌が雄よりも多かった。SP-A
24 の欠損あるいは SP-A 機能の抑制 (SP-A の酸化) は、O₃ 曝露後の肺炎桿菌感染の感受性を
25 高め、この傾向は雄よりも雌において強くみられた。

26
27 Shore *et al.* (2009)は、肥満が O₃ 曝露による呼吸器の反応に影響を及ぼすか否かについて
28 明らかにするため、10~13 週齢の雌の C57BL/6 マウス (正常マウス) 及び肥満マウスであ
29 る Db/db マウスと Cpe^{fat} マウスに室内空気又は 0.3 ppm の O₃ を 72 時間、全身吸入曝露させ、
30 曝露後 30 分以内に気道抵抗、動的コンプライアンス、炎症性細胞浸潤、IL-6 産生につい
31 て観察を行った。その結果、正常マウスでは肺傷害、炎症誘導、気道コンプライアンスの
32 低下がみられたが、肥満マウスでは、浸潤した好中球の数は少なく、コンプライアンスに
33 は変化がみられなかった。次に、IL-6 の役割を探るため、正常マウスと IL-6 欠損マウスを
34 10%、60% の脂肪食で飼育し、O₃ 曝露の影響を比較した。その結果、60% 脂肪食で飼育し
35 た正常マウスで肥満が認められ、O₃ 曝露による好中球の集積が減少した。また、10% 脂肪
36 食で飼育した IL-6 欠損マウスでも同様の結果であった。肥満に依存した血清中 IL-6 量の

1 相違も観察された。従って、肥満マウスでは、O₃曝露による好中球性炎症は抑制され、そ
2 の原因としてはIL-6産生の低下によるIL-6依存の好中球浸潤の抑制が考えられる。

3
4 *Vancza et al.* (2009)は、O₃曝露に対するマウスの感受性における年齢、系統、性別による
5 差について検討するため、雌雄のA/Jマウス、AKR/Jマウス、C3H/HeJマウス、BALB/cJ
6 マウス、C57BL/6Jマウス、DBA/Jマウス、SJL/Jマウス及び129x1/SvJマウス、それぞれ
7 の成獣(生後15週)及び新生獣(生後15~16日)に空気又は0.8 ppmのO₃を5時間全身
8 吸入曝露させた。曝露終了の24時間後にBALFを採取し、肺傷害及び肺炎症のマーカー
9 として総タンパク質、総細胞数、多形核白血球を観察した。さらに、SJL/J新生マウスにつ
10 いては曝露濃度を0.2、0.4、0.6、0.8 ppmとして用量反応関係を観察し、別の1匹のSJL/J
11 新生マウスについては0.8 ppmのO₃を曝露し、曝露終了の24、48、72時間後にBALFを
12 採取し、反応の経時変化を観察した。新生マウスにおいてはO₃に対する感受性の系統差が
13 みられ、BALB/cマウス及びSJL/Jマウスでは感受性が高く、A/Jマウスと129x1/SvJマウ
14 スでは感受性が低かった。O₃曝露に対する多形核白血球の反応は、SJL/J系統、C3H/HeJ
15 系統のマウスにおいて成獣マウスより新生マウスで大きく、¹⁸Oを用いたO₃吸入量解析に
16 よればSJL/JマウスのO₃吸入量は成獣と新生獣で差がなくO₃吸入量に依存しなかった。
17 成獣では、O₃曝露に対する反応の性差がわずかにみられた。総タンパク質濃度及び多形核
18 白血球数における成獣マウスと新生マウスの間の差異は、マウスの系統に依存し、O₃に対
19 する感受性の年齢差は遺伝的な背景による可能性が示唆された。

20
21 *Mikarov et al.* (2011)は、O₃またはろ過空気(FA)曝露とそれに続く肺細菌感染後の肺お
22 よび肺外組織(脾臓および肝臓)の病理組織学的変化を研究することにより、これらの所
23 見の基礎をなす要因を調査した。8-12週齢の雌雄の野生型C57BL/6Jマウスを2ppmのO₃
24 またはFAに3時間曝露し、麻酔をかけて気管内に肺炎桿菌を接種した。組織(肺、脾臓、
25 および肝臓)は、感染から48時間後に組織病理学的解析を行った。結果、感染後、1)FA
26 曝露マウスの雌雄と比較して、O₃曝露マウスの雌雄では炎症の重症度が高く、かつ肺の患
27 部が大きく、脾臓の赤脾髄造血は低下した。2)FA曝露雌と比較して、FA曝露雄では、
28 より明確な肺外(肝臓および脾臓)病変が認められた。3)O₃曝露雄と比較して、O₃曝露
29 雌において過剰な肺の炎症反応が検出された。これらの結果より、著者らはO₃誘発性の酸
30 化ストレスの存在下または非存在下において、異なるリスク因子が性別間で異なる肺炎の
31 結果に寄与すると結論付けた。特に、O₃に曝露肺炎桿菌感染メスとFA曝露肺炎桿菌感染
32 雄における過剰な肺の炎症と肺外病変のリスクの上昇はそれぞれ、以前に観察されたそれ
33 ぞれのマウスの生存転帰において主要な役割を果たしていると考えた。

34
35 *Shore et al.*(2011)らにより、成人を対象としたチャンバー研究では、加齢とともに急性オ
36 ゾンに対する反応が低下することが示されている。加齢に伴うTNFの変化が認められてい

1 　る。 TNF α 誘発性の炎症は、主に TNFR1 に仲介される。著者らはマウスで急性オゾン曝
2 　露に対する炎症反応における加齢の影響を調べ、加齢性の違いにおける TNFR1 の役割を
3 　決定することを目的として、研究を行った。7 週齢または 39 週齢の野生型マウスおよび
4 　TNFR1 欠損 (TNFR1 $^{-/-}$) マウスをオゾン (2 ppm で 3 時間) に曝露した。曝露から 4 時間
5 　後に、気管支肺胞洗浄 (BAL) を実施し、BAL 細胞、サイトカイン、ケモカイン、および
6 　タンパク質を調べた。オゾンに誘導された BAL 好中球および好中球走化性因子の増加量は、
7 　野生型では 7 週齢と比較して 39 週齢のマウスで小さかったが、TNFR1 $^{-/-}$ マウスではそうで
8 　はなかった。7 週齢のマウスでは TNFR1 遺伝子型の影響は認められなかったが、39 週齢
9 　のマウスでは、オゾン曝露後の TNFR1 $^{-/-}$ において、野生型マウスと比べて BAL 好中球と
10 　BAL 中の MCP-1、KC、MIP-2、IL-6、IP-10 の濃度が高かった。可溶性 TNFR1 受容体 (sTNFR1)
11 　の BAL 濃度は、曝露に関係なく、39 週齢のマウスにおいて 7 週齢のマウスと比べ大幅に
12 　増加した。以上の結果は、39 週齢のマウスの肺における sTNFR1 のレベルの増加が、TNF α
13 　を中和し、これらの年寄りのマウスをオゾン誘発性の炎症から保護する可能性を示唆して
14 　いる。

15
16 　Martinez-Campos *et al.* (2012)は、急激な運動によって引き起こされる酸化ストレスは、慢
17 　性的な運動によって軽減されることから、O₃ によって生じる酸化ストレスを軽減するかど
18 　うかを調べた。パイロット実験として、10 週齢の雄の Wistar ラットに有酸素運動 (1 日 90
19 　分泳ぐように訓練) を実施した。訓練 3 週間後には、血漿中の還元型硝酸塩 (NOx) の変
20 　化により、運動への適応が確認された。その後、訓練を受けたラットに O₃ (0.5 ppm で 1
21 　日 4 時間、運動の 1 時間前) を 2 週間曝露した。対照として、静止+ろ過空気曝露、静止
22 　+O₃ 曝露、運動+ろ過空気曝露の組み合わせを実施した。実験終了時に、血漿中の NOx、
23 　8-イソプロスタニン (8-IP)、マロンジアルデヒド (MDA)、スーパーオキシドディスムター
24 　ゼ (SOD) 活性、およびカルボニル (CB) を測定した。CB はいずれの群でも変化しな
25 　かった。O₃ による酸化ストレスは、NOx と SOD 活性の低下、8-IP と MDA の増加によって
26 　示された。運動は O₃ による影響を抑制したが、SOD については運動による低下も見られ
27 　た。ただし静止+O₃ 曝露群ではより大きな低下が見られた。以上の結果から、有酸素運
28 　動は O₃ による酸化ストレスから保護し、その効果は SOD とは無関係であると結論づけた。

29
30 　Groves *et al.*(2013)は、サーファクタントタンパク質 D (Sftpd) 欠損マウスを用いて、老化
31 　による肺炎と O₃ 曝露による影響の関連について調査した。C57BL/6J または Sftpd $^{-/-}$ マウ
32 　ス (雄、8, 27, 80 週齢、n=3~6/群) に、0.8ppm の O₃ を 3 時間曝露した後、各種解析を行っ
33 　た。O₃ 曝露による影響として、8 週齢の C57BL/6J マウスでは、O₃ 曝露により活性化され
34 　たマクロファージの増加が観察されたが、Sftpd $^{-/-}$ マウスでは観察されなかった。また、
35 　C57BL/6J マウスでは O₃ 曝露により、8 週齢と 27 週齢で肺粘性抵抗の増加が認められたが、
36 　80 週齢では変化は生じなかった。弾性抵抗については、27 週齢でのみ O₃ 曝露群において

1 増加が認められたが、8週齢と80週齢では差は認められなかった。8週齢の *Sftpd*^{-/-}マウス
2 ではO₃曝露によりBALF中の細胞数およびタンパク質が増加したが、27週齢および80週
3 齢では増加は見られなかった。8週齢の *Sftpd*^{-/-}マウスではO₃曝露によりBALF中の細胞
4 数およびタンパク質が増加したが、27週齢および80週齢では増加は見られなかった。こ
5 れらの結果は、若齢動物ほどO₃曝露による肺抵抗への影響が大きいことを示唆している。

6
7 *Cabello et al.* (2015)らにより、呼吸器疾患の発生率の性差が報告されており、女性は大気
8 汚染によって引き起こされる炎症性肺疾患の影響を受けやすく、男性よりも肺への健康影
9 響が悪化しやすいことが示されている。しかし、これらの違いの根本的な機構は不明であ
10 る。本研究では、性別による肺炎症性メディエーターの発現性の違いが、環境毒性物質に
11 対する性別特異的な免疫応答に影響を及ぼすものと仮定した。また、肺免疫遺伝子の発現
12 および調節における主要な大気汚染物質であるオゾンの影響に焦点を当てた。8週齢の
13 C57BL/6J雄マウスと雌マウスを2ppmオゾンまたは濾過空気(対照)に3時間曝露した。PCR
14 アレイを用いて曝露4時間後の肺の84の炎症性遺伝子のmRNAレベルを比較した。さら
15 に、肺の組織学的変化、気管支肺胞洗浄液の細胞数とタンパク質含有量の変化を曝露24
16 時間後と72時間後に測定した。オゾン曝露によって引き起こされる肺炎症の性差、急性相
17 および炎症反応に関与する遺伝子発現における性差が明らかとされた。また、好中球誘導
18 ケモカイン(*Ccl20*, *Cxcl5*, *Cxcl2*)、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (*IL-6*)、
19 および酸化ストレス関連酵素(*Ptgs2*, *Nos2*)の発現に大きな性差が見られた。さらに、*IL-6*
20 関連免疫応答を媒介することが知られている *STAT3* のリン酸化は、オゾン曝露マウスにお
21 いて高かった。以上の結果により、肺免疫応答の調節の性差が、男性と女性の比較におい
22 て観察された、オゾンによる健康への悪影響に対する感受性の増加と関連している可能性
23 があることが示唆された。

24
25 *Dye et al.* (2015)は、循環器疾患の有無が大気汚染物質曝露による影響への感受性にどの
26 ように影響するかを調べるため、心血管系(CV)罹患ラット用いた、吸入曝露実験を行っ
27 た。健常ラット(*Wistar-Kyoto (WKY)*、*Wistar (WIS)*、*Sprague-Dawley (SD)*)、心血管疾
28 患罹患モデルラット(高血圧モデル(*SH*, *FHH*)、高血圧脳卒中モデル(*SHSP*)、肥満モデル
29 ラット(高血圧心不全モデル(*SHHF*)、アテローム性動脈硬化モデル(*JCR*))に、0.25, 0.5,
30 1.0 ppmのO₃を4時間曝露させ、肺機能と気道抵抗の変化を測定した(雄、12-14週齢、
31 n=4-8匹/群)。O₃曝露直後に、*SHHF*系統を除いた全ての系統で分換気量(MV)の濃度依
32 存的な減少を示した。空気曝露群と比較すると、1.0 ppm O₃曝露により、健康なラットで
33 20~27%、高血圧ラットで21~42%、*JCR*ラットで分換気量(MV)が33%減少したが、
34 *SHHF*ラットではほぼ変化しなかった。O₃曝露により、*Penh*は全系統で増加したが、*WKY*
35 ラットでは増加の度合いが特に大きかった。O₃曝露20時間後では大部分の変化は解消し
36 ていたが、*WKY*、*SH*、および*SHSP*における*Penh*は上昇したままであった。有効用量推

1 定値 (O_3 濃度×曝露時間×分換気量) に基づくと、CV (心血管系疾患) 関連 (SHSP および
2 SHHF) 系統では、 O_3 の肺沈着量の増加 (それぞれ 25% および 40%) が認められた。これ
3 らの結果は、心肺機能不全を有する個体において、 O_3 曝露による肺機能低下、低酸素症、
4 心不全過程の悪化リスクが高いことを裏付けている。

5 Gabehart *et al.* (2015) は、オゾン曝露における年齢の影響を調査するとともに、出生後の
6 発達期間中のオゾン曝露に対する肺の反応における toll-like 受容体 4 (TLR4) の役割を明
7 確にするためにマウスを用いた実験を行った。雌マウス (1~6 週齢) をオゾン (1 ppm)
8 またはろ過空気に 3 時間曝露した。分析は、肺透過性、気道好中球増加症、抗酸化因子と
9 ケモカインの発現、および粘液産生への影響を評価するために、曝露完了後 6 時間と 24
10 時間に実施された。TLR4 の役割は発生中の肺における TLR4 の発現を調べ、*tlr4* 欠損マウ
11 スのオゾンに対する応答を精査することによって明らかにされた。メタロチオネイン-1、
12 カルシトニン遺伝子関連産物、およびケモカイン C-X-C リガンド (CXCL) 5 は、発達の
13 期間中ずっとオゾンによって発現が誘導された一貫したマーカーだった。成体と比較して、
14 新生児は肺の TLR4 発現レベルが低く、粘液産生の増加に反応し、アルブミン漏出と好中
15 球の気道への流入の減少、CXCL1 ケモカインおよび CXCL2 ケモカインの発現低下を特徴
16 とするオゾンに対する反応の減弱を示した。*tlr4* 欠損マウスにおける応答試験は、アルブ
17 ミン漏出または粘液産生ではなく、オゾンを介した気道好中球増加症が TLR4 に依存して
18 いることを示した。以上の結果は、オゾンへの応答が年齢によって決定され、部分的に
19 TLR4 シグナル伝達に依存することを示している。新生児におけるオゾンに対する肺の反
20 応性の低下は、肺の TLR4 発現が不十分であることが少なくとも部分的に原因となった可
21 能性がある。

22
23 Hatch *et al.* (2015) は、循環器疾患 (CVD) ラットモデルやメタボリックシンドローム易
24 発性ラットモデルにおいて、肺、心臓、気管支肺胞洗浄液 (BALF) に存在する抗酸化物
25 質と酵素が、 O_3 と反応して変化するか検討した。CVD 系統[自然発症高血圧 (SH)、SH 脳
26 卒中易発性 (SHSP)、SHHF / *Mcc* 心不全肥満 (SHHF)、インスリン抵抗性 JCR: LA-cp 肥
27 満 (JCR)、Fawn-Hooded 高血圧性 (FHH)]と通常系統[Wistar、Sprague-Dawley (SD) お
28 よび Wistar Kyoto (WKY)]を比較した。0.0、0.25、0.5 および 1.0 ppm の O_3 について 4 時
29 間の鼻部局所的曝露を行い、曝露直後 (0 時間) または曝露 20 時間後の肺、心臓、および
30 BALF における総グルタチオン (GSH + GSSG または GSx)、還元型アスコルビン酸塩 (AH2)、
31 尿酸 (UA)、および抗酸化酵素について測定した。組織中の抗酸化物質の基準値および O_3
32 誘導値は系統間で大きく異なった。Wistar ラットでは肺において GSx と AH2 が O_3 によ
33 って強く増加した。JCR と SHHF の 2 つの CVD 系統間では、BALF 中の AH2 と GSx の基
34 準値が高く、肺における UA の基準値が高かった。すべての系統で、BALF 中に AH2 が多
35 量に存在する場合にのみ、BALF 中に多量の GSx が認められた。CVD ラットは通常系統
36 よりも O_3 に反応しにくい傾向を示した。BALF 中における AH2 の基準値が高いことは、

1 O₃ 毒性の低下と関連していた。要約すると、正常ラット系統と CVD ラット系統の両方の
2 系統間において、肺、BALF、心臓組織の低分量抗酸化物質濃度に大きな違いが認められ
3 た。Wistar (正常) および JCR および SHHF (CVD) ラットは、基礎的な、または O₃ 誘発
4 性の変化の点から独特で目立っているように見えた。本研究の結果は、抗酸化物質と大気
5 汚染物質の間の相互作用を明らかにし、心肺疾患への理解を深める可能性がある。

6
7 Kodavanti *et al.*(2015)は、健康なラットと遺伝的 CVD 易発性ラットは、疾患の種類と重
8 症度に依存して、急性オゾン曝露に対して重症化した応答を示すか検討した。12-14 週齢
9 の健康なオスの Wistar Kyoto (WKY)、Wistar (WS)、Sprague Dawley (SD)、心血管不全
10 の自然発症高血圧 (SH)、Fawn-Hooded 高血圧 (FHH)、脳卒中易発性の自然発症高血圧
11 (SHSP)、肥満の自然発症高血圧性心不全 (SHHF)、および肥満 (JCR) ラットを 0.0、0.25、
12 0.5、1.0 ppm のオゾンに 4 時間曝露し、肺障害および炎症について、曝露直後 (0 時間)
13 または曝露 20 時間後に分析した。気管支肺胞洗浄液 (BALF) タンパク質の基準値は、健
14 康な系統と比較すると FHH を除いて CVD 系統で高かった。オゾンによるタンパク質と炎
15 症の増加は、各系統で濃度依存性を示したが、反応の程度は系統ごとに、また時間ととも
16 に異なっていた。健康なラットの中で、SD 系が最も影響を受けなかった。CVD 系統の中
17 では、非肥満ラットは肥満ラットよりもオゾンによるタンパク質漏出が起りやすかった。
18 オゾンは SH 系と SHHF 系において好中球性炎症を最も引き起こさなかったが、SHSP 系と
19 FHH 系は最も影響を受けた。データセット全体を考慮すると、BALF 中の好中球とタンパ
20 ク質の相関性は乏しかった ($r=0.55$)。サイトカイン mRNA の基準値およびオゾン誘発性
21 の増加は、系統間で著しく異なり、炎症との相関は認められなかった。これらの結果は、
22 健常ラットと CVD ラットではオゾン誘発性の肺障害/炎症反応の程度が大きく異なり、
23 CVD モデルにおいて心血管不全の性質を決定する遺伝的要因と生理学的要因の両方の影
24 響を受けている可能性が高いことが示唆された。

25
26 Williams *et al.* (2015)は、TNF- α がこの全身性炎症の主要影響因子としての効果を介して、
27 肥満マウスのオゾンに対する先天的な AHR および増強応答を調節すると仮定して実験を
28 行った。そこで、12 週齢の雌マウス (C57BL/6、TNF α -/-、Cpe^{fat}、Cpe^{fat}/TNF α -/-) を用い
29 て、オゾン曝露 (3 時間、2ppm)の肺炎症および気道反応性を調べた。なお、Cpe^{fat} マウス
30 は、満腹を調節するカルボキシペプチダーゼ E を欠損している。野生型と比較して、Cpe^{fat}
31 マウスは血清中 IL-17A、G-CSF、KC、MCP-1、IL-9、MIG、およびレプチンが増加し、全
32 身性炎症を示した。Cpe^{fat}/TNF α -/-マウスでは TNF- α を欠損していない Cpe^{fat} マウスと比較
33 して、これらの影響の大部分が減少していたにも関わらず、いずれのマウスにおいても気
34 道反応性の向上が認められた。Cpe^{fat}/TNF α -/-マウスでは Cpe^{fat} マウスと比較して、オゾン
35 誘発性気管支肺胞洗浄(BAL)好中球およびマクロファージの増加は低かったが、オゾン誘
36 導 AHR および BAL 中のヒアルロン、オステオポンチン、IL-13、および酸化ストレスのマ

1 一カーであるタンパク質カルボニルは増加していた。これら結果は、TNF- α が肥満個体に
2 おける先天的な AHR ではなく全身炎症を促進する上で重要な役割を有することを示して
3 おり、肥満の全身炎症が先天的な AHR の主要因子ではないことが示唆された。TNF- α は、
4 肥満マウスにおける肺炎症性細胞動員に対する急性オゾン曝露の影響を増すのに必要であ
5 るが、オゾン誘導酸化ストレスを抑制することにより、TNF- α 肥満マウスをオゾン誘導
6 AHR からは保護するものと考えられる。

7
8 Gordon *et al.* (2016a)は、疫学的研究により、座りがちな生活様式はいくつかの環境性汚
9 染物質に対する感受性を増加させている可能性があることが示唆されていることから、60
10 日齢の雌の Sprague-Dawley ラットを回し車で連続的に運動させることにより、座りがちな
11 生活様式と対照的な、活動的な生活様式のモデル動物を用いた。また、座りがちな生活様
12 式のモデル動物として、回し車のない標準的なケージで飼育されたラットを使用した。12
13 週間の運動訓練の後、ラットは 0、0.25、0.5、または 1.0 ppm の O₃ に曝露された(5 時間/
14 日、1 日/週、6 週間)。実験期間を通して、体組成(体脂肪率、除脂肪量、水分量)を非侵
15 襲的に測定した。換気パラメーター(一回換気量、分時換気量、呼吸頻度および気道収縮指
16 標(Penh: enhanced pause))については、O₃ 曝露前と 5 週間の曝露後から 24 時間経過時に、
17 全身プレチスモグラフィを使用して評価した。12 週間の運動訓練により体脂肪が約 2%
18 低下した。ホイールアクティビティの最大値は、O₃ への曝露後に 40%減少した。5 週間の
19 O₃ 曝露後、運動訓練群において体重と体脂肪率が減少した。気道収縮指標 (Penh) は、O₃
20 への曝露の翌日に、運動訓練群と比較して、回し車のないケージで飼育したラットで上昇
21 した。しかしながら、5 週間の曝露後に測定された BALF 中の細胞数および炎症バイオマ
22 ーカーについては、運動訓練による一貫した影響はみられなかった。運動負荷により、O₃
23 曝露からの肺の回復について改善を示すいくつかの兆候を示したが、O₃ 曝露下での運動は
24 一部の肺におけるエンドポイントには悪影響を及ぼした。座りがちな生活様式は O₃ に対す
25 る感受性を高める可能性があるが、更なる研究が必要である。

26
27 Gordon *et al.* (2016b)らにより、食事による肥満は、オゾン(O₃)などの大気汚染物質に対す
28 る感受性の増加につながることを示唆されている。しかしながら、実験的な証拠はほとん
29 どない。30 日齢のオスとメスの Brown Norway ラットは、通常の餌、高フルクトース餌ま
30 たは高脂肪餌を 12 週間与えられ、O₃ に曝露された(急性—空気または 0.8 ppm の O₃ に 5 時
31 間、亜急性—空気または 0.8 ppm の O₃ に 5 時間/日、週に一日の頻度で 4 週間)。体組成は
32 NMR を用いて非侵襲的に測定した。呼吸パラメーターおよび探索行動は、亜急性曝露の 3
33 週間後に測定した。気管支肺胞洗浄液(BALF)および血液の化学的データは、急性曝露では
34 O₃ 曝露から 18 時間後に、亜急性曝露では 4 週間の O₃ 曝露を終えてから 18 時間後に収集
35 した。食事制限はメスではなくオスの Brown Norway ラットの体脂肪の増加をもたらした。
36 O₃ に誘発された呼吸機能の変化は、フルクトース餌と脂肪餌によって影響を受けない、ま

1 たは改善された。O₃ 誘発性の探索行動の低下は、フルクトース餌と脂肪餌のオスおよび一
2 部のメスにおいて減弱された。O₃ はフルクトース餌や脂肪餌ではなく、対照餌を与えたオ
3 スにおいて体脂肪を減少させた。O₃ は BALF 中の好酸球の増加、アルブミンの増加、およ
4 びマクロファージの減少をもたらした。メスは食餌に関係なくオスよりも O₃ の影響が現れ
5 た。全体として、高フルクトース餌および高脂肪餌による処理は、肺の機能、行動、およ
6 び代謝に対するいくつかの O₃ に誘発される効果を減弱させた。O₃ の毒性による症状の憎
7 悪はそれほど頻繁には認められなかった。

8
9 Miller *et al.* (2016a)は、副腎由来のストレスホルモンの増加がオゾンに誘発される代謝影
10 響と肺損傷の両方に必要であると仮定し、これを検証した。オスの Wistar-Kyoto ラットに、
11 両側副腎髓質摘出術 (DEMED)、両側副腎全摘出術 (ADREX)、または偽手術 (SHAM)
12 を行った。4 日間の回復後、ラットを空気またはオゾン (1 ppm) に 4 時間/日で 1 日また
13 は 2 日間曝露し、曝露直後に応答性を評価した。循環アドレナリンレベルは、SHAM と比
14 較して DEMED および ADREX ラットではほぼゼロまで低下した。コルチコステロンは、
15 DEMED ラットでは低くなる傾向があり、ADREX ラットではほぼゼロまで低下した。空気
16 曝露した副腎摘出術ラットは、代謝物と肺毒性パラメーターに中程度の変化を引き起こし
17 た。オゾン誘発性高血糖および耐糖能異常は、DEMED ラットで著しく弱められ、ADREX
18 ラットではほぼ完全に逆転した。オゾンは SHAM において循環エピネフリンおよび循環コ
19 ルチコステロンを増加させたが、DEMED または ADREX ラットでは増加させなかった。
20 遊離脂肪酸 (P = .15) と分岐鎖アミノ酸は、SHAM ではオゾン曝露後に増加したが、DEMED
21 または ADREX ラットでは増加しなかった。肺の毎分呼吸量は手術やオゾンの影響を受け
22 なかったが、オゾンに誘導された努力呼吸は ADREX ラットにおいて明白ではなかった。
23 オゾンによる肺タンパク質漏出および好中球性炎症の増加は、DEMED および ADREX ラ
24 ットで著しく減少した (ADREX > DEMED)。 SHAM における循環白血球のオゾンを介し
25 た減少は、DEMED および ADREX ラットでは認められなかった。オゾン誘発性の末梢代
26 謝作用および肺損傷/炎症は、おそらくストレス反応経路の活性化を介して、副腎由来のス
27 トレスホルモンに媒介される可能性が示唆された。

28
29 Mishra *et al.* (2016) は、O₃ 曝露に応答した肺インターロイキン-6 (IL-6) とその下流のシ
30 グナル伝達経路 JAK2/STAT3 および AKT1/NF-κB の性別による調節差異を調べた。8 週齢
31 の C57BL/6 雄マウスと発情周期の異なる雌マウスに 2 ppm の O₃ を 3 時間曝露させ、肺組
32 織を採取し、ウェスタンブロットによるタンパク質発現分析を行った。O₃ 曝露群は FA 群
33 に対し、雌では IL-6 と IL-6R、オスでは IL-6 の発現量の増加が認められた。O₃ 曝露は、雌
34 とオスの両方で STAT3-Y705 リン酸化の増加を誘導した。O₃ に曝露されたオスは JAK2 の
35 レベルが低下したが、JAK2 (Y1007+Y1008) のリン酸化が増加し、O₃ に曝露されたメス
36 は両方のタンパク質について発現量の増加を示した。NF-κB (p105/p50) と AKT1 タンパ

1 量は、 O_3 に曝露されたメスでのみ増加した。さらに、発情前の期間に O_3 に曝露された
2 雌は、他の発情周期段階で O_3 に曝露された雌と比較すると、特定の遺伝子の発現量が増加
3 していた。著者らは、これらの結果は、 O_3 に対する性依存性および発情周期依存性がある
4 異なる肺炎症反応と、2つの合流する JAK2/STAT3 および AKT1/NF- κ B 経路の関与を示
5 しているとした。

6
7 Snow *et al.* (2016)は、 O_3 が肺や全身の健康に悪影響を及ぼすことが知られていることと、
8 子供と高齢者では O_3 誘発性機能障害のリスクがあるとされているが、年齢に伴う O_3 に対
9 する肺の反応メカニズムは未だ不明であることから、1ヶ月齢 (adolescent)、4ヶ月齢 (young
10 adult)、12ヶ月齢 (adult) および 24ヶ月齢 (senescent) の雄の Brown Norway ラットに、
11 ろ過空気または O_3 (0.25 または 1.00 ppm) を 6時間/日で 2日/週、それを 1週間 (急性)
12 または 13週間 (亜慢性) で吸入曝露させ、年齢と O_3 に対する感受性の相関を調べた。全
13 身プレチスモグラフィによる換気機能の評価と、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の炎症の
14 バイオマーカーにより、 O_3 によって誘発される肺への影響を調べた。亜慢性 O_3 曝露にお
15 いて、曝露 1日後の測定では、すべての月齢で弛緩時間 (Relaxation time) が減少した。こ
16 の効果は、 O_3 曝露 5日後まで 24ヶ月齢のラットでのみ持続しており、 O_3 の反復曝露で一
17 般的に見られる順応を誘導できていないことを示していた。急性 O_3 曝露ではすべてのグル
18 ープで PenH が増加したが、亜慢性曝露では 4ヶ月齢のラットにおいて PenH の増加がみら
19 れた。また亜慢性 O_3 曝露は 4ヶ月齢ラットにおいて呼吸頻度と分時呼吸量の増加を誘導し
20 た。1ヶ月齢ラットにおいては、急性曝露でのみ分時呼吸量の増加が見られた。急性 O_3 曝
21 露後の BALF 中の γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性および肺炎症の増加は、1ヶ月齢
22 と 4ヶ月齢のラットでのみ認められ、呼吸量の増加により O_3 の効果用量が増加したことが
23 示唆された。これらのデータは、老齢ラットよりも若齢ラットで、 O_3 曝露によって引き起
24 こされる換気機能への影響や肺損傷/炎症がより生じやすいことを示している。また、老齢
25 ラットでは O_3 曝露からの回復が遅延した。

26 Zychowski *et al.* (2016) は、HPH への罹患が急性 O_3 肺毒性に対する脆弱性を与えると仮
27 定した。さらに、rho キナーゼ阻害を介した肺血管内皮バリア機能の改善が、肺の炎症と
28 損傷を軽減できるかどうかテストした。 O_3 が HPH を悪化させたかどうかを判断するため
29 に、オスの C57BL/6 マウスを 3週間連続で正常酸素 (20.9% O_2) または低酸素 (10.0% O_2)
30 にさらし、続いて 1 ppm の O_3 またはろ過空気 (FA) に 4時間曝露した。追加の実験的処
31 置として、Rho キナーゼ阻害剤であるファスジル (20 mg / kg) を O_3 曝露の前後に腹腔内
32 投与した。解析の結果、予想通り、低酸素曝露は右心室圧と肥大を増加させた。正常酸素
33 状態のマウスへの O_3 曝露は、肺の細胞増加と浮腫に示されるように、肺の炎症を引き起
34 したが肺の損傷は引き起こさなかった。しかしながら、低酸素マウスにおいて、 O_3 曝露は
35 メタコリンに対する気道過敏性の大幅な増加に加えて、炎症と浮腫の増加を誘導した。フ
36 ァスジル投与は、肺血管内皮バリア機能の増強を介して、 O_3 誘発性肺損傷の縮小をもたら

1 した。これらの結果は、汚染物質にさらされたとき、肺血管圧の上昇が肺の損傷、炎症、
2 浮腫を高める可能性と、肺血管内皮バリア機能の増強がそのような脆弱性を軽減する可能
3 性を示している。

4
5 *Gordon et al. (2017a)*らにより、疫学のおよび実験的なデータは、肥満がオゾン(O₃)などの
6 大気汚染物質による健康への影響が悪化することを示唆している。母胎の運動不足と高カ
7 ロリーの食事は、出生児に肥満の兆候を示している。出生児の O₃ 感受性の悪化は、このよ
8 うに母親の肥満によって現れる可能性がある。30 日齢のメスの Long-Evans ラットは、6
9 週間の対照餌(CD)または高脂肪餌(HF)(60%カロリー)を与えられ、その後繁殖させた。妊娠
10 一日目のラットは出産時まで回し車あり(RW)または回し車無し(SED)のケージに収容され、
11 CD-SED, CD-RW, HF-SED および HF-RW の 4 つの子孫グループを作成しました。HF 餌は
12 出産後 35 日目で終了し、出生児には対照餌が与えられた。母体の体重と体脂肪率は
13 HF-SED > HF-RW > CD-SED > CD-RW の順番に高かった。耐糖試験(GTT)、呼吸パラメー
14 ター(プレチスモグラフィ)、気管支肺胞液(BALF)細胞数およびタンパク質バイオマーカ
15 ーを用いて、出生児の O₃ に対する応答性を評価した。運動と食事は、出生児の体重と体脂
16 肪率を変化させた。GTT、呼吸パラメーターおよび BALF 中の細胞数は O₃ によって悪化し、
17 特にオスの応答性は著しく悪化した。HF 餌と O₃ はいくつかの BALF パラメーターの悪化
18 を誘導した: 総細胞数、好中球およびリンパ球は、CD-SED のオスと比較して HF-SED の
19 オスで増加した。オスは O₃ 曝露後に高血糖になり、GTT 応答性が悪化していた。オスで
20 は呼吸機能障害も悪化した。母親の運動は O₃ 応答性にわずかな影響を及ぼした。本研究の
21 結果は、母親の肥満と成長した仔の性特異的な O₃ 感受性の間に関係があることを示唆して
22 いる。

23
24 *Gordon et al. (2017b)*は、カロリー豊かな食事に加え、座りっぱなし(SED)のライフスタイ
25 ルの有病率は、小児肥満の増加に拍車をかけており、成人期の健康への悪影響にもつなが
26 ることと、肥満と活動的 (ACT)生活習慣の欠如は、大気汚染物質に対する感受性を高める
27 可能性があることから、22 日齢の雌 Long-Evans ラットをケージ内のランニングホイール
28 なし(SED) またはホイールあり (ACT)で飼育した。10 週間で、ラットは 310± 16.3 キロを
29 走った。O₃ の全身曝露(0、0.25、0.5、または 1.0ppm ; 2 日間 ; 5 時間/日)に対する SED お
30 よび ACT ラットの反応を調べた。グルコース負荷試験(GTT)は、O₃ 曝露 1 日目の後に実施
31 した。ACT ラットでは、体脂肪が少なく、グルコース GTT の結果が改善した。SED およ
32 び ACT 群の呼吸機能(プレチスモグラフィ)は、いずれも O₃ 曝露によって同様に損なわ
33 れた。気管支肺胞洗浄液(BALF)は 2 回目の O₃ 曝露後に採取した。SED および ACT ラット
34 は、1.0 ppm O₃ 曝露後、高血糖を示し、GTT の結果は両方のグループで O₃ によって悪化し
35 た。しかし、1.0 ppm O₃ 曝露において、SED ラットは ACT ラットよりも血中グルコース濃
36 度の回復が遅かった。BALF 細胞好中球および全細胞は、1.0 ppm O₃ に曝露された ACT お

よび SED 群において同様に増加した。SED ラットでは、O₃により誘導される好酸球の増加は悪化した。離乳後から成人期までの習慣的な運動は、O₃に対する代謝および肺応答の一部(GTT および好酸球)を改善したが、他のいくつかのパラメータは影響を受けなかった。BALF 好酸球の O₃誘発上昇の ACT ラットにおける減少は、SED ラットのライフスタイルと O₃に起因する喘息関連症状の発生率が関連している可能性を示唆している。

Mathews *et al.* (2017a)は、肥満マウスと痩せたマウスの肺メタボロームに対するオゾンの影響を調べた。除脂肪食野生型マウスおよび肥満の db/db マウスは、オゾン (2 ppm で 3 時間) または空気に急性曝露された。24 時間後、肺を切除し PBS で洗浄して血液を除去し、液体クロマトグラフィーまたはガスクロマトグラフィーと代謝物の質量分析を組み合わせて分析した。肥満とオゾンの両方で肺のメタボロームに変化を引き起こした。同定された 321 個の化合物のうち、101 個は空気曝露されたマウスにおいて肥満による影響を受けた。これらには、炭水化物と脂質の代謝に関連する生化学物質が含まれ、痩せたマウスと比較して肥満マウスとの肺でそれぞれ増加した。これらの代謝物の変化は、これらの成分にシグナル伝達能力があると仮定すると、機能的に重要である可能性がある。オゾンは、肥満マウスにおいて肺メタボロームに異なる影響を及ぼした。たとえば、ほとんどすべてのホスホコリン含有リゾ脂質はオゾン曝露により除脂肪食野生型マウスで減少したが、この影響は肥満マウスでは弱められた。肥満マウスと除脂肪食野生型マウスにおいてグルタチオン代謝は異なるオゾンの影響を受けた。最後に、肺のメタボロームは、肥満とオゾンの両方の影響におけるマイクロバイオームの役割を示した: 測定されたすべての細菌/哺乳類の共代謝物は、肥満および/またはオゾンにより影響を受けた。以上より著者らは、肥満の代謝障害はオゾンへの応答に影響を与えるとした。

Mathews *et al.* (2017b)は、肥満マウスにおけるオゾンによる影響の増加への IL-33 の役割について研究を行った。野生型マウスおよび肥満モデル (db/db) マウスを抗 IL-33 受容体 ST2 抗体で予め処置し、次いでオゾンに曝露した (2ppm、3 時間)。気道反応性の評価、気管支肺胞洗浄(BAL)を実施、そして 24 時間後に肺細胞を採取しにフローサイトメトリーに供した。オゾンの影響について、 $\gamma\delta$ T 細胞欠損型肥満マウスならびに lean マウス、そしてそれらの野生型コントロールについても調べた。オゾン曝露により、痩せマウスよりも肥満マウスにおいて BAL 中の IL-33、好中球、気道反応性が大きく増加した。抗 ST2 は、肥満マウスにおけるオゾン誘発気道過敏性および炎症を減少させたが、lean マウスには影響がみられなかった。肥満により、さらに BAL 中の CXCL1 および IL-6 および BAL II 型サイトカインにおけるオゾン誘発増加が増したが、抗 ST2 処置はこれらのサイトカインを減少させた。肥満マウスでは、オゾンは肺 IL-13+2 型自然リンパ球 (ILC2) および IL-13+ $\gamma\delta$ T 細胞を増加させた。オゾンは ST2+ γ T 細胞を増加させた。このことから、これらの細胞が IL-33 の標的となり得ること、また、 $\gamma\delta$ T 細胞の欠損は、2 型サイトカインの増加を含む、

1 オゾンへの反応における肥満に関連した増加を減少させたことが示唆された。これらデー
2 タは、IL-33 が肥満マウスのオゾンに対する増強応答に寄与することを示している。肥満
3 とオゾンはまた、観察された IL-33 の影響に寄与する肺の $\gamma\delta$ T 細胞および ILC2 における 2
4 型サイトカイン産生を促進するために相互作用するものと考えられる。

5
6 Fuentes *et al.* (2018)は、8 週齢の雌雄の C57BL/6 マウスに、2ppm の O₃ または濾過された
7 空気 (コントロール) を 3 時間吸入曝露させ、曝露後に肺を採取し、総 RNA を抽出した。
8 PCR アレイを使用し、炎症および免疫遺伝子の標的であると予測された 84 の miRNA の発
9 現における性差を調査した。雌マウスについては性周期の段階毎に曝露を実施した。解析
10 の結果、対照群のマウス肺組織において miRNA の発現に性差が確認され、雌に比較して
11 雄は miR-222-3p のアップレギュレーションと miR-466k のダウンレギュレーションが認め
12 られた。in silico での解析では、これらの miRNA と、転写因子やがん原遺伝子 (FOS、JUN、
13 FOXO₃、FOXP3、E2F1、CDKN2B、CCND1、ARID3B、TP53、KIT)、翻訳制御因子 (AGO2)、
14 輸送体 (小胞介在性輸送体 CLVS2、チャンネル/小孔クラス輸送体 BCL2)、核受容体 (ESR1、
15 RORB)、キナーゼ (BRAF、SBK1)、成長因子 (BDNF)、ホスファターゼ (PTEN)、細胞
16 外マトリックスのタンパク (TIMP3) などの主要な遺伝子ファミリーとの関連性が示され
17 た。O₃ に曝露された雌マウスでは、雄マウスと比較して 9 つの miRNA の発現が減少して
18 いた。O₃ に曝露された雌雄両方において同様に発現変化が認められた 8 つの miRNA の内、
19 6 つの miRNA について雄でアップレギュレーションが認められた (細胞周期や細胞死、細
20 胞の生存、細胞の運動に関連のある miR-338-5p、miR-222-3p、miR-130b-3p、let-7i-5p、
21 miR-195a-5p、miR-144-3p)。これらの miRNA の上位相互作用ネットワークは消化器系の発
22 達や機能、消化器疾患、肝臓の発達や機能、炎症性障害や反応に関連がある。雌では O₃
23 曝露により免疫系の調節因子を標的とする miR-301b-3p、miR-694、miR-669 h-3p、
24 miR-384-5p、miR-9-5p が発現し、miR-30d-5p の発現にダウンレギュレーションが認められ
25 た。これらの上位相互作用ネットワークはがん、臓器の障害や異常、生殖器疾患に関連し
26 ていた。上位の分子機能は細胞の発達や成長、増殖、細胞周期に影響した。肺の炎症に不
27 可欠な遺伝子を標的とする miR-712-5p は O₃ に曝露された雌雄両方でアップレギュレーシ
28 ョンが認められ、miR-106a-5p は雄ではアップレギュレーションが、雌ではダウンレギュ
29 レーションが認められた。miR-338-5p、miR-106a-5p、let-7a-5p といった雄のみで O₃ の影
30 響を受けた miRNA では IL-6 ファミリーを標的とすることが予測された。miRNA の応答は
31 性周期によって変化することが示された。発情前期に O₃ に曝露された雌では miR-694、
32 miR-9-5p、miR-712-5p、miR-181d-5p、miR-98-5p、miR-200c-3p、miR-221-3p、miR-126a-5p、
33 miR-106a-5p の発現に違いが認められた。対照的に発情後期、発情期、発情休止期 O₃ に曝
34 露された雌では影響を受けたのは miR-23b-3p と miR-30c-5p のみであった。これらの結果
35 は、性別とホルモン状態の両方が O₃ 曝露に応答する肺の miRNA 発現に影響を与える可
36 能性があることを示した。炎症性遺伝子発現の性特異的な miRNA 調節が、汚染物質に対

1 する健康へ影響の性差を仲介しうることが示された。

2
3 Mathews *et al.* (2018)は、肥満マウスで観察されたオゾンに対する応答における肥満関連
4 の増加における IL-17A の役割を検討した。正常野生型および肥満 db/db マウスを IL-17A
5 遮断またはアイソタイプ抗体で前処理し、空気またはオゾン(3 時間、2ppm)に曝露し、24
6 時間後に観察した。肺組織遺伝子発現のマイクロアレイ解析を用い、抗 IL-17A の作用機構
7 について調べた。正常マウスと比較して、オゾン曝露された肥満マウスは BAL IL-17A の
8 濃度が高く、肺 IL-17A1 細胞数も多かった。IL-17A1 細胞動員および活性化に重要なサイ
9 トカインである BAL 中の IL-23 および CCL20 のオゾンの誘発による増加は、肥満マウス
10 においてもより大きかった。抗 IL-17A 処置により、オゾン誘発気道過敏性は、正常マウス
11 で観察されたレベルに低下した。また、抗 IL-17A 処置は、正常マウスと肥満マウスの両方
12 で BAL 好中球を減少させた。CXCL1 の減少に起因するものと考えられる。マイクロア
13 レイ解析により、オゾン曝露後に肥満マウスの肺で上昇し、抗 IL-17 処置後に減少する遺伝
14 子のうち、ガストリン放出ペプチド(GRP)受容体(Grpr)を同定した。さらに、オゾン曝露は、
15 正常マウスよりも肥満マウスにおいて BAL 中の GRP を大きく増加させ、GRP 中和抗体措
16 置はオゾン誘発気道過敏性および好中球動員における肥満関連の増加を減少させた。
17 IL-17A が db/db マウスのオゾンに対する増強応答に寄与することが示された。また、IL-17A
18 は、少なくとも部分的に Grpr 発現を誘発することによって作用するものと考えられた。

19
20 Wong *et al.* (2018)は、成熟した成体の正常血圧および自然発症高血圧 (SH) Wistar-Kyoto
21 ラットの肺における、O₃ と超微粒子状物質 (UFPM) の生物学的作用強度を調査すること
22 を目的として研究を行った。意識下で、正常な Wistar-Kyoto (NW) ラットおよび SH ラッ
23 トのオスの成体は、ろ過空気 (FA)、燃焼由来 UFPM (~250 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、O₃ (1.0 ppm)、また
24 は UFPM + O₃ (~250 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ + 1.0 ppm) に 6 時間曝露後、8 時間の FA 下回復期間があった。
25 肺切片は、気道、終末細気管支/肺胞管領域、肺胞柔組織、および血管系の病変について評
26 価した。NW ラットと SH ラットは、複合曝露によって同様に影響を受け、気道と末梢気
27 道の両方で深刻な損傷を示した。SH ラットは特に O₃ 曝露に感受性が高く、終末細気管支
28 の損傷増加と大きな気道の上皮変性を示した。UFPM 曝露群の組織学的変化は最小限だっ
29 た。UFPM の化学組成は O₃ の添加によって変化した、これはオゾンが化合物の分解を促
30 進したことを示している。O₃ は、UFPM の生物学的作用強度を高め、曝露による肺損傷を
31 増大させた。CVD の病理学的症状は、正常な肺の防御と曝露への応答を損なわせること
32 より大気汚染に対する感受性を増加させる可能性がある。

33 34 1.1.9. 複合曝露による呼吸器影響に関する知見

35 Bouthillier *et al.* (1998)は、都市の粒子状物質と O₃ の吸入に対するラット肺の急性反応を
36 調べた。雄の Specific-pathogen-free Fischer 344 ラットに 0.8 ppm の O₃ 及び/又は 40 mg/m³

1 の EHC-93 粒子を 4 時間/日で、1 日又は 3 日吸入曝露させ、曝露から 20 時間後に肺組織お
2 よび、中央腺房の中隔細胞の形態、BALF 中成分（タンパク質、フィブロネクチン、好中
3 球、マクロファージ）および、BAL からの洗浄細胞（一酸化窒素、TNF- α 、MIP-2、ET-1）、
4 及び血中 ET-1 を解析した。EHC-93 粒子への曝露後に清浄空気に 20 時間曝露しても、急
5 性肺損傷は生じなかったが、EHC-93 粒子曝露により、肺胞マクロファージからの一酸化
6 窒素の産生が減少し、肺胞洗浄液中の細胞からの **macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)**
7 の分泌が増加した。O₃ を吸入すると、肺洗浄液中の好中球とタンパク質が増加した。O₃
8 単独曝露でも肺胞マクロファージの食作用と一酸化窒素産生が減少した。肺洗浄液中の細
9 胞による ET-1 分泌は 1 日の曝露では減少したが、3 日間の曝露では増加した。MIP-2 の分
10 泌に変化はなかった。EHC-93 粒子との複合曝露は、中央腺房における O₃ 誘発性の中隔細
11 胞性 (**septal cellularity**) を増強したが、O₃ 曝露に関連した肺胞好中球増加および BALF 中
12 タンパク質に測定可能な相乗効果はなかった。強化された中隔肥厚の増悪は、肺洗浄細
13 胞による MIP-2 と ET-1 の両方の産生増加と関連していた。興味深いことに、EHC-93 粒子
14 の吸入は ET-1 の血漿中濃度を増加させたが、この応答は、中心窩中隔組織の変化に対す
15 る O₃ と EHC-93 粒子の相乗効果とは関連していなかった。これは、毛細血管内皮生成ある
16 いは血管収縮性物質の透過性に対して、遠位に分布している粒子状物質の量が影響してい
17 ることを示唆している。総じて、汚染物質への単回曝露または 3 日間の連続曝露後で、同
18 様の影響パターンが観察された。これらの結果は、O₃ と粒子状物質の肺への急性影響に
19 関する疫学的証拠と一致しており、EHC-93 粒子曝露によって心血管への影響が誘発され
20 るメカニズムを示唆している。

21

22 Cohen *et al.* (1998)は、Cr 化合物の免疫毒性、及び O₃ との複合曝露の影響を評価するため、
23 雄の FISHER344 ラットに K₂CrO₄ あるいは BaCrO₄ の 360 $\mu\text{g Cr/m}^3$ の粒子状物質（粒径 0.4
24 ~0.6 μm ）と 0.3 ppm の O₃ を単独又は複合で 5 時間/日、5 日/週で 2、4 週間、鼻部吸入曝
25 露した。対照群にはろ過空気を曝露させた。曝露群はそれぞれ K₂CrO₄ 群、BaCrO₄ 群、
26 O₃ 群、K₂CrO₄+O₃ 群、BaCrO₄+O₃ 群とした。最終曝露の 24 時間後に BALF を採取し、細
27 胞数、洗浄液より採取した肺胞マクロファージからの *Ex Vivo* でのサイトカイン産生、活
28 性酸素代謝物産生、NO 産生について調べた。K₂CrO₄+O₃ 群では、他の曝露群に比べ肺洗
29 浄液中の総細胞数は増加した。BaCrO₄ 群では、2 週間曝露では対照群よりも総細胞数は増
30 加したが、4 週間曝露では差はみられなかった。K₂CrO₄ 群では、BaCrO₄ 群に比べ IL-1 産
31 生の抑制が強かった。これとは反対に、NO、O₂⁻、H₂O₂ 産生については BaCrO₄ 群での影響
32 がより顕著であった。しかしながら、いずれの指標でも O₃ との複合曝露では、Cr⁶⁺化合物
33 単独曝露でみられたような影響は認められなかった。

34

35 Sindhu *et al.* (1998)は、細胞増殖や分化、抗炎症作用等と関連のあるポリアミン量に及ぼ
36 す O₃ と硝酸蒸気慢性曝露の影響を検討した。FISHER344/N ラット（8 週齢）の雄を 4 群に

1 わけ O₃ と HNO₃ 蒸気に 40 週間の慢性的な曝露を行い、肺ポリアミン (putrescine, spermidine,
2 spermine) 含量を指標に検討した。4 時間/日、3 日/週の条件で 40 週間の鼻部吸入曝露に
3 よる反復曝露を行った。曝露群の構成は①清浄空気群、②0.15ppm の O₃ 単独曝露群、③50
4 µg/m³ HNO₃ 蒸気の単独曝露群、④0.15ppm の O₃ と 50 µg/m³ の HNO₃ 蒸気の複合曝露群と
5 した。④の O₃ と HNO₃ 蒸気の複合曝露群では、肺での putrescine の増加が観察された。
6 spermidine 及び spermine は、いずれの曝露群でも差は観察されなかった。

7
8 Adamson *et al.* (1999)は、都市粒子状物質が O₃ による傷害を増悪するかどうか検討するた
9 め、雄の FISHER344 ラットに 0.8 ppm の O₃、50mg/m³ の都市粒子状物質 (オタワ粉じん、
10 EHC-93) を単独あるいは複合で 4 時間、鼻部吸入曝露させた。粒子状物質は、個々の粒子
11 の粒径は 1µm より小さく、空気動学的中央粒子径は、4.15 ± 1.93 µm であった。対照群
12 は清浄空気に曝露させた。曝露終了の 32 時間後、トリチウム化チミジンを腹腔内投与し、
13 90 分後、肺組織を採取し、細胞へのトリチウム化チミジンの取り込み、好中球の浸潤につ
14 いて調べた。EHC-93 と O₃ の複合曝露により、肺組織や気道における標識細胞の割合、好
15 中球及びマクロファージ数が O₃ 単独曝露と比較し増加した。この結果により、都市粒子状
16 物質は O₃ の影響を増悪することが見出された。

17
18 Farman *et al.* (1999)は、雄の Sprague-Dawley ラットに 0.8 ppm の O₃ 及び 14.4 ppm の
19 NO₂ を単独 (O₃ 群、NO₂ 群)、又は複合曝露 (O₃+NO₂ 群) させた。対照群には、ろ過空気
20 を曝露させた。各群、6 時間/日で、7、78 (O₃+NO₂ 群のみ)、90 日間の吸入曝露後、屠殺
21 し、肺線維化、プロコラーゲンの肺での遺伝子発現について、亜急性～慢性影響を検討し
22 た。O₃ と NO₂ の曝露で惹起される肺の好中球性炎症や線維化増悪にもなって、小葉中心
23 部での I 型及び III 型プロコラーゲンのメッセージレベル増強が観察された。著者らは、
24 O₃ と NO₂ の複合曝露で惹起される肺の線維化のメカニズムには、肺での I 型及び III 型コ
25 ラーゲンのメッセージ発現増強が寄与すると結論している。

26
27 Kleinman *et al.* (1999)は、O₃ や酸性粒子の曝露が呼吸機能や炎症に及ぼす影響に、適応が
28 あるかどうかを検討するため、Sprague-Dawley ラットに 0.2、0.4 ppm の O₃ を単独曝露、又
29 は O₃ と H₂SO₄ 被覆炭素粒子状物質 (0.2 ppm O₃ + 50 µg/m³ 炭素粒子 + 100 µg/m³ H₂SO₄、
30 空気動学的中央粒子径 0.24µm 又は 0.4 ppm O₃ + 250 µg/m³ 炭素粒子 + 500 µg/m³ H₂SO₄、
31 空気動学的中央粒子径 0.26µm) を複合曝露させた。対照群は清浄空気に曝露させた。
32 いずれも 4 時間/日で 1、5 日間の鼻部吸入曝露とした。曝露第 1、5 日に曝露中の呼吸パ
33 ターンについて測定し、曝露終了後、肺組織、BALF を採取し、肺組織の病理組織学的解析、
34 BALF 中の肺胞マクロファージの Fc 受容体結合能解析を行った。高濃度の O₃ の単回曝露
35 により、一回換気量は低下し、肺の炎症反応は増加したが、反復曝露では対照群と差はみ
36 られず、影響が緩和された。しかし、酸性粒子共存下では 5 日間曝露による炎症反応は 1

1 日曝露よりも大きく、影響緩和の効果は観察されなくなった。肺胞マクロファージの Fc
2 受容体結合能は、濃度に関わらず 5 日間の O₃+ 酸性粒子複合曝露により、1 日曝露群、対
3 照群と比較し抑制された。以上 の結果より、O₃ と酸性粒子との複合曝露は、O₃ 単独曝露
4 において報告された反復曝露による適応機構を変化させる可能性がある」と結論する。

5
6 Elder *et al.* (2000b)は、微小粒子状物質と O₃ の複合曝露における、肺の酸化ストレス誘導
7 と加齢の関係を調べた。エンドトキシンを投与した FISHER344 ラット (雄、10 週齢(若齢)
8 または 22 ヶ月齢(高齢)、n=3/群)、肺気腫モデル (T_{SK}) マウス (雄、14-17 月齢 (高齢)、
9 n=6-7/群) に、1 ppm O₃ または 110 µg/m³ 微小炭素粒子を単独または複合で 6 時間曝露し、
10 曝露 24 時間後に肺洗浄液中の炎症細胞、生化学パラメータを評価した。いずれの動物種、
11 系統、年齢においても、肺胞への炎症細胞の流入増加が認められ、エンドトキシン投与後
12 の超微小炭素粒子と O₃ の複合曝露で、肺洗浄液中の好中球上昇が最も大きかった。炎症細
13 胞の流入、PMN の活性化いずれにおいても、概ね O₃ と超微小炭素粒子の交互作用が認め
14 られていた。しかし、若齢ラットでは、O₃ と超微小炭素粒子の複合曝露により ROS 活性
15 が低下、または増加が抑制された。これらの結果は、O₃ と超微小炭素粒子の複合曝露に
16 において、加齢により感受性が異なることを示唆している。

17
18 Ishii *et al.* (2000b)は、雄の Sprague-Dawley ラットに、0.4 ppm の O₃ 及び 7 ppm の NO₂
19 を複合曝露、あるいはろ過空気を曝露させた。曝露は 1、3、8、15、30、45、60、75、90
20 日間の連続的な吸入による。曝露終了後、BALF を採取し肺炎症マーカーを測定した。ま
21 た、肺組織を採取し、線維化バイオマーカーの測定、組織病理学的な肺炎症、線維化の観
22 察を行った。O₃ と NO₂ の複合曝露により、曝露開始 1~3 日後に肺炎症や浮腫が惹起され、
23 90 日後には肺の線維化が認められた。肺における MIP-2 の発現は曝露 1 日後に発現が増加
24 し、線維化関連サイトカインである TGF-β の発現は曝露 60、90 日後に上方制御された。

25
26 Madden *et al.* (2000)は、O₃ が粒子の持つ生物活性と反応し影響するのか検証するため、
27 DEP に O₃ を曝露すると共に、肺傷害のモデルラットに対する DEP の生物活性を調べた。
28 DEP 標準試料 2975 又は CB (カーボンブラック) 懸濁液にろ過空気又は 0.1、1.0 ppm の
29 O₃ を *in vitro* で 0.25~48 時間曝露し、60 日齢の雄の Sprague-Dawley ラットに生理食塩水又
30 はろ過空気又は O₃ を曝露した DEP あるいは CB を気管内投与した。24 時間後、血液、BALF
31 を採取し、PGE₂ 産生、BALF 中の多形核白血球数、タンパク質量、LDH を調べた。O₃ 曝
32 露した DEP は、O₃ 曝露しない DEP と比較し、好中球、総タンパク質及び LDH 活性を増
33 加させた。O₃ 曝露による DEP 活性の上昇は、空気による変質ではなかった。高濃度の O₃
34 (1ppm) への曝露により DEP の生物活性は低下した。これに対し、DEP に比べ有機物成
35 分の低い CB では、0.1 ppm の O₃ 曝露後に測定した、いかなる生物活性をも増加させな
36 かった。¹⁸O でラベルした O₃ を用いて調べると、DEP と取り込まれる O₃ の量とは、線形関

1 係にあった。以上 の結果は、大気濃度レベルの O₃ が DEP の生物学的効果を増強させるこ
2 とを示唆している。

3
4 Paige *et al.* (2000b)は、化学物質による肺急性毒性に対する O₃ 慢性曝露の効果を調べるた
5 め、Sprague-Dawley ラットに清浄空気又は 0.8 ppm の O₃ を 8 時間/日で 90 日間、全身吸入
6 曝露させ、曝露終了後、肺傷害を引き起こす 1-NN (1-Nitronaphthalene) を 50 又は 100 mg/kg
7 の用量で腹腔内投与し、24 時間後に肺組織を採取し、病理学的検索を行った (各群 8~21
8 匹)。O₃ 曝露後に 100 mg/kg の 1-NN を投与したラットは終末気管支における傷害が顕著で
9 あり、上皮細胞の壊死がみられた。一方で、肺内気管支や気管では O₃ 曝露による影響がみ
10 られなかった。

11
12 Weller *et al.* (2000)は、腫瘍壊死因子 α (TNF α) とマンガンスーパーオキシドジスムター
13 ゼ (MnSOD) は、肺の損傷、修復、および疾患の過程で重要な役割を果たすと考えられて
14 いることから、ラットに O₃ と二酸化窒素の混合気体を曝露することにより進行性肺線維症
15 モデルラットを作成し、TNF- α と MnSOD の誘導を経時的に調べた。10-12 週齢の雌の
16 Sprague-Dawley ラットに 0.8 ppm の O₃ と 14.4 ppm の二酸化窒素の混合気体を毎晩 6 時間、
17 1、5、8 週間吸入曝露させた。この酸化物質による傷害モデルは、1~3 週間目の初期炎症
18 段階、その後 4~5 週間目に部分的な修復段階、そして 6~8 週間目に急速な進行性線維性
19 病変形成の最終段階を伴う三相性反応を生じさせる。曝露後に免疫組織化学および形態計
20 測技術により、肺の近位および遠位肺胞管における TNF- α と MnSOD の発現を評価した。
21 8 週間の O₃ と二酸化窒素の混合曝露後に肺胞管の近位部と遠位部の間質細胞および肺胞マ
22 クロファージにおいて、MnSOD 発現の増強が認められた。1 週間と 8 週間の曝露後では、
23 肺胞管近位部の肺胞マクロファージにおいて TNF- α 発現が増強しており、近位部における
24 間質細胞の TNF- α は 1 週間から 8 週間すべての曝露時点で発現増強していた。以上 よ
25 り著者らは、TNF α の発現は、肺の顕著な細胞傷害において、時間的・空間的に強く相関
26 しており、その一方で、MnSOD は局所的な傷害領域のみならず、肺の遠位領域でも増強
27 していると報告した。

28
29 Kobzik *et al.* (2001)は、BALB/c マウス (OVA 誘発性喘息モデルマウスで 7 日齢及び 14
30 日齢に OVA 感作後、21 日齢より実験開始) に CAPs (粒径 0.15-2.5 μm) と O₃ を 5 時間/
31 日、3 日間連続の吸入曝露を行った。曝露濃度は、CAPs の高用量 (63.3~1,568.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、
32 低用量 (1.6~133.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、O₃ を 0.3 ppm とした。メサコリン誘導肺気流抵抗 (メサコリ
33 ン応答性 Penh)、肺胞洗浄液中の細胞、*in vitro* における肺胞マクロファージのサイトカイン
34 産生を CAPs 曝露直後、24 時間後、48 時間後に観察した。結果として、①CAPs 単独曝
35 露により、メサコリン誘導肺気流抵抗の濃度依存的な上昇が認められた (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ につき
36 0.86%上昇)。②300~500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の CAPs と O₃ の複合曝露により、メサコリン誘導肺気流

1 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
2 められなかった。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
3 含有率に相関してメサコリン刺激のないベースライン Penh の上昇が認められた。④CAPs
4 単独曝露と CAPs+O₃ の複合曝露群において 48 時間後の観察で、BALF 中の全細胞数及び
5 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
6 肺胞マクロファージによる TNF- α 及び MIF 産生量に対する CAPs の影響を *in vitro* で検討
7 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
8 において、比較的小さな気道反応性の亢進が短時間 (24 時間未満) の間みられることが示
9 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
10 と正相関することが示された。

11

12 Kleinman *et al.* (2000)は、O₃や大気中の粒子状物質成分として重要な ABS (硫酸水素ア
13 ンモニウム: ammonium bisulfate) や炭素粒子の高齢ラットへの影響を検討するため、22~
14 24 か月齢の FISHER344N-NIA ラットに 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の炭素粒子、70 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の ABS 粒子、0.2 ppm
15 の O₃ を単独曝露あるいは複合曝露させた。曝露群は対照群 (清浄空気曝露)、炭素粒子曝
16 露群 (空気動学的中央粒子径 0.3 μm)、ABS 群 (空気動学的中央粒子径 0.3 μm)、O₃
17 群、ABS + 炭素粒子群 (空気動学的中央粒子径 0.46 μm)、ABS + 炭素粒子 + O₃ 群 (空
18 気動学的中央粒子径 0.45 μm) とし、いずれも 4 時間/日、連続 3 日/週で 4 週間、鼻部吸
19 入曝露させた。曝露終了後、BALF 及び肺組織を採取した。BALF については細胞数の解
20 析、肺組織については病理組織学的解析、屠殺 4 時間前に投与した BrdU の上皮及び間質
21 細胞における取り込み、コラーゲン量、マクロファージ機能 (Fc 受容体結合能、スーパー
22 オキシド産生量、貪食能) の解析を行った。いずれの群においても、曝露によって上皮及
23 び間質細胞における BrdU 標識細胞の増加がみられた。吸入した粒子状物質によって最初
24 に影響を受けるのは上皮細胞である可能性が高いが、最大の反応がみられたのは間質細胞
25 だった。ABS + 炭素粒子 + O₃ 群では肺におけるコラーゲン消失、マクロファージのスー
26 パーオキシド産生、貪食能の増加が認められた。以上 の結果より、O₃ が吸入粒子の毒性
27 を増強する可能性が示され、大気中成分全体の影響評価が必要であることが示唆された。

28

29 Elder *et al.*(2000a)は、微小粒子状物質と O₃ の複合曝露における、肺酸化ストレス誘導と
30 加齢の関係を調べた。FISHER344 ラット (雄、10 週齢または 20 カ月、n=3/群) に LPS を
31 投与した後、炭素超微粒子 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ および O₃ 1 ppm を単独または組み合わせて 6 時間曝
32 露させた。曝露の 24 時間後に気管支粘膜洗浄液の炎症パラメータおよび BAL 細胞からの
33 活性酸素種放出を評価した。若齢ラットでは、O₃ の単独曝露および炭素粒子との複合曝露
34 により、BALF 中の総細胞、マクロファージ、PMN、リンパ球、タンパク質、LDH、
35 β -Glucuronidase が増加したが、老齢ラットでは、PMN とタンパク質の増加以外は認められ
36 なかった。また、若齢ラットでは LPS 感作後の O₃ および炭素曝露により活性化 PMA が増

1 加したが、O₃と炭素粒子の複合曝露では増加が抑制された。この抑制は、高齢ラットでは
2 認められなかった。これらの結果は、加齢により O₃単独曝露及び O₃と微粒子状物質の複
3 合曝露に対する感受性が変化することを示唆している。

4
5 Mautz *et al.* (2001)は、ラットに O₃、NO₂、ABS、炭素粒子、HNO₃の混合大気環境汚
6 染物質を4時間/日、3日/週、4週間曝露した。中濃度曝露群(O₃: 0.30 ppm、NO₂: 0.20 ppm、
7 ABS: 0.10 mg/m³、炭素粒子: 0.06 mg/m³、HNO₃: 0.050 mg/m³)と高濃度曝露群(O₃: 0.60
8 ppm、NO₂: 0.40 ppm、ABS: 0.20 mg/m³、炭素粒子: 0.12 mg/m³、HNO₃: 0.10 mg/m³)
9 では最初の4時間で呼吸数の増加と一回換気量の減少が観察された。長期曝露を行うこと
10 によって中濃度曝露群では、これらの呼吸反応は低減したが、高濃度曝露では呼吸反応の
11 増悪と肺損傷がみられた。高濃度曝露が気管支肺上皮の透過性を亢進し、呼吸パターンの
12 進行的な増悪と肺の組織傷害、鼻移行上皮及び終末気管支における高い細胞増殖指標と関
13 連していた。

14
15 Yu *et al.* (2002b)は、たばこ煙と O₃は健康被害が予想される代表的な汚染物質であること
16 から、O₃曝露による肺傷害へのたばこ煙の影響を検討するため、雄の B6C3F1 マウス (10
17 週齢)にろ過空気、又は 0.5 ppm の O₃及び粒子濃度 29.5 mg/m³の希釈副流煙 (ADSS : aged
18 and diluted sidestream cigarette smoke)を単独あるいは複合で計4日間吸入曝露させた。曝
19 露群の構成は、I. ろ過空気4日間曝露群、II. ろ過空気1日曝露後、希釈副流煙6時間/
20 日で3日間曝露の群、III. ろ過空気3日間曝露後、0.5 ppm の O₃24時間曝露の群、IV.希
21 釈副流煙6時間/日で3日間曝露後、0.5ppm の O₃24時間曝露の群とした。各群、5匹に
22 ついて、曝露開始1日前に BrdU を投与し、曝露終了の24時間後に屠殺して肺組織を採取
23 し細胞増殖を測定した。6匹について曝露終了2時間以内に屠殺して BALF を採取し、総
24 細胞数、タンパク量、細胞割合を観察した。また、BALF から採取した肺胞マクロファージ
25 を培養し、LPS 刺激による IL-6、TNF- α を測定した。BALF 中の総細胞数、タンパク質
26 量、白血球の割合、肺組織上皮細胞の細胞増殖は希釈副流煙曝露では大きな変化はなかつ
27 たが、O₃曝露により増加し、希釈副流煙と O₃の複合曝露で更に顕著に増加した。また、
28 複合曝露により、LPS 刺激による肺胞マクロファージからの IL-6、TNF- α の放出は減少し
29 た。以上の結果から、たばこ煙は O₃曝露による肺傷害を増悪することが示された。

30
31 Mautz (2003)は、運動中、又は安静中の雄の Sprague-Dawley ラットに 0.6 ppm の O₃、10
32 ppm の HCHO (ホルムアルデヒド)を単独、あるいは複合で3時間吸入曝露させた。これ
33 によってラットは対照群 (清浄空気曝露-安静)、O₃-R 群 (O₃曝露-安静)、O₃-E 群 (O₃曝
34 露-運動)、HCHO-R 群 (HCHO 曝露-安静)、HCHO-E 群 (HCHO 曝露-運動)、O₃+HCHO-R
35 群 (O₃+HCHO 曝露-安静)、O₃+HCHO-E 群 (O₃+HCHO 曝露-運動)に分けられた。曝露中、
36 呼吸機能を測定し、気道の組織病理学的観察については、曝露終了の48時間後に屠殺した

1 ラットから組織を採取して行った。運動を行った動物ではO₃とHCHOの複合曝露により、
2 気道の様々な部位での上皮傷害が顕著に認められた。

3
4 Thomson *et al.* (2004)は、都市汚染物質の吸入が血管作動性ペプチドであるエンドセリン
5 -1 及びエンドセリン-3 の循環レベルを上昇させることが報告されていることから、O₃吸入
6 曝露による肺におけるエンドセリン遺伝子の応答を調べた。ラット(Fischer-344、雄、齢数
7 不明、n=3~9)に0.8 ppm O₃ 及びPM粒子(EHC-93) 49 mg/m³ を鼻腔から4時間吸入曝露さ
8 せ、曝露から2時間後、1日後、2日後、3日後、7日後及び14日後に肺組織中のエンドセ
9 リン関連 mRNA を測定した。O₃ 及びEHC-93 を複合曝露させたラットでは、曝露2時間後
10 に肺内皮細胞においてエンドセリン前駆体であるプレプロエンドセリン-1 及びエンドセリ
11 ン変換酵素 mRNA の発現が誘導され、プレプロエンドセリン-3 mRNA の発現は抑制され
12 た。これらの変化は曝露24時間後時点では空気曝露群と同レベルまで戻った。これらの結
13 果は、O₃ 及びPM粒子の複合曝露が、肺における一時的なエンドセリン系遺伝子応答を
14 引き起こすこと示唆している。

15
16 Johnston *et al.* (2005a)は、肺の上皮の損傷や炎症細胞の活性化を刺激した後に別の刺激を
17 与えると、生後間もない肺において一度目の曝露後には見られない反応が起こるとする仮
18 説を検証した。生後4、10、56日のC57Bl/6マウスに推定沈着量26EUのリポポリサッカ
19 ライド(LPS)を10分間吸入させた後、2.5ppmのオゾンを4時間曝露した。または、2.5ppm
20 オゾンを4時間曝露した後、LPSを10分吸入させ、曝露後2時間経過した後に検査した。
21 LPSに続いてオゾンに曝露すると、4日齢のマウスに炎症反応が誘発されたが、LPSまた
22 はオゾン単独曝露では検出されなかった。また、10日齢と56日齢のマウスでは、相乗的
23 にインターロイキンIL-6 mRNA量が増加したが、4日齢のマウスでは増加しなかった。オ
24 ズンとLPSを同時に曝露すると、4日齢、10日齢、56日齢のマウスでIL-1 α とIL-1 β の反
25 応が抑制された。この抑制効果は1.0および0.5ppmオゾン曝露後にも観察された。これら
26 の結果は、主に炎症細胞の動員を活性化させるLPSへの前投与が、二次刺激に対する感作
27 を引き起こす可能性があることを示しているが、主に上皮を損傷するオゾンの事前曝露は
28 炎症性反応を抑制した。生後の肺の発達過程において、オゾンとLPSへの連続的な曝露は、
29 個々の曝露を評価しても予測できない反応をもたらすと結論づけられた。

30
31 Kleinman and Phalen (2006)は、酸性粒子とO₃が相乗的な相互作用を有するという仮説を
32 検証するため、酸性粒子とO₃の単独または混合での急性吸入曝露実験を行った。
33 Sprague-Dawleyラット(雄、6週齢、n=10)に、0.3または0.6ppmのO₃、0.5または1.0 mg/m³
34 の硫酸エアロゾル(MMD 0.3 μ m)を単独または複合で4時間経鼻吸入曝露させ、気道傷害及
35 び肺胞マクロファージ機能障害を評価した。O₃と硫酸の複合曝露は、O₃誘発性炎症反応の
36 硫酸濃度依存的な減少をもたらした。ろ過空気と比較して、O₃単独曝露により鼻腔、気管、

1 肺における DNA 合成の増加が認められたが、硫酸曝露では一貫した影響は認められな
2 かった。肺胞マクロファージのヒツジ赤血球に対する抗体指向 Fc 受容体 (FcR) 結合能には
3 変化は観察されなかったが、マクロファージの貪食活性は硫酸曝露によって減少した。こ
4 れらの結果は、複合曝露における O₃ と硫酸との間に相互作用が存在することを示してい
5 るが、O₃ および硫酸が相乗的に作用するか否かについては更なる研究が必要である。

6
7 Schmelzer *et al.* (2006)は、Sprague-Dawley ラット (雄、8~10 週齢、281~318 g、72 匹、
8 4 匹/群) に対し、1-nitronaphthalene (1-NN) を投与し O₃ を曝露する実験を行った。曝
9 露群の構成は、ろ過空気群/O₃ 曝露×1-NN 12.5/50 mg/kg 投与群/溶媒、腹腔内投与×1-NN
10 投与で各々2/6/24 時間後に屠殺した。0.8 ppm で8 時間/日、90 日、吸入による曝露を
11 行い、呼吸器への慢性影響を調べた。曝露終了の翌日 1-NN/溶媒を投与し、投与後 2 時間
12 /6 時間/24 時間に屠殺し、BALF 中のオキシピリン 35 種、サイトカイン・ケモカイン
13 19 種を測定して影響を評価した。O₃ 曝露群の BALF 中の PGE2 及び 12HETE は、ろ過空気
14 曝露群よりも高かった。O₃ 曝露群とろ過空気曝露群でサイトカイン産生には差はなかった。
15 オキシリピン代謝物中、12,13-DiHOME、5-HETE は 1-NN 投与後に一旦 (2 時間または 6
16 時間後) 濃度上昇した後、緩やかに濃度が低下した。一方、15-HETE、LTC4 は 1-NN 投与
17 量によらず上昇を続けた。PGD2 は、1-NN 高用量では濃度上昇後の低下がみられるが、低
18 用量では上昇し続けた。1-NN 投与量に対する濃度反応関係がほとんどのケースで認めら
19 れた。O₃ 曝露 + 1-NN 低用量投与群は cys-LT 濃度等、オキシピリン 13 種について、ろ過
20 空気曝露 + 1-NN 低用量投与群との差が認められた。空気曝露群では DiHOME 濃度は経時
21 的に低下したが、O₃ 曝露群では低下はみられなかった。O₃ 曝露群の 15-HETE、PGD2 は
22 1-NN 投与 2 時間後には空気曝露群よりも高濃度であったが、24 時間後には 15-HETE は低
23 く、PGD2 は差がなくなった。空気曝露+1-NN 低用量では TNF- α 、IL-1 α は投与 2 時間後
24 のみ、IL-6、IL-10 は 6、24 時間後に認められ、高用量では TNF- α 、IL-1 β 、CINC-2、GM-CSF、
25 MIP-3 α 、IL-6、レプチン、MCP-1、CNTF (毛様体神経栄養因子)、IFN- γ 、IL-10 が認めら
26 れた。O₃ 曝露+1-NN 低用量群ではサイトカイン 11 種について空気曝露群との差が認めら
27 れた。免疫刺激メディエーターである β -NGF、TNF- α 、IL-1 α 、CINC-3、IL-4、GM-CSF が
28 みられ、免疫制御サイトカイン・ケモカインはみられなかった。TH1 サイトカインである
29 IFN- γ は空気曝露+1-NN 高用量ではみられたが、O₃ 曝露+1-NN ではみられなかった(1-NN
30 投与 2 時間後)。

31
32 Han *et al.* (2008)は、8 週齢の雌の C57B1 マウスに PBS 又は 20 μ g のカーボンナノチュ
33 ーブを経咽頭吸引させ、12 時間後、ろ過空気又は 0.5 ppm の O₃ を 3 時間、鼻部吸入曝露さ
34 せた。曝露の 5、24 時間後に BALF 及び肺組織を採取し、BALF 中の細胞分画算定、総タ
35 ンパク質、LDH、TNF- α 、IL-1 β 、SP-D (サーファクタントタンパク質 D: surfactant protein-D)、
36 ムチンの濃度測定、肺組織中の SOD、酸化ストレスマーカーとして血清中の 8-イソプロス

1 タン、血清、BALF、肺組織中の TBARs (チオバルビツール酸反応物質: thiobarbituric acid
2 reactive substances) の測定を行った。その結果、カーボンナノチューブ曝露群において、
3 BALF 中の炎症性細胞の増大、及び炎症マーカーの発現増加が認められたが、O₃ 単独の曝
4 露では極くわずかな変化しか認められなかった。カーボンナノチューブと O₃ に曝露したマ
5 ウスでは、対照群と比較し炎症性マーカー等の発現は増大したが、相加、相乗作用は認め
6 られなかった。カーボンナノチューブによる細胞毒性/炎症反応は低濃度 O₃ 曝露により減
7 弱された。以上 の結果は複数汚染物質への連続的曝露による「交叉耐性」の発達を表して
8 いる可能性がある。

9
10 Lee *et al.* (2008)は、68~71 日齢の雄の Sprague-Dawley ラット 57 匹にろ過空気又は 0.8 ppm
11 の O₃ を 8 時間/日で 90 日間、全身吸入曝露させた。曝露終了の翌日、0、12.5、50 mg/kg の
12 1-NN(1-Nitronaphthalene)を腹腔内投与し、6、24 時間後に鼻部組織を採取した (各群 3~5
13 匹)。前鼻部と後鼻部に分け、上皮の厚さ、空胞の有無、炎症性細胞数等について組織学的
14 評価を行った。前鼻部では 1-NN 投与によって、鼻部移行上皮に激しい炎症、傷害が生じ、
15 細胞内あるいは細胞間に空胞が生じていた。O₃ 単独曝露では杯細胞の異形成が観察された。
16 O₃ の長期曝露後に 1-NN を投与すると、1-NN 単独曝露でみられた炎症や傷害が軽減され
17 た。後鼻部では、O₃ 曝露による組織学的な変化は認められなかったが、1-NN 単独あるい
18 は O₃ と 1-NN の曝露により、粘膜や上皮の細胞に傷害が認められた。また、ろ過空気又は
19 O₃ に曝露後、¹⁴C 標識の 1-NN を 50 mg/kg 投与し、投与 2 時間後に上顎甲介の移行上皮、
20 嗅覚系中隔上皮、非嗅覚系中隔上皮を採取し、1-NN の代謝物に結合するタンパク質の量・
21 種類を調べた結果、O₃ の曝露により結合タンパク質の量・種類に変化がみられることが示
22 された。

23
24 Farraj *et al.* (2010)は、O₃、DEP (diesel exhaust particle) の曝露がアレルギー性の気道疾患
25 に及ぼす影響について検討するため、OVA で感作した 6 週齢の雄の BALB/c マウス及び溶
26 媒のみ投与の対照マウスにろ過空気又は 0.5 ppm の O₃、2.0 mg/m³ の DEP を単独あるいは
27 複合で感作 3 日後から 5 時間/回、1 回/週で 4 週間、鼻部吸入曝露させた (各群 10 匹)。気
28 道のアレルギー反応を起こさせるため、OVA 感作の 2、4 週間後に OVA エアロゾル、対照
29 マウスには生理食塩水エアロゾルを吸入させ、感作の 29 日後、気道反応性を測定し、その
30 後、血液、BALF、肺・鼻腔の組織を採取し、BALF 中の細胞数、傷害・炎症指標、サイト
31 カイン類、血清中 NGF (神経成長因子)、OVA 特異的 IgE の計測、組織の光学顕微鏡によ
32 る観察を行った。ろ過空気を曝露させた OVA 感作マウスはメサコリンに対する肺抵抗・
33 エラスタンス、肺の炎症細胞浸潤、肺の傷害指標のうち LDH、アルブミン、総タンパク質、
34 サイトカインの IL-4、IL-5、MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)、血清中 OVA 特異的
35 IgE、NGF が対照マウスと比較し増加した。OVA 感作マウスでは、OVA が誘導した炎症細
36 胞の浸潤が O₃ 曝露によって亢進し、NAG (*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase)、MCP-1 が増加

1 したが、肺抵抗・エラスタンスには影響がなく、また、DEP 曝露は OVA 誘導の反応に影
2 響しなかった。OVA 感作マウスにおける O₃、DEP の複合曝露は、対照マウスへのろ過空
3 気曝露と比較し、肺エラスタンスへの影響はなかったが、肺抵抗を増加させ、感作マウス
4 への O₃ 曝露による MCP-1 増加は抑制された。感作マウスにおける血清中 IgE は O₃ 曝露及
5 び O₃、DEP の複合曝露により、DEP 曝露と比較して増加した。以上 の結果から、O₃ と
6 DEP の複合曝露は気道過敏性を増悪するが、肺の炎症反応については DEP が O₃ による増
7 悪を抑制することから、固有の機構を考える必要性が示唆された。

8
9 Han *et al.* (2011)は、妊娠 SD ラットの子ども（胎仔期および出生仔ラット）に対し、O₃
10 およびタバコ煙を曝露する実験を行った。妊娠雌ラットおよび雄性・雌性出生仔（胎仔期
11 ~13 日齢）を用いた。曝露群の構成は、Air/Air（胎仔期：空気、生後：空気）、Air/O₃（胎
12 仔期：空気、生後：O₃）、TS/Air（胎仔期：タバコ煙、生後：空気）、TS/O₃（胎仔期：タバ
13 コ煙、生後：O₃）である。O₃ は 0.61 ± 0.01 ppm で単回吸入曝露を行った。3 時間、吸入に
14 による曝露を行い、タバコ煙については 112 ± 18 mg/m³ で 3 時間/日、胎仔期 15 日間連続、
15 吸入による曝露を行って呼吸器への急性影響を調べた。曝露終了後 10 時間の BALF 中の
16 総タンパク量、多形核白血球（PMN）、組織中ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性、肺
17 ホモジネート中の細胞外スーパーオキシドジスムターゼ（EC-SOD）・Mn-SOD・Cu/Zn-SOD
18 を観察し、影響を評価した。BALF 中の PMN 数と総タンパク量から O₃ による炎症と細胞
19 毒性が確認された。子宮内 TS 曝露は TS/O₃ 曝露群の BAL 回復に関わる PMN の湿潤を弱
20 めた。TS/O₃ でのみ MPO 活性が著しく上昇していたことから、TS は PMN を肺組織中に
21 捕捉させ、O₃ 誘導性 PMN 流入を阻害するということが考えられた。Air/O₃ 組織中の
22 Mn-SOD、EC-SOD 量の変化から O₃ による酸化ストレスの影響がみられた。しかし TS/O₃
23 ではこの影響は抑制されていた。これらの結果は TS と O₃ の連続曝露実験で予測していた
24 毒性反応の相互作用とは正反対の結果であるが、交差耐性を示したものと考えられた。

25
26 Lee *et al.* (2011)は、この研究で、若年期のラットにオゾンおよび有機画分を多く含む超微
27 細粒子を亜慢性曝露し、長い回復期の後に、成体ラット時の気道構造の変化を調べた。新
28 生児期のオスの Sprague-Dawley ラットは、生後 7 日から 25 日までの肺の発達期間中に、
29 0.5 ppm のオゾンの 3 サイクルに曝露された。週 5 日曝露（Ozone52）または週 2 日曝露
30 （Ozone25）の 2 つの異なる曝露パターンが用いられ、超微細粒子への同時曝露（OPFP5252、
31 OPFP5225）も行われた。気道構造は、ろ過空気（FA）曝露期間を超えて 56 日間飼育した
32 後、81 日齢で評価された。肺気道キャストからの CT 画像を分析することにより、ほとん
33 どの誘導気道について気道直径、長さ、分岐角度、回転角度を決定した。FA 対照群と比較
34 して、Ozone52 群は右横隔膜葉において特に 10 を超える世代で気道直径の減少を、遠位世
35 代で気道長の減少を示したが、Ozone25 曝露による気道構造の明らかな変化は認められな
36 かった。オゾンと超微粒子曝露の相互作用の影響はみられなかった。これらの結果は、出

1 生後のオゾン曝露による気道の変化が遠位領域に限定されず、中部から遠位の誘導気道に
2 広範囲に発生することを示唆している。さらに、初期のオゾン曝露による変化は、曝露後
3 2 か月近く回復せず、若年期におけるオゾン曝露後の持続的な気道の構造変化を示してい
4 る。

5
6 North *et al.* (2011)は、BALB/c マウス (雌、6~8 週齢、n=4~12) に対し、CAP および
7 O₃を曝露する実験を行った。CAP は大気中の微粒子をそのまま凝縮したものを使用し、粒
8 径は 0.1~2.5 μm であった。曝露群の構成は、亜急性オボアルブミン (OVA) 感作・チャ
9 レンジモデル (16 日間)、慢性 OVA 感作・チャレンジモデル (12 週間) とした。どちら
10 のモデルも第 0 日目、7 日目に OVA 感作を行った。その後亜急性モデルは第 14~16 日
11 目に OVA チャレンジを行い、慢性モデルは 2 日間チャレンジ、12 日間チャレンジなしの 2
12 週間のサイクルを 12 週間繰り返した。最後のチャレンジの 24 時間後、CAP+O₃または清
13 浄空気に 4 時間、吸入による曝露を行った。曝露濃度は CAP: >175 μg/m³、O₃: 2 ppm とし
14 た。曝露終了直後の肺ホモジネート中のアルギナーゼ活性及びアルギナーゼ 1 と 2 の発現
15 量、気管支肺洗浄液 (BALF) 中の細胞パラメーターおよびマクロファージでのアルギナ
16 ーゼ 1 の発現、肺区画内の気道でのアルギナーゼ 1 発現、メサコリン反応性、BEC (アル
17 ギナーゼ阻害剤) 添加条件下での最大総呼吸抵抗 (RMAX) への影響、気道抵抗 (RN MAX)、
18 周辺組織の障害 (GMAX)、BALF 中の 8-イソプロスタニン量を観察し、影響を評価した。マ
19 ウスぜん息モデルでは、環境汚染物質曝露によりアルギナーゼ発現がアップレギュレート
20 されて気道の反応性悪化をもたらすことがわかった。アルギナーゼは微粒子や O₃ といった
21 汚染物質の悪影響を受けやすい人々を治療するための標的となるだろう。

22
23 Ye *et al.* (2017) は、大気汚染物質による健康影響を調査するためにマウスを用いた粒子
24 状およびガス状汚染物質の長期吸入曝露試験において、吸入曝露条件を制御できる大気シ
25 ミュレーション反応装置 (ASR) を開発し、雌の BALB/c マウス (8~10 週齢) に 10~150
26 μg/m³ の二次有機エアロゾル (SOA、一般的な粒子状大気汚染物質)、SOA (30 μg/m³)+O₃ (65
27 ppb)、または SOA+O₃ (65 ppb) +二酸化窒素 (NO₂; 100 ppb) を 1 日 1 時間連続 3 日間、吸
28 入曝露させた。SOA のみ吸入曝露させたマウスでは、SOA 濃度の増加に伴い、メサコリン
29 に対する気道過敏性 (AHR) が増加したのに対し、SOA+O₃、または SOA+O₃+NO₂を吸入
30 曝露させたマウスでは、メサコリンに対する AHR への相加影響が生じた。気道への炎症
31 性細胞の集簇は、いずれの曝露条件でも観察されなかった。以上 の結果から著者らは、こ
32 の研究で開発された ASR により、制御された条件下における vivo での複数の汚染物質に
33 対する曝露の慢性的な健康影響を評価し、反復曝露研究を行うことが可能となるとした。

34 35 1.2. 循環器系への影響に関する知見

36 Iwasaki *et al.* (1998)は、ラットに 0.1、0.3、0.5 ppm の O₃ を 8 時間/日 (午前 10 時~午後

6時)で連続4日間吸入曝露させ、曝露中の体温、心拍数を観察した。曝露1日目と2日目には曝露量に依存して体温と心拍数の低下が認められ、それらの日内変動に影響を及ぼした。3日目以降は曝露に順応することにより、対照群と同程度以上に回復した。

Watkinson *et al.* (2001)は、大気汚染物質が心臓及び体温調節機能に与える影響について調べるため、ラットを用いた吸入曝露実験を行った。室温 22°Cまたは 10°C条件下で雄の Fischer-344 ラットおよび C3H/HeJ マウスに O₃ を吸入曝露させ、心拍数と深部体温の変化を測定した。Fischer-344 ラット (雄、n=4-6) に 0.5 ppm O₃ を 6 時間/日または 23 時間/日で 5 日間曝露させたところ、室温 22°C 条件下では 23 時間/日曝露の 1 日目でのみ心拍数および深部体温が低下した。室温 10°C 条件下では、6 時間/日曝露または 23 時間/日曝露いずれにおいても、1 日目と 2 日目に心拍数と深部体温が低下したが、低下の度合いは 23 時間/日曝露でより大きかった。また、マウス (C3H/HeJ、雄、n=8) に室温 22°C 条件下で 2.0 ppm O₃ を 2 時間曝露させたところ、O₃ 曝露群において空気曝露群と比較して深部体温の低下が認められた。以上の結果から、O₃ 曝露は心拍数と深部体温の低下を引き起こし、その度合は周囲の温度により影響を受けることが示唆された。

Ulrich *et al.* (2002)は、大気中粒子状物質による心血管事象発生における影響を評価するため、心血管疾患、肺疾患に関与する様々な遺伝子の発現を評価した。Wistar ラット (雄、200-250 g、n=5/群) に 1600 µg/m³ の O₃ を 8 時間曝露させて肺炎症を誘発した後、カナダのオタワで採取した PM(EHC-93) 0.5、1.5、5 mg/m³ を気管内投与し、2、4、7 日後に各種遺伝子の mRNA レベル及びその発現産物を測定した。ラットへの PM 曝露 2 日後に、5mg/m³ の PM 投与群では、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の腫瘍壊死因子 (TNF) -α レベルが対照群と比較して約 4 倍に上昇した。IL-6 レベルは影響を受けなかったが、BALF 中の MIP-2 タンパク質レベルは全研究期間中、約 3 倍に上昇した。また、MIP-2 mRNA レベルも同様の誘導パターンを示した。血漿中のエンドセリン (ET) -1 レベルについては、PM 曝露 2 日後に 2 倍に上昇し、7 日後のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 活性は 20% 低下した。O₃ 曝露後の PM 曝露では肺血管における ACE および ET-1 mRNA レベルは 60% 減少したが、O₃ 単独では変化は認められなかった。誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) mRNA が PM 投与 2 日後に 3.5 倍に増加することが見出されたことから、内皮傷害は多量のフリーラジカル NO によって引き起こされた可能性が考えられた。また、血漿中のフィブリノゲンレベルが上昇したことから、それによって血液粘度が上昇し、組織血流が低下したことが考えられた。これらの結果は、大気汚染曝露が高リスク集団での心不全を増加させるとする仮説を裏付けるものである。また、大気汚染物質曝露の影響のうち、内皮損傷については、フリーラジカルを介して引き起こされることを示唆している。

Watkinson *et al.* (2003)は、O₃ 曝露による影響の温度依存性を調べるため、室温を 10°C、

(案)

1 22°C、34°Cのいずれかに保ち、100~120 日齢の雄の Fischer344 ラットにろ過空気を 24 時
2 間/日、又は 0.5 ppm の O₃ を 6 時間/日あるいは 23 時間/日で 5 日間全身吸入曝露させた。
3 室温において、O₃ への断続的および継続的な曝露により、心拍数が急激に低下した。深部
4 体温は継続曝露によって 2°C 近く低下し、3 回目の曝露まで完全に回復しなかった。10°C
5 の環境においては O₃ の影響がより強く、34°C では O₃ の影響がより弱かった。また、O₃ 曝
6 露による影響の運動の程度による相違を調べるため、100~115 日齢の雄の Fischer344 ラッ
7 トにろ過空気又は 0.5 ppm の O₃ を 5 日間連続で全身吸入曝露させ、曝露中、休息、軽い運
8 動、激しい運動、CO₂ 負荷（空気中の CO₂ = 8 %）のいずれかの負荷を与えた。運動中の
9 ラットへの曝露では、O₃ によって心拍数が 11 bpm、深部体温が 1°C 下がった。

10
11 Thomson *et al.* (2005) は、雄の Fisher344 ラットに清浄空気、0.4、0.8 ppm の O₃、5、50 mg/m³
12 の都市大気粒子 EHC-93 のいずれかを単独で、あるいは 0.8 ppm の O₃ と 50 mg/m³ の EHC-93
13 を複合で 4 時間、鼻部吸入曝露させた。曝露直後及び 24 時間後に血液、BALF、肺を採取
14 し、リアルタイム RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応: reverse transcriptase / polymerase
15 chain reaction）により肺におけるプレプロエンドセリン-1、ECE-1、ET-A 受容体、ET-B 受
16 容体、eNOS（内皮型一酸化窒素合成酵素: endothelial nitric oxide synthase）の mRNA 発現
17 量、高速液体クロマトグラフィにより血漿中の ET 濃度、ゼラチンザイモグラフィにより
18 BALF 中の MMP-2 濃度を測定した。O₃、EHC-93 の単独曝露の直後において肺のプレプ
19 ロエンドセリン-1、ECE-1、eNOS の mRNA 量が増加し、血中 ET-1 量も増加した。EHC-93
20 曝露群では 24 時間後もプレプロエンドセリン-1 mRNA 量は高かったが、O₃ 曝露群では低
21 下した。また、O₃、EHC-93 は ET-B 受容体 mRNA 量を増加させたが、ET-A 受容体 mRNA
22 量は O₃ 曝露により減少した。O₃、EHC93 の複合曝露群では肺のプレプロエンドセリン-1
23 mRNA 量は増加したが、血中 ET-1 量には変化はなく、肺の MMP-2 量は増加した。以上 の
24 結果より、O₃ と粒子状物質は独立に肺の ET 合成システムを制御していることが示唆され
25 た。なお、EHC-93 の LOAEL は肺胞表面積あたり 2.5 ng/cm²、O₃ の LOAEL は 214 ng/cm²
26 と推定された。

27
28 Thomson *et al.* (2006) は、雄の Fisher344 ラットに清浄空気又は 0.8 ppm の O₃、50 mg/m³
29 の都市大気粒子 EHC-93 を単独あるいは複合で 4 時間、鼻部吸入曝露させた。曝露直後及
30 び 24 時間後に血液、BALF、肺を採取し、リアルタイム RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連
31 鎖反応: reverse transcriptase/polymerase chain reaction）により肺におけるプレプロエンドセリ
32 ン mRNA 発現量、高速液体クロマトグラフィにより血漿中の ET 濃度を測定した。O₃、
33 EHC-93 曝露直後において、血中 ET-1、ET-3 とも濃度が上昇したが、ET-2 には影響がなく、
34 肺のプレプロエンドセリン-1 の mRNA 発現量は上昇したが、プレプロエンドセリン-3 は
35 減少し、プレプロエンドセリン-2 は検出されなかった。O₃ と EHC-93 の複合曝露では、肺
36 におけるプレプロエンドセリン mRNA 発現については O₃ 単独曝露と同様の影響がみられ

(案)

1 たが、血中 ET-1、ET-3 には変化がみられなかった。以上 の結果から、肺における新規の
2 ET-3 合成は、O₃ や EHC-93 吸入後の血中 ET-3 増加には関与しておらず、これはプレプロ
3 エンドセリン-3 の制御が遠隔部位で行われ、O₃ や EHC-93 の影響が全身的なものであること
4 を暗示している。

5
6 Chuang *et al.* (2009)は、6 週齢の雄の C57Bl/6 マウス (20 匹) にろ過空気又は 0.5 ppm の
7 O₃ を 8 時間/日で 1 日間又は 5 日間、全身吸入曝露させた。霊長類として 180 日齢の雄のア
8 カゲサル (7 匹) には 8 時間/日で 5 日間、ろ過空気又は 0.5 ppm の O₃ を曝露した。さら
9 に、高コレステロール血症、動脈硬化症モデルとして 6 週齢の雄の ApoE^{-/-}マウス (20 匹)
10 には、8 時間/日、5 日/週で 8 週間、ろ過空気又は 0.5 ppm の O₃ を曝露した。C57Bl/6 マウ
11 スについて、曝露の 1~2 時間後に心拍数、血圧を測定し、取り出した血管への薬物投与に
12 よる血管緊張・弛緩反応、血管組織内の NO_x 量、8-イソプロスタノール (酸化ストレス指標)、
13 SOD 活性、SOD2 及び eNOS (内皮型一酸化窒素合成酵素) を調べた。C57Bl/6 マウスの
14 肺、血管組織、アカゲサルの血管組織についてミトコンドリア DNA 傷害を調べ、ApoE^{-/-}
15 マウスについてアテローム性動脈硬化症病変を調べた。C57Bl/6 マウスへの O₃ 曝露により、
16 心拍数と血圧の上昇、Ach に対する血管収縮の減弱、血管組織内の NO_x、eNOS の減少が
17 認められた。また、肺、血管組織における酸化ストレスの上昇、血管組織における SOD2
18 活性、SOD2 タンパク質量の低下が認められた。O₃ 曝露によるミトコンドリア DNA 傷害
19 は、C57Bl/6 マウスの肺、血管組織、アカゲサルの血管組織で認められた。ApoE^{-/-}マウス
20 への O₃ 曝露により、アテローム性動脈硬化病変の増加が認められた。これらの結果から著
21 者らは、オ損が血管の mtDNA 損傷を増加させ、血管機能障害、酸化ストレス、ミトコン
22 ドリア損傷、アテローム形成の増加を促進することを示しているとした。

23
24 Hamade and Tankersley (2009)は、O₃ 及び粒子状物質への適応はマウスの系統によって異
25 なり、O₃ への心肺順応は心臓系と呼吸器系との同期的反応であるとの仮説をたて、その検
26 証のため、C57Bl/6J マウス、C3H/HeJ マウス及び C3H/HeO_uJ マウスに対し、1) 午前中 576
27 ppb の O₃ を 2 時間吸入曝露させ、午後に 556 µg/m³ のカーボンブラックを 3 時間吸入曝露
28 させる群 (O₃+CB 群)、2) 午前中にろ過空気を 2 時間吸入曝露させ、午後に 556 µg/m³ の
29 カーボンブラックを 3 時間吸入曝露させる群 (FA+CB 群)、3) ろ過空気のみ曝露 (FA+FA
30 群) のいずれかの手続きを 3 日間連続で反復した。毎日、朝に心拍数、心拍変動、体温、
31 酸素消費量を測定し、午後のカーボンブラック又はろ過空気曝露前、曝露中、曝露後に、
32 心拍数、心拍変動、体温、気道反応を測定した。いずれの系統のマウスにおいても、O₃+CB
33 曝露により、心拍数が減少し、SDNN および rMSSD が低下したが、Interim RR については、
34 C3H/HeJ と C3H/HeO_uJ でのみ増加が見られた。CB 単独曝露ではこれらの影響は見られな
35 かった。O₃+CB への 3 日間の反復曝露への順応については、C57Bl/6J が最も早く、
36 C3H/HeO_uJ が最も遅かった。心拍数および心拍変動への影響と、呼吸数および換気量への

1 影響には相関がみられ、その関連には系統差があった。これらの結果は、共汚染物質の反
2 復曝露への反応及び順応を遺伝的要因が決定していることを示唆している。O₃+CB 群への曝
3 露の期間中、曝露に対する心臓系と呼吸器系の順応は非常によく同期しており、粒子状物
4 質による心臓機能への悪影響の機構を説明できる可能性がある。

5
6 Hamade *et al.* (2010)は、TLR4 の機能が異なる 3 系統の若齢 (5 か月齢) および老齢 (12
7 か月齢) の雄の C57BL/6J マウス (B6)、C3H/HeJ マウス (HeJ)、C3H/HeO_uJ マウス (OuJ)
8 に対し、O₃ およびカーボンブラック (CB) を曝露する実験を行った。匹数は (B6) 5 か月
9 齢: n = 8、12 か月齢: n = 7、(HeJ) 5 か月齢: n = 5、12 か月齢: n = 6、(OuJ) 5 か月齢: n = 6、
10 12 か月齢: n = 7 であった。用いた CB の粒径は、CMD が 0.7 μm、MMAD が 1.01 または
11 1.12 μm で、Regal 660; 密度 1.95 g/cm³、表面積 112 m²/g、実験式 C₉₁₀H₃₄O₁₀、組成は炭素
12 96.90%、酸素 1.42%、水素 0.30%である(Hamade *et al.* (2008)*et al.*)。曝露群の構成は、(1)
13 FAFA: 清浄空気 (FA) 2 時間 + FA 3 時間、(2) FACB: FA 2 時間 + CB 3 時間、(3) O₃CB:
14 O₃ 2 時間 + CB 3 時間 であり、曝露を 3 日間連続で行い循環器への急性影響を調べた。
15 曝露濃度は、O₃: 600 ppb、CB: 550 μg/m³ とした。曝露前、曝露中、2 回目曝露終了後の 3
16 日間のデータを観察し、心拍数、心拍変動 (SDNN、rMSSD、LF/HF)、換気回数 (F)、深
17 部体温 (T_{co})、F-HRV 相関性、一回換気量 (VT) -HRV 相関性から O₃ および CB 曝露に対
18 する生理学的変化を経時的に測定した。若齢マウスでは O₃+CB 曝露による HR 減少が顕著
19 であったが、B6 と HeJ では適応が早いのにに対して OuJ では遅かった。O₃+CB 曝露による
20 顕著な HRV 増加も HeJ および OuJ では適応がみられたが B6 マウスではみられなかった。
21 老齢マウスの反応は若齢マウスよりも弱かった。また心臓と呼吸の相互作用は年齢や曝露
22 パターンにより違いはあったが CB および O₃+CB 曝露の影響を受けていた。O₃ および
23 O₃+CB 曝露に対する反応は加齢により弱くなり、加齢による酸化ストレスの増加などの生
24 理学的変化によるものではないかと考えられた。

25
26 Perepu *et al.* (2010)は、SD ラット (性別記載なし、齢数記載なし、50~75 g、n=6) に対
27 し、O₃ を曝露し循環器への亜急性影響を調べる実験を行った。曝露群の構成は、対照群 1:
28 filtered air 28 日間曝露、対照群 2: filtered air 56 日間曝露、実験群 1: O₃ 28 日間曝露、実験
29 群 2: O₃ 56 日間曝露 である。曝露濃度 0.8 ppm で 1 日あたり 8 時間、吸入による曝露を行
30 った。曝露後 24 時間に、心筋虚血灌流後の血流変化、心筋 SOD・MDA レベル、抗炎症お
31 よび炎症性タンパク質レベルを観察し、影響を評価した。O₃ 曝露群の LVDP、+dP/d、-dP/dt
32 値、LVEDP は虚血灌流後にそれぞれ対照群よりも著しく減少・増加した。虚血灌流で受け
33 いた心筋傷害への感受性が O₃ 曝露で亢進するという現象は、TNF-α レベルの上昇と脂質過酸
34 化量の増加、心筋 SOD の活性低下および IL-10 レベルの低下と関係があった。O₃ によって
35 酸化ストレスが増幅され、炎症メディエーターが増加することで、虚血灌流で生じた心筋
36 傷害への感受性が高まるものと考えられた。

1
2 Tankersley *et al.* (2010)はマウスに対し O₃、カーボンブラック (CB) を曝露し循環器への
3 急性影響を調べる実験を行った。C57BL/6 (以下、B6) マウス (Nppa 遺伝子変異ヘテロ接
4 合体、Nppa: ANP 心房性ナトリウム利尿ペプチド-precursor gene) および 129S1/SvImj (以
5 下 129) マウス (Npr1 遺伝子変異ヘテロ接合体、Npr1: ANP-receptor gene) を購入し、同系
6 交配によって Nppa 遺伝子変異または Npr1 遺伝子変異のホモ接合体(ノックアウトマウス)
7 を得た。実験に用いたマウスの遺伝子型は、野生型 B6、野生型 129、Nppa 遺伝子変異ヘ
8 テロ接合体 B6、Npr1 遺伝子変異ヘテロ接合体 129、Nppa ノックアウト B6 (Nppa KO)、
9 Npr1 ノックアウト 129 (Npr1 KO) である。齢数は 4~5 か月齢 (以下 5mo) または 17~19
10 か月齢 (以下 18mo)、27 か月齢 (以下 27mo) のものを用いた。匹数は [B6 マウス] 5mo:
11 n = 10、18mo: n = 15、[129 マウス] 5mo: n = 10、18mo: n = 12、[老化による影響を見る実
12 験] 27mo (B6 マウスおよび 129 マウス) : n = 12、[心筋の PM への反応 (5mo)] Nppa KO:
13 n = 4、Npr1 KO: n = 8 で、計 47 匹である。曝露群の構成は、(1) O₃: 2 時間 O₃+3 時間清
14 浄空気 (FA)、(2) CB: 2 時間 FA+3 時間 CB、(3) FA: 2 時間 FA+3 時間 FA、(4) O₃CB:
15 2 時間 O₃+3 時間 CB とした。曝露濃度は O₃: 576±32 ppb、CB: 556±34 µg/m³ で、5 時間 (9:
16 15~11: 15 と 13: 00~16: 00) /日、2 日連続/週、4 週、吸入による曝露を行い、週ごと
17 に異なるものを曝露した。曝露終了後の体重変化、HR (心拍)、LVESD (左心室収縮末期
18 径)、LVEDD (左心室拡張末期径)、PWTES (収縮末期後壁厚)、PWTED (拡張末期後壁
19 厚)、FS (左室内径短縮率)、RWT (相対壁厚)、血流変化 (曝露後 6~12 時間) を観察し、
20 影響を評価した。心電図は各曝露の 2 日前の測定値をベースラインとして変化を見た。エ
21 コー検査で、129 マウスの後壁厚のベースラインは B6 マウスよりも厚いことが分かった。
22 CB 曝露後、5mo B6 マウスと 18mo 129 マウスの FS は著しく減少していた。O₃ 曝露後では、
23 5mo 129 マウスの FS が減少し、LVESD が増加していた。O₃ と CB 両方に曝露した後では、
24 5mo 129 マウスの HR と PWTES が減少し、IVH measurement から心機能の低下が認められ
25 たが、系統による違いはみられなかった。PM と O₃ への曝露は単独でも混合した状態でも、
26 年齢特異的で、Nppa および Npr1 遺伝子依存的な心機能の変化を引き起こした。

27
28 Kodavanti *et al.* (2011)は、WKY ラット (雄、10~12 週齢、n = 20) に対し、O₃ および DEP
29 を吸入曝露し、呼吸器および循環器への急性/亜急性影響を調べる実験を行った。DEP は
30 Deutz エンジン排気を string generator system でエアロゾル化したものを用いた。曝露群の構
31 成は、(1) Air、(2) DEP、(3) O₃、(4) DEP+O₃ である。急性モデルでは O₃ の濃度
32 を 0.5 ppm または 1.0 ppm、DEF の濃度を 2.0 mg/m³ として 5 時間/日、2 日連続曝露した。
33 亜急性モデルでは、O₃ の濃度を 0.5 ppm、DEP の濃度を 2.0 mg/m³ として 5 時間/日、1 日
34 /週、16 週間曝露した。急性モデルは曝露終了から 1 日後、亜急性モデルでは曝露終了か
35 ら 2 日後に体重、呼吸パターン、肺および全身性マーカー、肺/心臓/動脈の組織変化と
36 mRNA 発現、心筋ミトコンドリアのリン脂質脂肪酸の減少を観察し、影響を評価した。O₃

1 または DEP 曝露によって酸化ストレス・プロテアーゼ/アンチプロテアーゼのバランス・
2 微小血管血栓症・動脈血管狭窄のバイオマーカー mRNA がアップレギュレートされたが、
3 DEP+O₃ 曝露群ではあまり影響がみられなかった。心臓にもこれらの影響はみられなかつ
4 たが、酸化ストレスによると考えられる心筋ミトコンドリアのリン脂質脂肪酸は O₃ または
5 DEP 単独曝露によって減少していた。血管病因バイオマーカーおよび LOX-1 と RAGE の
6 増加は、循環している脂肪とタンパク質の副産物が酸化反応を起こすことに起因している
7 ものと考えられた。

8
9 Farraj *et al.* (2012)は、環境中の O₃ 濃度と心血管疾患および死亡率との間に正の相関関係
10 が見られるなど肺以外への影響を指摘する疫学的証拠が増えていることから、ラットにお
11 いて O₃ への単回吸入曝露が濃度依存的な心機能の自律的調節を引き起こすという仮説に
12 ついて検討した。12 週齢の雄の自然発症高血圧 (SH) ラットに心拍数と心電図をモニタ
13 ーするためのテレメーターを埋め込み、ろ過空気または 0.2、0.8 ppm O₃ を 4 時間全身吸入
14 曝露した。別の群では、曝露 24 時間後にアコニチンによる不整脈に対する脆弱性を調べた。
15 0.8 ppm O₃ への曝露は、徐脈、PR 延長、ST 低下、および心房性早発、中房ブロック、房
16 室ブロックの大幅な増加を引き起こした。同時に副交感神経緊張の増加を示唆するいくつ
17 かの HR 変動パラメータが増加した。低濃度 O₃ 曝露では、自律神経系の緊張、心調律、
18 または心電図に明らかな変化は見られなかった。しかし、0.2 および 0.8 ppm O₃ は、アコニ
19 チンによる不整脈形成に対する感受性を増加させたことから、O₃ による心筋の興奮性の変
20 化が潜在していることが示唆された。O₃ への曝露は、心臓への自律神経入力調節を介し
21 ていると考えられる心臓の電気生理学的な変化を引き起こす。

22
23 Martinez-Campos *et al.* (2012)は、急激な運動によって引き起こされる酸化ストレスは、慢
24 性的な運動によって軽減されることから、O₃ によって生じる酸化ストレスを軽減するかと
25 うかを調べた。パイロット実験として、10 週齢の雄の Wistar ラットに有酸素運動 (1 日 90
26 分泳ぐように訓練) を実施した。訓練 3 週間後には、血漿中の還元型硝酸塩 (NO_x) の変
27 化により、運動への適応が確認された。その後、訓練を受けたラットに O₃ (0.5 ppm で 1
28 日 4 時間、運動の 1 時間前) を 2 週間曝露した。対照として、静止+ろ過空気曝露、静止
29 +O₃ 曝露、運動+ろ過空気曝露の組み合わせを実施した。実験終了時に、血漿中の NO_x、
30 8-イソプロスタン (8-IP)、マロンジアルデヒド (MDA)、スーパーオキシドディスムター
31 ゼ (SOD) 活性、およびカルボニル (CB) を測定した。CB はいずれの群でも変化しなかつ
32 った。O₃ による酸化ストレスは、NO_x と SOD 活性の低下、8-IP と MDA の増加によって
33 示された。運動は O₃ による影響を抑制したが、SOD については運動による低下も見られ
34 た。ただし静止+O₃ 曝露群ではより大きな低下が見られた。以上の結果から、有酸素運
35 動は O₃ による酸化ストレスから保護し、その効果は SOD とは無関係であると結論づけた。

36 Sethi *et al.* (2012)は、SD ラット (雄、年齢記載なし、成体、n = 4 ~ 6) に対し、O₃ を曝

1 露し、循環器への亜急性影響を調べる実験を行った。曝露群の構成は、対照群 1: 清浄空
2 気 28 日間曝露、対照群 2: 清浄空気 56 日間曝露、実験群 1: O₃ 28 日間曝露、実験群 2: O₃
3 56 日間曝露 である。曝露濃度は 0.8 ppm として一日あたり 8 時間、吸入による曝露を行
4 った。曝露後 24 時間の血行動態 (assessed hemodynamically) の指標として LVDP (左心室
5 発生圧力) と LVEDP (左心室拡張終期圧)、抗酸化物レベル、炎症性タンパク質レベル
6 (TNF- α)、カベオリン-1 レベル、カベオリン-3 レベルを観察し、影響を評価した。O₃ 曝
7 露群では LVDP が著しく減少し、心筋 TNF- α レベルの増加および SOD 活性の低下と関係
8 があった。心筋 TNF- α のレベル進行性的上昇に続き、カベオリン-1 レベルが減少した。一
9 方でカベオリン-3 レベルは上昇し、TNF- α レベルの上昇とは関係がなかった。以上 の結
10 果から、O₃ による心筋毒性にはカベオリン-1 とカベオリン-3 のバランスが関係している可
11 能性が考えられた。

12

13 Gordon *et al.* (2013)は、O₃ の加齢に伴う影響について調査した。4 か月齢 (成体) または
14 20 か月齢 (老齢) の雄の Brown Norway ラットに、0 または 0.8ppm O₃ を 6 時間、1 日/週、
15 17 週間曝露し、O₃ 曝露による肺、心血管系、神経系への影響を調べた。換気機能は各曝露
16 の 1 日後と 7 日後に評価した。心拍数、血圧 (テールカフ)、運動量は隔週で測定した。血
17 液、大動脈、気管支肺胞洗浄液は、最後の曝露から 24 時間後に分析し、肺の炎症、血清バ
18 イオマーカ、血管疾患の大動脈 mRNA マーカーを調べた。換気機能は、成体ラットと老
19 齢ラットの両方で、O₃ 曝露のたびに低下したが、老化ラットでは低下が見られるまでに数
20 週間を要した。O₃ 曝露後 7 日目には、両年齢群で O₃ の呼吸器系への影響が残っているこ
21 とが確認された。O₃ は心拍数や血圧に影響を及ぼさなかったが、両年齢群で運動量が減少
22 した。BALF では、成体では軽度の好中球性の炎症と蛋白質の漏出が認められた。58 項目
23 の血清成分測定では、年齢は 17 項目に影響を与え、O₃ は 6 項目に影響を与え、2 項目で年
24 齢と O₃ の相互作用を示した。老化ラットでは、レプチン、アディポネクチン、リポカリン、
25 インスリンが増加した。これらの結果から、成体ラットは老齢ラットに比べて一時的な O₃
26 の影響をより直接的に受けると考えられた。しかし、どちらの年齢のラットでも、特に呼
27 吸器系のエンドポイントで影響の残留が見られた。

28

29 McIntosh-Kastrinsky *et al.* (2013)は、C57BL/6 マウスに 0.245 ppm O₃ を 4 時間曝露
30 した。曝露から 8 時間後、20 分間の全体的虚血と 2 時間の再灌流からなるプロトコールで、
31 ランゲンドルフ製剤を用いて心反応を評価した。心機能は虚血前に左室展開圧 (LVDP)
32 と収縮力 (dP/dt) の指標を測定することにより評価した。虚血後の再灌流では、虚血後の
33 LVDP の回復と梗塞の大きさを調べた。また、気管支肺胞洗浄 (BAL) 細胞数を用いて肺
34 の炎症を評価した。O₃ 曝露マウスから単離灌流したマウス心臓において、心拍数の低下と
35 最低 dP/dt の低下がみられたが、虚血/再灌流したマウス心臓では、虚血性収縮までの時間、
36 LVDP の回復率、虚血による梗塞面積に O₃ 曝露による変化はみられなかった。

1
2 Robertson *et al.* (2013)は、O₃ 吸入曝露が誘導する血液循環因子と全身性血管機能障害との
3 交互作用に CD36 が関与しているかを調べた。C57BL/6 または CD36^{-/-}欠損マウス(雌、8-10
4 週齢、n=3-8) に、1 ppm O₃ を 4 時間曝露させた後、BALF を採取するとともに、大動脈を
5 単離し Ach 処理による血管弛緩効果を評価した。野生型マウスでは、O₃ 曝露により BALF
6 中の総細胞数、マクロファージ数、総タンパク質数の増加が見られたが、CD36 欠損マウ
7 スではこれらの変化は認められなかった。野生型マウスから単離した大動脈では O₃ 曝露に
8 よって Ach 誘発性の弛緩が低減したが、CD36^{-/-}マウスでは低減は認められなかった。しか
9 し、野生型マウスから単離した大動脈を、O₃ 曝露させた CD36^{-/-}マウスの血清で処理した
10 ところ、Ach による弛緩の低減が認められた。対照的に、CD36^{-/-}マウスから単離した大動
11 脈を、O₃ 処理した野生型マウスの血清で処理しても、Ach による弛緩の低減は認められな
12 かった。これらの結果は、O₃ 曝露が CD36 依存性のシグナル伝達を介して、ACh による
13 血管弛緩を阻害する生理活性因子の放出を誘導することを示唆している。また、肺の炎症
14 性および全身性の血管作用はどちらも CD36 に依存しているが、循環因子の存在は CD36
15 や炎症反応とは無関係であると考えられた。

16
17 Sun *et al.* (2013)は、O₃ 及び微粒子場物質の吸入曝露が心外膜脂肪組織 (EAT) および腎
18 周囲脂肪組織 (PAT) における炎症および酸化ストレスを増強させるかどうかを調べた。
19 Sprague-Dawley ラット (雄、n=7~8) に 8 週齢から正常食餌 (ND) または高フルクトース
20 食 (HFr) を与えて 8 週間飼育した後、O₃ と CAPs を単独または複合曝露させ、各種解析
21 を行った。CAPs と O₃ の単独又は複合曝露は、ND 群、HFr 群いずれにおいても、EAT と
22 PAT におけるマクロファージの浸潤増加をもたらしたが、浸潤度合いは複合曝露よりも単
23 独曝露でより顕著であった。また、CAPs と O₃ の単独又は複合曝露は、HFr 群でのみ EAT
24 と PAT における Tnf- α 、Mcp-1 およびレプチンの mRNA を増加させた。CAPs と O₃ の単
25 独又は複合曝露は IL-10 およびアディポネクチンの mRNA を減少させたが、これらの影響は
26 ND 群においても認められた。また、CAP と O₃ の単独または複合曝露は、HFr 群でのみ
27 EAT と PAT における誘導性酸化窒素シンターゼ (iNOS) の増加と、ミトコンドリア面積
28 の減少を誘導したが、これらの影響についても複合曝露よりも単独曝露で顕著であった。
29 また、O₃ 曝露による BALF 中のマクロファージ増加についても HFr 群でのみ認められたが、
30 CAPs と O₃ の複合ばく露ではこの影響は見られなかった。これらの結果は、大気汚染物
31 質の曝露と、心臓血管疾患および代謝合併症の促進に関連があることを示唆している。

32
33 Tankersley *et al.* (2013)は、1) 大気汚染に応じた心臓の代償性の変化はその組成に依存す
34 る、2) 特異的な心臓の適応は心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) によって調節される、
35 の 2 つの仮説について検証した。雄の C57Bl/6J (B6) マウスに 0.5 ppm オゾンおよび粒子
36 状物質 (PM) を曝露し、心機能に及ぼす影響を調べた。また、雄の Nppa (ANP 前駆遺伝

1 子) ノックアウト (KO) マウスを用いて、同様の曝露による心機能の変化を比較した。曝
2 露は以下組み合わせで3時間ずつ、3日間連続で行った。(1) 6時間のろ過空気 (FAFA)、
3 (2) O₃→FA (O₃FA)、(3) FA→カーボンブラック (FACB)、または(4) O₃→CB。心機
4 能は、コンダクタンスカテーテルを用いて、各曝露の8~10時間後に、心臓の圧力-体積ル
5 ープを作成して評価した。FAFAと比較して、各曝露群では、一回拍出量と心拍出量が33%
6 低下した。O₃FAの曝露では収縮末期と拡張末期の左心室容積が減少したが、FACBの曝露
7 では拡張末期の左心室容積が増加したことから、これらの心機能の低下は汚染物質の組成
8 に応じて異なるメカニズムによって生じたものと考えられた。Nppa KO マウスでは、O₃FA
9 やFACBの曝露によるこれらの心機能変化はほとんど見られなかった。これらの結果から、
10 大気汚染に伴う心臓機能の変化は、汚染物質の成分、特にO₃やPMに強く依存しているこ
11 とが示唆された。また、大気汚染によって引き起こされるこれらの心臓の代償メカニズム
12 には、ANPが関与していると考えられる。

13

14 Thomson *et al.* (2013)は、大気汚染と低出生体重、虫垂炎、脳卒中、神経学的及び神経行
15 動的な影響のメカニズムを調べた。Fischer-344 ラット (雄、n=4-6/群) に、O₃ (0、0.4、
16 0.8ppm) とEHC-93 (0、5、50mg/m³) を組み合わせて4時間経鼻吸入曝露し、曝露直後ま
17 たは24時間後に肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、大脳半球、下垂体の遺伝子プロファイルを
18 解析した。O₃曝露により、幅広い臓器においてTNF、CCL-2、IL-1βのmRNA発現低下が
19 認められるとともに、グルココルチコイド応答遺伝子であるGILZとSGK1のmRNAが増
20 加した。肺においては、O₃曝露によりCYP1A1とNQO1のmRNAが増加し、O₃とEHC
21 の複合曝露によりIL-6とMT-2が増加した。下垂体では、O₃曝露によりPTGS2 mRNA、
22 血漿中のACTHおよびコルチコステロイドレベルが増加した。経時的な変化を確認したと
23 ころ、O₃曝露直後では肺においてMT-2、GILZ mRNAレベルが増加し、曝露後24時間後
24 では肝臓においてMT-2 mRNAレベルが増加していた。これらの結果により、大気汚染物
25 質曝露による全身影響のメカニズムとして、視床下部-下垂体-副腎軸系におけるグルココ
26 ルチコイド調節の異常が生じている可能性が示された。

27 Wang *et al.* (2013)は、大気中のPM_{2.5}やオゾンによって引き起こされる循環器系の損傷の
28 毒性メカニズムを理解するために、亜急性動物実験を実施した。雄のWistar系ラットに、
29 空気またはO₃を8:00~12:00で4時間吸入曝露して、食塩水またはPM_{2.5}を15:00~17:00
30 で2時間気管内投与した。上記の曝露は2回/週で3週間行った。ラットは、対照群、0.2、
31 0.8、3.2mg/ラットPM_{2.5}単独曝露群、0.81 ppmオゾン単独曝露群、0.81 ppmオゾン+0.2、
32 0.8、3.2mg/ラットPM_{2.5}曝露群でグループ分けした。心拍数(HR)と心電図(ECG)は3
33 回目の曝露後と最後(6回目)の曝露後の両方の約24時間後に、収縮期血圧(SBP)は6
34 回目の曝露後の約24時間後にモニターした。6回目の曝露後に、全身の炎症と傷害のバイ
35 オマーカー(CRP、IL-6、LDH、CK)、心臓の酸化ストレス(MDA、SOD)、内皮機能(ET-1、
36 VEGF)を分析した。さらに、心筋の超微細構造の変化を透過型電子顕微鏡(TEM)で観

1 察し、病理学的分析を行った。PM_{2.5}単独曝露は、血漿中のCRP、MDA、CK、ET-1、SBP
2 の増加と、心拍変動(HRV)の減少を引き起こすことがわかった。ラットにおけるオゾン
3 単独曝露では、いずれの指標にも変化は見られなかった。しかし、オゾンとPM_{2.5}の複合
4 曝露では、CRP、IL-6、CK、LDH、MDAの増加、SODおよびHRVの減少が用量反応的に
5 認められた。一方、PM_{2.5}とオゾンの複合曝露およびPM_{2.5}単独曝露軍では、心電図の異常
6 が観察され、明らかな心筋の超微細構造の変化が観察された。PM(2.5)単独曝露は、炎症、
7 内皮機能およびANS損傷を引き起こす可能性があり、オゾンはPM_{2.5}によって引き起こさ
8 れるこれらの影響を増強した。

9
10 Gordon *et al.* (2014)は、O₃曝露影響における加齢に伴う感受性の変化について調査した。
11 成体(9~12か月)および老齢(20~24か月)の雄のBrown Norway系ラットに、空気ま
12 たは1 ppm O₃を1日6時間、週2日連続、13週間曝露し、心拍数(HR)、体温(Tc)、運
13 動量(MA)を測定した。急性O₃曝露(6時間曝露の後半2時間)は、HRとTcの著しい
14 低下をもたらした。曝露を毎週行うにつれて、O₃による低体温および徐脈は減少した。老
15 齢ラットでは、成体よりも影響が少なかった。急性反応はO₃曝露の2日目に悪化し、成体
16 の方が感受性が高かった。2日間のO₃曝露後の回復期には、成体および老齢ラットは、夜
17 間ではなく日中にTcおよびHRの上昇を示し、この効果はO₃曝露後少なくとも48時間持
18 続した。MAはO₃からの回復期に成人ラットで上昇したが、老齢ラットでは上昇しなかつ
19 た。全体として、HRやTcの低下を含むO₃の急性影響は、老齢ラットでは軽減された。
20 O₃からの回復時には、年齢に関係なく、発熱に似たパターンのTcの上昇やHRの上昇な
21 どの自律神経系の反応が見られた。老齢ラットではO₃に対する炎症反応が弱まっているこ
22 とから、比較的若いラットではO₃に対する生理的反応が比較的高いことが説明できる。

23
24 Kurhanewicz *et al.* (2014)は、これまでの研究により大気汚染と心機能及び死亡との関連が
25 報告されていることから、大気中粒子状物質の複合曝露による健康影響を調べるため、オ
26 ズンとFCAPsおよびUFCAPsの複合影響について調べた。10~12週齢の雌のC57BL/6マ
27 ウスに、O₃ 0.3ppm、190 µg/m³ FCAPs(0.3 ppm O₃あり/なし)、140 µg/m³ UFCAPs (0.3 ppm O₃
28 あり/なし)のいずれかに1~4時間曝露した。心拍数(HR)と心電図(ECG)を曝露の前・中・
29 後に測定、曝露24時間後にランゲンドルフ灌流心法により心機能を観察した。O₃とFCAPs
30 の複合曝露はFAと比較して心拍変動の減少がみられた。O₃とUFCAPsの複合曝露はFA
31 およびUFCAPs単独と比較してQRS間隔、QTs、非電導P波不整脈の増加、FAと比較し
32 てLVDP、収縮率、弛緩の減少がみられた。粒子状物質とオゾンの相互作用は、曝露1日
33 後の心機能の低下に重要な役割を担うことが示唆された。また、O₃はFCAPsとUFCAPs
34 に対して異なる作用を示すことが考えられた。

35
36 Wagner *et al.*(2014)は、O₃とPM_{2.5}の曝露による心血管反応が、食餌誘発性メタボリック

1 シンドローム (MetS) を有するラットでは増強されるとする仮説を検証した。
2 Sprague-Dawley ラット (雄、n=4-8) を生後 8 週齢、通常食または高フルクトース食で飼育
3 した後、O₃ および/または PM を曝露させ、心血管系への影響を評価した。血清中のグルコ
4 ース、トリグリセリド、インスリン抵抗性(HOMA-IR)は、高フルクトース食(HFrD)摂取群
5 で通常食(ND)摂取群よりも高かった。平均動脈圧(MAP)は、ND 摂取ラットでは O₃+PM_{2.5}
6 曝露でのみ低下が認められたが、HFrD 摂取ラットでは O₃、PM_{2.5} 単独曝露においても低下
7 が認められた。また、O₃、PM_{2.5}、O₃+PM_{2.5} 曝露による収縮期(systolic)血圧、心拍数の低下
8 についても、HFrD 摂取ラットでは ND 摂取ラットより大きく、拡張期(Diastolic)血圧につ
9 いては HFrD 群でのみ低下が認められた。心拍数間隔の指標である SDNN (RRI の標準偏
10 差)、RMSSD (隣接 RRI の差の根平均二乗) については、O₃ 曝露により上昇が見られたが、
11 上昇の程度については ND と HFrD で測定時期により異なっていた。SDNN と RMSSD は
12 O₃+PM_{2.5} 曝露では低下したが、その変化は ND 摂取ラットより HFr 摂取ラットの方が小さ
13 かった。全体を通して、O₃ および PM_{2.5} 曝露ラットにおける各種心血管機能の低下は、HFrD
14 誘発 MetS を有するラットにおいて増強および延長されていた。これらの結果は、MetS
15 を有することで、大気汚染物質の吸入による血圧および心拍数の変化が生じやすくなるこ
16 とを示唆している。

17

18 Kumarathasan *et al.* (2015)は、大気汚染物質が健康への悪影響に関係していることは明ら
19 かにされているが、複合影響の機構については明らかにされていないことから、ラットへ
20 の都市粒子状物質、オゾン、そしてそれらの複合曝露の影響を調べるため、3×3 濃度マト
21 リックス (オゾンの 3 濃度、EHC93 粒子の 3 濃度) に Fischer 344 ラットを曝露し、BALF、
22 BAL 細胞、血液、血漿について分析を行った。オゾンの吸入により、曝露直後の BAL 細
23 胞の酸化脂質生成の増加と、曝露 24 時間後の BALF での全蛋白・好中球数・成熟マクロ
24 ファージ数に増加が見られた。オゾンは、BALF 中の m-、p-、o-チロシンによって評価さ
25 れる活性酸素種 (ROS) の形成を増加させたが、一方で、3-ニトロチロシンで示される活
26 性窒素種 (RNS) の形成は、EHC-93 の用量と相関していた。曝露 24 時間後の血中の一酸
27 化炭素ヘモグロビン濃度は EHC-93 曝露と連動して増加した。EHC-93 吸入後、血漿中 3-
28 ニトロチロシンと o-ニトロチロシンが増加したが、3-ニトロチロシンの増加は EHC-93 と
29 オゾンの複合曝露では抑制された。血漿中のエンドセリン-1 前駆体(BET-1)と ET-1 は
30 EHC-93 粒子もしくはオゾンの単独の吸入では増加したが、EHC-93 とオゾンの複合曝露に
31 では影響は弱まった。血漿中 ET 濃度は BALF m-及び o-チロシンと正の相関を示した。
32 汚染物質由来の変化は複合曝露により増幅あるいは抑制された。肺における酸化・窒化ス
33 トレスは、二次的な肺外での ROS/RNS 生成に寄与するものと考えられる。窒化ストレス
34 とエンドセリンの不安定性は大気汚染物質とりわけ大気中粒子状物質の健康影響の主要因
35 であることが浮かび上がった。

36

1 Paffett *et al.* (2015)は、O₃単回吸入曝露後のラットの血管について、既知の作動薬に対
2 する収縮および拡張反応を調べた。また、吸入された O₃ の生理活性と毒性作用が血液循
3 環を介して肺外へと伝達されるかどうかを調べるために、曝露されたラットの血清を用い
4 た解析を行った。Sprague-Dawley ラットへの 1ppm の O₃ 曝露後 24 時間に単離された冠
5 血管ではろ過空気曝露群と比較してより大きな緊張がみられ、セロトニン刺激に対してよ
6 り大きく収縮した。また、アセチルコリン (ACh) に対する血管拡張は、O₃ 曝露ラットの
7 冠動脈では、ろ過空気曝露群と比較して著しく減少した。ACh に対する拡張反応は、スー
8 パーオキシドジスムターゼとカタラーゼの併用処理によって、また NADPH オキシダーゼ
9 阻害によって回復した。O₃ 曝露ラットの希釈した (10%) 血清を O₃ 曝露していないラッ
10 トの冠動脈内腔に灌流すると、O₃ による ACh に対する血管拡張反応の低下は部分的に再
11 現された。さらに、O₃ 曝露ラットの血清は一酸化窒素消去能を示し、これは ACh による
12 血管拡張反応の鈍化を部分的に説明できる可能性がある。以上より、O₃ 曝露による生理活
13 性は、血液循環の組成の変化を介している可能性がある。

14
15 Ramot *et al.* (2015)は、心血管疾患 (CVD) や代謝異常のげっ歯類モデルにおける急性
16 O₃ 曝露に対する肺の反応の違いを調べた。12~14 週齢の健康な Wistar Kyoto ラット、
17 Wista ラット、Sprague-Dawley ラット、CVD-compromised spontaneously hypertensive
18 ラット、fawn-hooded hypertensiv ラット、stroke-prone SH ラット、obese SH heart-failur
19 ラット、JCR:LA-c ラットに 0.0、0.25、0.5、または 1.0 ppm の O₃ を 4 時間曝露し、その
20 直後 (0 時間後) または 20 時間後にバイオマーカー、肺、心臓、腎臓の病態を比較した。
21 バイオマーカーおよび腎臓・心臓病理において、空気曝露した CVD モデルラットと WKY
22 ラットとの間に系統差が認められた。血清コレステロールは、空気曝露した肥満の SHHF
23 および JCR で、他の空気曝露系統に比べて高かった。O₃ は心臓や腎臓に病変を生じさせ
24 なかった。CVD モデルラットと SD ラットでは、O₃ に関係なく糸球体障害と腎臓の炎症
25 が認められた (WKY=WIS=SH<SD=SHSP<SHHF<JCR=FHH)。心筋線維の変性は SH、
26 SHHF、JCR で明らかであったが、JCR のみ冠動脈に炎症が見られる傾向があった。空気
27 曝露ラットの肺病理は、JCR を除くすべての系統でほとんどみられなかった。O₃ は肺胞
28 組織球症と気管支の炎症を誘発したが、JCR と SHHF ではその影響は小さかった。

29
30 Farraj *et al.* (2016)は、移動排出源が支配的な環境において二酸化窒素 (NO₂) のピークレ
31 ベルは朝と午後のラッシュアワーと一致するが、オゾン (O₃) のピークレベルは午後に発
32 生することから、NO₂ への朝の曝露はラットにおける午後の O₃ 曝露による心血管への影響
33 を増幅させると仮定した。12 週齢の雄の自然発症高血圧 (SH) ラットに、空気、0.3 ppm O₃
34 および/または 0.5 ppm NO₂ で 3 時間曝露した (4 つのグループ : Air/Air、Air/O₃、NO₂/Air、
35 NO₂/O₃、曝露時間 : 午前 3 時間/午後 3 時間)。血圧と心電図は埋め込み式測定装置により
36 記録した。NO₂/O₃ 曝露ラットのみで、電気生理学的、機械的、自律神経パラメーターに変

1 化が見られた。これらには、心拍数の減少、PR および QTc 間隔の増加、心拍数の変動性
2 の増加が含まれ、副交感神経の緊張の増加が示唆された。また、NO₂/O₃ 曝露群のみで収縮
3 期血圧と拡張期血圧が低下し、脈圧と QA 間隔を増加させたことから、心臓の収縮が低下
4 していることが示唆された。これらの結果は、NO₂ への事前曝露が O₃ の心血管系影響を
5 増加させたことを示しており、低濃度の O₃ 曝露と有害な心血管系影響を関連付ける疫学デ
6 ータに知恵を提供することができる可能性がある。

7
8 Snow *et al.* (2018)は、各種食品がオゾンによる全身および肺への影響を軽減するとい
9 う仮説を立て、Wistar Kyoto ラットに普通食、または魚油、オリーブ油、ココナッツ油を
10 添加した餌を 8 週間与え、その後 0.8 ppm の O₃ を 4 時間/日で 2 日間曝露させた。O₃ 曝
11 露はフェニレフリン誘発大動脈血管収縮を増加させたが、魚油飼料を与えたラットではこ
12 の影響はみられなかった。この心保護効果にもかかわらず、魚油飼料は肺傷害と炎症の気
13 管支肺胞洗浄液 (BALF) マーカーのベースラインレベルを上昇させた。O₃ による肺傷害
14 /炎症は、普通食、ココナッツオイル食、オリーブオイル食のラットで同程度であったが、
15 魚油食を与えた動物ではマーカーの発現が変化した。魚油は、曝露量に関係なく、BALF
16 に肥大した泡沫状マクロファージを生じさせ、コレステロール輸送体、コレステロール受
17 容体、核内受容体の mRNA 発現低下を引き起こした。血清マイクロ RNA プロファイルを
18 評価したところ、魚油食を与えた動物ではさまざまなマイクロ RNA が著しく減少してお
19 り、そのうちのいくつかは脾臓由来であった。一方で、O₃ 特異的な変化は認められなかつ
20 た。これらのデータを総合すると、魚油は O₃ 曝露から血管を保護するものの、肺の傷害
21 /炎症を増加させ、脂質輸送機構を損ない、泡沫状マクロファージの蓄積をもたらすこと
22 が示された。

23 1.3. 内分泌系及び代謝系への影響に関する知見

24 Last *et al.* (2005)は、高濃度の O₃ に急性曝露したラットやマウスにおいて体重低下が生じ
25 るメカニズムを明らかにするため、マウスに O₃ を急性曝露させ肝臓における遺伝子発現の
26 変化を解析した。C57BL マウス (雄雌、6~7 週齢、n=3~4/群) に、1ppm の O₃ を 8 時間、3
27 日間曝露し、肝臓における遺伝子解析を実施した。O₃ 曝露マウスは総摂餌量が過空気曝
28 露マウスと比較して 42%低く、体重が曝露前から最大 14%減少した。O₃ 曝露マウスの肝
29 臓では、脂質と脂肪酸の代謝、および炭水化物代謝に関連する mRNA の発現が低下した。
30 また、肝臓において複数のインターフェロン依存性遺伝子の発現が低下し、生体異物代謝
31 酵素をコードする複数の mRNA の転写についても減少が認められた。以上の結果から、
32 O₃ 曝露は、肝臓における脂質と脂肪酸代謝、炭水化物代謝、生体異物代謝、インターフェ
33 ロン依存性遺伝子発現のダウンレギュレーションを引き起こすことが示唆された。

34
35
36 Martrette *et al.* (2011)は、ラットを用いた O₃ 吸入曝露実験により、行動学および生理学

1 的影響（ホルモン状態、筋肉構造など）を調べた。Wistar ラット（雌、7週齢、n=12匹）
2 に0.12 ppm O₃を6時間/日で15日間曝露した。O₃曝露は、飲水、身づくろい、休息の増加、
3 後肢立ち、飛び上がり、自発運動の減少を伴う顕著な行動影響を生じさせ、血漿中のコル
4 チコステロンおよび遊離トリヨードサイロニン（FT3）の濃度を上昇させた。また、横隔
5 膜、咬筋、顎二腹筋におけるミオシン重鎖（MHC）-2A、2X、2Bの発現を変化させた。こ
6 れらの結果から、O₃曝露が血漿中のコルチコステロンレベル、FT3レベルを上昇させるこ
7 と、またO₃曝露による呼吸行動およびホルモンの変化は、筋肉変化の要因であることが示
8 唆された。

9
10 Bass *et al.* (2013)は、若齢および老齢のラットにおいて、オゾンがインスリンシグナルや
11 小胞体ストレスを変化させることで、グルコースのホメオスタシスを損なうとする仮説を
12 検証した。1、4、12、24ヶ月齢の雄のBrown Norway ラットに、空気または0.25、1.0ppm
13 オゾンを1日6時間、2日間（急性）曝露した。また、1、9、21ヶ月齢のラットに、空気
14 または0.25、1.0ppm オゾンを1日6時間、1週間2日、13週間（亜慢性）曝露した。さら
15 に4ヶ月齢のラットに、空気または1.0 ppm オゾンを1日6時間、1日または2日間（経
16 時）曝露した。曝露後すぐに糖負荷試験（GTT）を実施した。血清および組織のバイオマ
17 ーカーは、急性および亜慢性試験では最後のオゾン曝露から18時間後に、経時試験では各
18 日の曝露直後に分析した。いずれの年齢のラットにおいても、オゾンの急性投与は高血糖
19 と耐糖能異常を引き起こした。13週間曝露ラットでは、オゾンによる耐糖能低下が抑制さ
20 れた。A2-マクログロブリン、アディポネクチン、オステオポンチンは、急性期のオゾン
21 では増加したが、亜慢性期のオゾンでは増加しなかった。時間経過解析では、1日目と2
22 日目に耐糖能異常が認められ（2日目>1日目）、オゾン曝露後18時間で回復した。レプチ
23 ンは1日目に増加し、エピネフリンはオゾン後のすべての時間に増加した。オゾンは肝臓
24 と脂肪組織でリン酸化されたインスリン受容体基質-1を減少させる傾向があった。小胞体
25 ストレスの転写マーカーはオゾン曝露2日後にのみ増加したことから、小胞体ストレスは
26 オゾンによる急性代謝障害の結果であると考えられた。急性オゾン曝露は、交感神経刺激
27 を介して、いずれの月齢のラットに対しても顕著な全身性の代謝障害を引き起こすと考え
28 られる。

29
30 Thomson *et al.* (2013)は、大気汚染と低出生体重、虫垂炎、脳卒中、神経学的及び神経行
31 動的な影響のメカニズムを調べた。Fischer-344 ラット（雄、n=4-6/群）に、O₃（0、0.4、
32 0.8ppm）とEHC-93（0、5、50mg/m³）を組み合わせる4時間経鼻吸入曝露し、曝露直後ま
33 たは24時間後に肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、大脳半球、下垂体の遺伝子プロファイルを
34 解析した。O₃曝露により、幅広い臓器においてTNF、CCL-2、IL-1βのmRNA発現低下が
35 認められるとともに、グルココルチコイド応答遺伝子であるGILZとSGK1のmRNAが増
36 加した。肺においては、O₃曝露によりCYP1A1とNQO1のmRNAが増加し、O₃とEHC

1 の複合曝露により IL-6 と MT-2 が増加した。下垂体では、O₃ 曝露により PTGS2 mRNA、
2 血漿中の ACTH およびコルチコステロイドレベルが増加した。経時的な変化を確認したと
3 ころ、O₃ 曝露直後では肺において MT-2、GILZ mRNA レベルが増加し、曝露後 24 時間後
4 では肝臓において MT-2 mRNA レベルが増加していた。これらの結果により、大気汚染物
5 質曝露による全身影響のメカニズムとして、視床下部-下垂体-副腎軸系におけるグルココ
6 ルチコイド調節の異常が生じている可能性が示された。

7
8 Vella *et al.* (2014)は、交通関連の大気汚染への曝露が 2 型糖尿病の危険因子であることを
9 示唆する証拠が増えていることから、オゾン曝露による糖代謝への影響を調べた。Wistar
10 ラットに、空気または 0.8 ppm オゾンを 16 時間曝露した。0.8ppm のオゾン曝露により、
11 ラットの全身インスリン抵抗性と酸化ストレスが誘発され、それに伴って小胞体 (ER) ス
12 トレス、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化、骨格筋におけるインスリンシグナル伝達
13 の障害が生じた。C2C12 筋芽細胞にオゾンを曝露したラットの気管支肺胞洗浄液を処置す
14 ることでこの効果を再現したことから、この表現型には肺の毒性物質が関与していること
15 が示唆された。ケミカルシャペロンである 4-フェニル酪酸、JNK 阻害剤である SP600125、
16 抗酸化剤である N-アセチルシステインを前処理すると、インスリン抵抗性が緩和されたこ
17 とから、オゾンが酸化ストレス、小胞体ストレス、JNK 活性化を順次引き起こし、筋肉に
18 おけるインスリンシグナルを障害することが示唆された。以上 の結果は、オゾンが糖尿病
19 の発症を促進する可能性を示唆している。

20
21 Miller *et al.* (2015)は、大気汚染が糖尿病の発症率の増加と関連していることが報告され
22 ていることから、O₃ 曝露が代謝恒常性の変化を引き起こすかどうかについて調べた。Wister
23 Kyoto ラット (雄、10 週齢、n=5-8) に、1 ppm の O₃ を 6 時間/日で 2 日間曝露させ、血清
24 メタボロームプロファイリングおよび肝臓トランスクリプトームプロファイリングを実施
25 した。O₃ 曝露により BALF 中の好中球およびアルブミンが増加した。血中にグルコースを
26 投与した糖代謝テストでは、O₃ 曝露による血糖代謝の抑制が認められた。また、O₃ 曝露は
27 血中のインスリンを減少させ、レプチン、エピネフリン、総コレステロール、LDL-C およ
28 び HDL-C を増加させた。血清メタボローム解析では、O₃ 曝露は血中の解糖系、長鎖遊離
29 脂肪酸、分岐鎖アミノ酸、コレステロールの代謝産物を増加させたが、1,5-アンヒドログ
30 ルシトール、胆汁酸、TCA サイクルの代謝産物は減少させ、血糖コントロール、タンパク
31 質分解および脂肪分解の障害が示唆された。肝臓における遺伝子発現の変化については、
32 O₃ 曝露により、解糖系、TCA サイクルおよび糖新生のマーカーが増加し、ステロイドおよ
33 び脂肪生合成のマーカーが減少した。また、O₃ 曝露は、肝臓における IRS-2、PFKFB-1、
34 ACO-2、PPARGC1A の mRNA を増加させた。これらの結果は、短期間の O₃ 曝露が、グ
35 ルコース、脂質、およびアミノ酸代謝を含む総合的な代謝異常を引き起こすことを示唆し
36 ている。

1

2 Zhong *et al.* (2016)は、O₃曝露と糖尿病や血管障害などの慢性炎症性疾患との関連が報告
3 されていることから、遺伝的に感受性の高いモデルマウスにおける耐糖能異常、免疫活性化、
4 およびそれらの基礎となる生体メカニズムに対するO₃曝露の影響を調査した。糖尿病
5 モデルのKKマウスに、ろ過空気(FA)または0.5 ppm O₃を4時間/日、5日/週で連続13
6 日間曝露し、最後の曝露後にインスリン耐性試験(ITT)を行った。血漿インスリン、ア
7 ディポネクチン、およびレプチンを測定するとともに、病理学的変化及び炎症反応につい
8 ても評価した。O₃曝露マウスはインスリン反応障害を示した。血漿インスリンとレプチン
9 のレベルは、O₃曝露マウスで減少した。O₃への3週間の曝露は、肺の炎症を誘発し、血液
10 および内臓脂肪組織の両方で単球/マクロファージを増加させた。炎症性単球/マクロファ
11 ージは全身的にも局所的にも増加した。CD4+T細胞の活性化はO₃の曝露によって増強さ
12 れたが、CD4+T細胞の相対的なパーセンテージは血液と脂肪組織で減少した。CXCL-11、
13 IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、iNOSなどの複数の炎症性遺伝子発現が内臓脂肪組織でアップレギ
14 ュレートされた。さらに、Cox4、Cox5a、Scd1、Nrf1、Nrf2などの酸化ストレス関連遺伝
15 子の発現は、O₃曝露マウスの内臓脂肪組織で増加した。以上より著者らは、O₃を繰り返
16 し吸入すると、酸化ストレス、脂肪の炎症、インスリン抵抗性が誘発されると結論付けた。

17

18 Miller *et al.* (2016b)は、オゾンによって誘発された急性のストレス反応と代謝障害が、重
19 慢性の間欠的な曝露の間も持続し、末梢のインスリン抵抗性を誘発するという仮説を検証
20 した。雄のWistar Kyotoラットに、大気または0.25、1.00 ppmオゾンを、1日5時間、連
21 続3日/週、13週間曝露した。肺、代謝、インスリンシグナル、ストレスの各評価項目を、
22 13週間の曝露が終了した直後と曝露終了1週間(回復期間)後で測定した。間欠的なオゾ
23 ン曝露により、肺の損傷や炎症、空腹時高血糖、耐糖能異常が持続し、曝露終了直後には
24 アドレナリンやコレステロールの上昇が見られたが、これらの反応は曝露終了1週間の回
25 復期間でほぼ元のレベルに戻ることがわかり、影響は可逆的であることが示された。さら
26 に、以前の研究で見られたオゾン急性曝露による非エステル化脂肪酸と分岐鎖アミノ酸の
27 増加は、重慢性的な曝露である本研究では見られなかった。また、末梢や組織に特異的な
28 インスリン抵抗性や肝臓の糖新生の増加も見られず、むしろ重慢性的な曝露は循環インス
29 リンを低下させ、グルコース刺激による β 細胞のインスリン分泌を著しく阻害した。若年
30 の成熟ラットを用いた本研究の結果は、オゾン曝露と1型糖尿病との間に正の相関関係を
31 示す疫学研究への示唆となる可能性がある。また、オゾンによって誘発された β 細胞の機
32 能障害は、慢性オゾン曝露によるグルコース、脂質、タンパク質の代謝調節機能の低下に
33 より、他の組織特異的な代謝変化を引き起こす可能性がある。

34

35 Thomson *et al.* (2018)は、大気汚染物質がストレスホルモン(ヒトのコルチゾール、齧齒
36 類のコルチコステロン)の分泌を増加させ代謝異常の原因となる可能性があることから、

1 耐糖能、外因性グルコースに対する代謝（トリグリセリド）、内分泌・エネルギー調節（インスリン、グルカゴン、GLP-1、レプチン、グレリン、コルチコステロン）、および炎症・
2 内皮（TNF、IL-6、VEGF、PAI-1）反応に対するオゾンの急性効果、およびストレス軸の
3 関与を評価した。雄の Fischer-344 ラットに、空気または 0.8 ppm オゾンを 4 時間、全身
4 チャンバー内で曝露した。オゾンの影響に対する視床下部-下垂体-副腎（HPA）軸の関与は、
5 曝露前にグルココルチコイド合成阻害剤であるメチラポン（50mg/kg 体重）、コルチコステ
6 ロン（10mg/kg 体重）、またはビヒクル（40%プロピレングリコール）を皮下投与すること
7 で検証した。曝露直後に耐糖能試験（2g/kg 体重のブドウ糖）を行い、0, 30, 60, 90, 120
8 分後に血液を採取した。オゾン曝露による耐糖能の低下は、血漿トリグリセリドの増加を
9 伴っていたが、インスリン分泌の低下は見られなかった。オゾンはグルカゴン、GLP-1、
10 グレリンのグルコースに対する反応を低下させたが、炎症反応や内皮反応には影響を与え
11 なかった。メチラポンはコルチコステロンを減少させたが、グルコースとトリグリセリド
12 を増加させたため、グルココルチコイド抑制の影響を評価するのは複雑であった。しかし、
13 コルチコステロンを投与すると、オゾン効果のプロファイルが再現されたことから、視床
14 下部-下垂体-副腎軸の役割が示唆された。これらの結果は、オゾン依存性の耐糖能の変化
15 は、グルコースチャレンジに対する代謝および内分泌反応の変化を伴い、外因性のストレ
16 スホルモンによって再現されることを示唆している。

18

19 1.4. 神経系への影響に関する知見

20 Rivas-Arancibia *et al.* (1998)は、雄の Wistar ラット（47～50 日齢）に 0.0、0.1、0.2、0.5、
21 1.0 ppm の O₃ を 4 時間吸入曝露させた。O₃ 曝露終了の 30 分後又は 1 時間後に 2 mA 又は 4
22 mA の電気刺激に対する受動的回避試験を行い、10 分後及び 24 時間後に短期・長期記憶を
23 評価した（各 O₃ 濃度、電気刺激について 10 匹ずつ）。その結果、短期記憶については、
24 O₃ 曝露による影響は認められなかった。長期記憶は、2 mA と 4 mA の電気刺激による受動
25 的回避試験において、共に減少し、4 mA の刺激による試験では全ての O₃ 濃度で減少した。
26 また、O₃ 曝露終了後、各濃度 5 匹のラットを屠殺し、肺、脳における Cu/Zn SOD 濃度を
27 測定した結果、肺、脳ともに、0.1、0.2、0.5 ppm の O₃ 曝露群では Cu/Zn SOD 濃度は増加
28 し、1.0 ppm 曝露群では低下した。以上の結果から、O₃ 曝露により酸化的ストレスが生じ、
29 それに伴い長期の学習記憶能力が低下することが示唆された。

30

31 Avila-Costa *et al.* (1999)は、O₃ 曝露が記憶に及ぼす影響と海馬細胞に生じる影響との相関
32 関係を明らかにするため、ラットへの O₃ 急性吸入曝露実験を行った。Wistar ラット（全
33 24 匹）を密閉チャンバー内で 1 ppm の O₃ に 4 時間吸入曝露した後、ラットに受動回避条
34 件付けからなる長期（24 時間）記憶訓練を与えた。その後、脳をゴルジ染色し、海馬 CA1
35 領域の錐体ニューロンについて、二次樹状突起および三次樹状突起のスパイン数を計測し
36 た。O₃ 曝露群では対照群と比較して、受動的回避学習試験における長期記憶が低下した。

1 海馬 CA1 領域錐体細胞における樹状突起スパイン数が減少した。これらの結果から、O₃
2 曝露による長期記憶の低下は、海馬の錐体細胞におけるスパイン密度の減少によるものであ
3 ることが示唆された。

4
5 Guerrero *et al.* (1999)は、O₃による生体組織傷害の機序として、ラジカル産生による酸化
6 ストレスが挙げられることから、抗酸化作用を有するビタミン E が O₃による神経細胞機
7 能障害、脂質過酸化を軽減するか否かを明らかにする目的で、雄の Wistar ラット (47~50
8 日齢)に清浄空気又は0.7 ppm の O₃を4時間全身吸入曝露させると共に、O₃曝露の5分前、
9 あるいは5分後に生理食塩水又は50 mg/kg のビタミン E を腹腔内投与した。対照群 (清浄
10 空気曝露+生理食塩水投与)、O₃群 (O₃曝露+生理食塩水投与)、VE群 (清浄空気曝露+ビ
11 タミン E 投与)、O₃+VE群 (O₃曝露後、ビタミン E 投与)、VE+O₃群 (ビタミン E 投与後、
12 O₃曝露)それぞれ10匹について、曝露終了後に10分間の運動能力を測定し、曝露の1時
13 間後及び24時間後に受動回避試験により短期及び長期の記憶力への影響を調べた。また、
14 各群6匹について曝露終了1時間後に脳 (海馬、線条体、前頭葉)を採取し、組織中の過
15 酸化脂質量を調べた。運動能力には、どの群にも違いはみられなかったが、O₃群では他の
16 群 (対照群、VE群、O₃+VE群、VE+O₃群)に比べ、短期、長期、両方の記憶機能の減退
17 がみられた。また、O₃群における過酸化脂質量の増加が認められた。これらの結果から、
18 著者らはビタミン E が酸化ストレスを抑制したと結論付けている。

19
20 Rivas-Arancibia *et al.* (2000)は、O₃曝露による学習記憶能力への影響をタウリンが防御で
21 きるか否か、及びタウリンの効果と加齢の関係を検討するため、若齢 (47日齢)、成獣 (540
22 日齢)、高齢 (900日齢)の雄の Wistar ラットにろ過空気又は0.7~0.8 ppm の O₃を4時間
23 吸入曝露させると共に、O₃曝露の5分前あるいは5分後にタウリン又は生理食塩水を腹腔
24 内投与し (各群10匹、合計150匹)、O₃曝露終了の1時間後に受動的回避試験を行い、10
25 分後及び24時間後に短期・長期記憶学習について調べた。さらに、O₃による脂質過酸化
26 への影響に対するタウリンの効果を検討するため、若齢、高齢のラットにろ過空気又は
27 1ppm の O₃曝露、及びタウリン又は生理食塩水の投与を行い (各群6匹、合計60匹)、O₃
28 曝露終了の1時間後に過酸化脂質量を調べた。若齢及び高齢ラットにおいて、O₃曝露は短
29 期・長期の学習記憶力を低下させたが、O₃曝露後にタウリンを投与すると、記憶力の低下
30 が回復した。しかし、O₃曝露前にタウリンを投与すると、学習記憶力の回復は認められな
31 かった。一方、成熟ラットでは、これらの影響は認められなかった。また、若齢、高齢ラ
32 ットにおいて、O₃曝露により前頭皮質と海馬で脂質過酸化は亢進したが、O₃曝露後にタウ
33 リンを投与すると脂質過酸化の亢進が抑制された。しかし、線条体の O₃による脂質過酸化
34 は、高齢ラットにおいてタウリンの前投与により抑制された。以上の結果から、タウリン
35 は O₃による学習記憶力の低下を改善し、脂質過酸化を保護することが明らかになった。そ
36 して、これらの効果は、年齢によって差があることが明らかになった。

1
2 Dorado-Martinez *et al.* (2001)は、O₃ 曝露により組織内に発生する酸化ストレスが脳組織傷
3 害を誘発するかどうかを解析することを目的として、雄の Wistar ラットに 0.0、0.1、0.4、
4 0.7、1.1、1.5 ppm の O₃ を 4 時間全身吸入曝露させ、曝露終了 1 時間後に神経機能（運動能
5 力、記憶力）及び脳組織内脂質過酸化への影響を観察した。運動能力については、各濃度
6 に 10 匹ずつ曝露させ、ケージ内での 5 分間の活動記録をモニターした結果、1.1 ppm 以
7 上 で運動能力の低下が認められた。記憶力については、各濃度に 10 匹ずつ曝露させ、受
8 動回避の訓練後、短期（10 分間）、長期（24 時間）の間隔をおいて記憶試験を行った結果、
9 0.7 ppm 以上 の濃度で記憶障害が起こった。脳組織内脂質過酸化については、1.5 ppm を
10 除く各濃度に 4 匹ずつ曝露させ、脳（海馬、線条体、前頭葉、小脳）組織中の過酸化脂質
11 量を調べた結果、0.4 ppm 以上 で脂質の過酸化量が増加することが示された。著者らは、
12 神経機能に現れた影響が起こる機序は不明であり、今後の課題であるが、脂質の過酸化に
13 みられる物質レベルでの異常が関連している可能性があると考えしている。

14
15 Sorace *et al.* (2001)は、O₃ 曝露による成熟マウス及び O₃ 曝露した雌マウスから生まれた
16 仔マウスの学習行動への影響について検討するため、実験 1 では雌雄の CD-1 マウス成獣
17 に 0.0、0.3、0.6 ppm の O₃ を連続的に 30 日間、実験 2 では雌マウスを交配から妊娠第 17
18 日まで 30 日間全身吸入曝露を継続した。O₃ を 30 日間曝露した雄マウス成獣では、曝露第
19 4、19 日及び曝露終了 3 日後にオープンフィールド試験、曝露第 24～28 日にモリス水迷路
20 を行った。曝露マウスから生まれた仔マウスに対しては、生後第 2～20 日に身体的、神経
21 行動学的発達状況の評価、生後第 12 日に帰巢試験、第 21 日に自発行動試験、第 22～23
22 日に受動回避試験、第 70～74 日にモリス水迷路、第 100 日にホットプレート試験を行った。
23 オープンフィールド試験では、曝露第 4 日に 0.6 ppm の O₃ を曝露した雄マウスにおいて対
24 照群よりも横断行動が増加したが、その後は相違がみられなくなった。モリス水迷路では、
25 成獣、仔マウスともに 0.3 ppm の O₃ 曝露により逆転ステージでの学習障害が認められた。
26 また、仔マウスへの受動回避試験及びホットプレート試験では、潜伏時間の増加が認めら
27 れた。以上 の実験結果より、O₃ 曝露では濃度依存性はみられないが、げっ歯類の神経行
28 動学的成績に選択的にわずかな影響を与えることが確認された。

29
30 Nino-Cabrera *et al.* (2002)は、O₃ による生体組織傷害の機序として、ラジカル産生による
31 酸化ストレスが挙げられており、酸化ストレスによる脳組織傷害は、老化及びアルツハイ
32 マー病等の神経変性疾患においても認められる現象であることから、酸化ストレスの著
33 しい環境下で、加齢性脳組織傷害が更に進行するかどうかを検討した。高齢（26 か月齢）
34 の雄の Wistar ラット 4 匹に 0.7 ppm の O₃、3 匹に清浄空気を 4 時間全身吸入曝露させ、曝
35 露終了の 24 時間後に脳（海馬、前頭葉灰白質）の組織の電子顕微鏡観察を行い、100 個の
36 神経細胞を対象として細胞内リポスチン顆粒形成、神経細胞内空胞、細胞体・細胞突起

1 変性壊死、髄鞘変性、星状細胞の突起の異常について評価したところ、O₃曝露群の海馬に
2 おいて、髄鞘変性及び神経突起の変性・壊死、星状細胞の突起の異常が認められた。これ
3 らの結果から、著者らは O₃曝露が脳の生理的な加齢性傷害を促進する因子であると位置づ
4 けている。

5
6 *Chen et al.* (2003)は、30日齢のアカゲサルにろ過空気又は0.5 ppmのO₃を8時間/日で5
7 日間吸入曝露させ、その後9日間ろ過空気ですべて回復させるサイクルを11回反復した(各群6
8 匹)。最終曝露の3~5日後に孤束核を含む脳幹切片を用い、静止膜電位、静止入力抵抗、
9 脱分極通電による非特定興奮の反応性、孤束刺激によるシナプス興奮の反応性を調べた。
10 その結果、O₃曝露により、膜電位は脱分極し、膜抵抗が増加、脱分極通電に対するニュー
11 ロンのスパイク反応は増加したが、迷走神経知覚線維活性の興奮性は低下した。これは知
12 覚伝達の反応性低下を示す。P物質は、肺やNSTシグナル伝達に関連し、通電に対する反
13 応性を高めるが、知覚伝達の低下には関連しない。O₃の反復曝露によるNSTニューロン
14 の可塑性は呼吸運動の順応を説明するのに役立つかもしれない。

15
16 *González-Piña et al.* (2003)は、オゾン(O₃)がラットの睡眠パターンや線条体および間脳
17 の5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)濃度に影響を与えることが報告されていること
18 から、睡眠覚醒の恒常性に関与する背側皮質(DR)および視床下部内側視索前野(MPO)
19 における5-HIAA濃度に及ぼすO₃曝露の影響を調べた。90日齢の雄のWistarラットに、
20 大気汚染レベルの高い都市で観察されるベル型の日中パターン(7:00~19:00に曝露)でO₃
21 を最大0.5 ppm、12時間曝露した。O₃の睡眠パターンへの影響を評価するために、ポリグ
22 ラフの記録を行った。O₃曝露中では、細胞外の5-HIAAレベルがDRで28%増加し、レム
23 睡眠(PS)が56%減少した。また、オゾン曝露終了後の暗期では、MPOで5-HIAAレベ
24 ルが32%減少し、徐波睡眠(SWS)が22%減少、覚醒が21%増加した。レム睡眠の減少
25 は、セロトニン作動性DR調節障害の表現型のひとつであり、MPOで観察された曝露後の
26 効果は、睡眠-覚醒サイクルにおける視床下部の役割に基づいて説明することができる。

27
28 *Rubio et al.* (2003)は、O₃曝露により誘導される炎症性メディエーターが睡眠に与える影
29 響を調べた。Wistarラット(n=10)に1 ppmのO₃を24時間吸入曝露させ、各種睡眠パラ
30 メータの解析を行った。また、O₃曝露の1時間前にインドメタシン(IM)を筋肉投与し、プ
31 ロスタグランジン合成を阻害した際のO₃誘導性睡眠障害への影響を評価した。O₃曝露は
32 緩徐波睡眠(SWS)を増加させ、迅速眼球運動睡眠(REM)を減少させるが、IM前処置
33 により、これらのO₃誘発性睡眠影響が軽減した。なお、IM単独では睡眠には影響を与え
34 なかった。これらの知見は、O₃曝露による睡眠影響に炎症性メディエーターが関与してい
35 ることを示唆している。

36

1 Soulage *et al.* (2004)は、脳と交感神経支配器官におけるカテコールアミンの生合成と代謝
2 に対する O₃ 曝露の急性影響について検討するため、7 週齢の雄の Sprague-Dawley ラットに
3 ろ過空気又は 0.7 ppm の O₃ を 5 時間、全身吸入曝露させた (各群 40 匹)。曝露終了直後に
4 カテコールアミン量と代謝速度、チロシンヒドロキシラーゼ (Tyrosine hydroxylase) 活性
5 を観察した結果、上頸神経節と脳幹青斑核の後部 A2 のノルアドレナリン細胞集団でチロ
6 シンヒドロキシラーゼ活性が増加してカテコールアミンの生合成が増加した。カテコール
7 アミンの代謝は心臓で亢進した。一方、肺と大脳基底核線条体では代謝は抑制された。O₃
8 曝露に対するこの反応は、カテコールアミンニューロンに対する細胞毒性というより、生
9 理的な反応であると考えられた。

10
11 Alfaro-Rodriguez and Gonzalez-Pina (2005)は、雄の Wistar ラットを 12 時間ずつの明暗周期
12 の下で飼育し、清浄空気又は 0.5 ppm の O₃ を 24 時間、全身吸入曝露させた (各群 5 匹)。
13 曝露前 24 時間及び曝露中の 24 時間、1 時間毎に内側視索前野における細胞外アセチルコ
14 リン濃度の測定、ポリグラフによる睡眠記録を行い、睡眠記録からレム睡眠時間、ノンレ
15 ム睡眠時間、総睡眠時間を調べた結果、O₃ 曝露により、レム睡眠時間が 65%減少し、ノン
16 レム睡眠時間が 75%増加したが、総睡眠時間は 35%減少した。また、アセチルコリン濃度
17 は明期中、58%減少した。

18
19 Calderon Guzman *et al.* (2006)は、21 日齢の雄の Wistar ラット (32 匹) に 7%タンパク質
20 (低栄養) 又は 23%タンパク質 (正常栄養) の餌を与え、空気又は 0.75 ppm の O₃ を 4 時
21 間/日で連続 15 日間、全身吸入曝露させた。曝露中の体重を測定し、曝露終了直後に脳組
22 織を採取し、Na/K-ATPase 活性、脂質過酸化量、グルタチオン量を調べた。低栄養群では
23 ATPase 活性が正常栄養群と比較して低下した。グルタチオン量については、低栄養群では
24 O₃ 曝露によって減少したが、正常栄養群では小脳において増加した。以上の結果から、
25 低栄養状態は、O₃ 曝露による ATPase 活性、グルタチオン量に影響を与えるといえる。

26
27 Pereyra-Munoz *et al.* (2006)は、雄の Wistar ラットに 0.25 ppm の O₃ を 4 時間/日で 15、30
28 日間、全身吸入曝露させ、対照群には空気を曝露させた (各群 10 匹)。最終曝露終了の 2
29 時間後に運動活動性を測定し、その後、各群 6 匹を屠殺し、脳組織の過酸化脂質量を調べ、
30 残り 4 匹については脳の縦断切片を作成し、Klüver-Barrera 染色及び免疫組織染色によるチ
31 ロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase)、DARPP-32 (dopamine and adenosine
32 3'5'-monophosphate-regulated phosphoprotein of 32kD)、iNOS、SOD の分析、黒質、線条体
33 におけるニューロン数計測を行った。O₃ 曝露により、運動活動性の減少、線条体の脂質過酸
34 化、黒質脳細胞の傷害 (空胞化) とニューロン数の減少、チロシン水酸化酵素、ドーパミ
35 ン作動性ニューロン数の減少、線条体における DARPP-32 陽性細胞の増加、iNOS 及び SOD
36 発現の増加が観察された。O₃ による、これらの影響は、15 日間曝露と比較し、30 日間曝

1 露で増強する傾向がみられた。以上 の結果から、比較的低濃度の O₃ の亜急性曝露 (15～
2 30 日) によって、ラットの黒質、線条体のドーパミン作動性ニューロンの酸化的傷害と運
3 動活動性の低下がもたらされることが示された。

4
5 Thomson *et al.* (2007)は、雄の Fisher344 ラットに清浄空気、0.4、0.8 ppm の O₃、5、50 mg/m³
6 の都市大気粒子 EHC-93 のいずれかを単独で、あるいは 0.8 ppm の O₃ と 50 mg/m³ の EHC-93
7 を複合で 4 時間、鼻部吸入曝露させた。曝露直後及び 24 時間後に大脳、下垂体を採取し、
8 リアルタイム RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) により大脳、下垂体におけるプレ
9 プロエンドセリン-1、プレプロエンドセリン-3、ECE-1、eNOS (内皮型一酸化窒素合成酵
10 素)、iNOS、TNF- α の mRNA 発現量を測定した。O₃ 曝露によって大脳におけるプレプロエン
11 ドセリン-1 mRNA 発現量の増加、プレプロエンドセリン-3 mRNA 発現量の減少、下垂体
12 におけるプレプロエンドセリン-1、プレプロエンドセリン-3、ECE-1 mRNA 発現量の増加
13 が認められた。大脳における iNOS は、O₃ 曝露直後に減少したが、24 時間後には上昇した。
14 TNF- α の mRNA 発現量については、大脳では EHC-93 曝露によって減少し、下垂体では
15 O₃、EHC-93 いずれへの曝露によっても減少した。以上 の結果から、O₃ や大気粒子は脳に
16 における遺伝子発現を急速に調節していることが示唆された。

17
18 Araneda *et al.* (2008)は、O₃ 曝露が中枢神経系 (主に脳) に与える影響を検討するため、
19 雄の Sprague-Dawley ラットに 0.5 ppm の O₃ を 3 時間、全身吸入曝露させ、曝露終了の直後
20 又は 3 時間の回復期間の後に脳組織の免疫組織学検索 (病理組織学的解析及びタンパク質
21 発現解析として血管内皮増殖因子、グリア細胞繊維性酸性タンパク質、IL-6、TNF- α) を
22 行った。対照群には空気を吸入させた (各群 5 匹)。その結果、O₃ 曝露群では孤束核、腹
23 側外側髄質及び中心管領域の星状グリア細胞において、細胞傷害修復因子の一つである
24 VEGF 陽性細胞密度の増加、突起長の延長が認められ、その影響は、O₃ 曝露終了から 3 時
25 間後にも認められた。さらに、VEGF の発現細胞では、TNF- α 、IL-6 の発現も認められた。
26 以上 の結果から、O₃ 曝露で生じた脳組織傷害の修復に VEGF が関与することが示唆され
27 た。

28
29 Martinez-Canabal *et al.* (2008)は、O₃ 曝露による海馬変性における COX-2 発現への成長ホ
30 ルモンの効果を検討するため、雄の Wistar ラットに 0.25 ppm の O₃ を 4 時間/日で 7、15、
31 30 日間、全身吸入曝露させ、各々半数のラットに毎日 O₃ 曝露後、0.08 U の成長ホルモン
32 を皮下投与した。対照群には空気を曝露させた (各群 10 匹、計 70 匹)。曝露終了後、ラッ
33 トを屠殺し、海馬における脂質過酸化レベル、COX-2 発現細胞数を指標として海馬細胞の
34 酸化ストレス傷害への影響を検討した結果、全ての O₃ 曝露群で、脂質過酸化レベル及び
35 COX-2 陽性細胞数が対照群と比較して増大していた。O₃ 及び成長ホルモンに 7、15 日間曝
36 露させた群では、O₃ 単独曝露群と比較し、COX-2 陽性細胞数が減少した。以上 の結果か

1 ら、成長ホルモンは酸化ストレスに起因する傷害に対する防御となり得ることが示された。

2
3 Guevara-Guzman *et al.* (2009)は、卵巣を摘出した交尾前の雌の Wistar ラット成獣に 0.25
4 ppm の O₃ を 4 時間/日で 30、60 日間、あるいは空気を 30 日間、全身吸入曝露させ、各々
5 半分のマウスに対し、毎日曝露 2 時間後に 25 µg/kg の 17β-エストラジオールを筋肉注射し
6 た (各群 30 匹、計 180 匹)。曝露終了から 2 日間の訓練後、社会的認知記憶試験、嗅覚認
7 知試験を行い、その後、脳を取り出し、嗅球における過酸化脂質レベル、エストロゲン受
8 容体発現、ドーパミン β ヒドロキシラーゼ陽性線維について調べた。O₃ の 30、60 日曝露
9 により社会的認知に関する記憶が低下し、O₃ の 60 日間曝露により嗅覚認知力が低下した
10 が、17β-エストラジオールを同時投与することにより、いずれも回復傾向が認められた。
11 また、O₃ の 30、60 日間曝露により、嗅球において過酸化脂質量の顕著な増加、免疫組織
12 化学染色による α、β エストロゲン受容体陽性細胞数、α、β エストロゲン受容体発現、ド
13 ーパミン β ヒドロキシラーゼ陽性線維の減少が認められたが、いずれも 17β-エストラジ
14 ールの同時投与により回復した。

15
16 Rivas-Arancibia *et al.* (2010)は、低用量 O₃ の慢性的な曝露によって引き起こされる酸化ス
17 トレスが、海馬において進行性の神経変性を引き起こし、脳可塑性の喪失につながる可能
18 性について検証した。Wistar ラット (雄、n=6-10) を 0.25 ppm の O₃ に 4 時間/日で 15~90
19 日曝露させ、海馬における過酸化脂質レベル、核および細胞質の形態変化、ニューロンの
20 形態変化を評価した。ラット海馬歯状回において、15 日以上 の O₃ 曝露は脂質過酸化を引
21 き起こし、p53 陽性細胞を増加させるとともに、活性化ミクログリアを増加させた。30 日
22 以上 の O₃ 曝露では、アストロサイトが増加した。また、90 日間の O₃ 曝露は、海馬歯状
23 回における Neu-N (成熟ニューロンマーカー) 陽性細胞とダブルコルチン (未成熟ニュー
24 ロンマーカー) 陽性細胞を減少させた。受動的回避試験では、15 日以上 の O₃ 曝露で、短
25 期記憶、長期記憶ともに低下が認められた。これらの変化は、低用量の O₃ によって引き起
26 こされる酸化的ストレスが、炎症過程の調節不全、進行性神経変性、海馬における脳修復
27 の慢性喪失、およびアルツハイマー病に類似したラットの脳可塑性変化を引き起こすこと
28 を示唆している。

29
30 Gackiere *et al.* (2011)は、O₃ の吸入曝露によるニューロン活性化が迷走神経を介して引き
31 起こされているかどうかを調べた。Wistar ラット (雄、5~6 週齢、n=1~10) にチャンバー
32 で 0.5 または 2.0 ppm の O₃ を 1.5~120 時間曝露させ、BALF 中の成分測定および孤束核切
33 片の免疫染色を行った。肺胞洗浄液中の白血球数は最長 120 時間の O₃ 曝露により増加して
34 おり、増加の度合いは 0.5 ppm 曝露群よりも 2.0 ppm 曝露群のほうが大きかった。O₃ 曝露
35 により、孤束核(NTS)、特に肺から走る求心性迷走神経の終末領域と重なる背側領域
36 (dorsolateral regions)において、c-Fos および Fos-B の発現レベルが増加した。また、増加の

1 度合いは 0.5ppm 曝露群よりも 2.0ppm 曝露群のほうが大きかった。脊髄においては c-Fos
2 陽性細胞は検出されず、胸部脊髄経路は O₃ 曝露の影響の伝達に関与していないことが示さ
3 れた。孤束核におけるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) と c-Fos の共免疫標識では、TH
4 陽性神経細胞のうち 19±4%以上 が c-Fos 陽性であり、NTS カテコールアミン作動性ニュー
5 ーロンの一定割合が O₃ 曝露によって活性化されたことが示唆された。これらの結果は、
6 O₃ 曝露が、迷走神経を介して孤束核におけるニューロンの活性化を誘発すること、CNS
7 のストレス応答領域におけるニューロン活性化を促進する肺炎症を引き起こすことを示唆
8 している。

9
10 *Rodríguez-Martínez et al. (2013)* オゾンに慢性的に曝露されたラットの海馬において、慢性
11 的な酸化ストレスがミトコンドリア機能に及ぼす影響と進行する神経変性との関係を分析
12 した。Wistar ラットに 0.25ppm オゾンを 1 日 4 時間で 7, 15, 30, 60 日曝露した。各群に
13 ついて、タンパク質の酸化および酸化還元ストレス関連酵素の活性、ミトコンドリアの構
14 造を調べた。オゾン曝露 30 日目では、カルボニルタンパク質と Mn-SOD 活性が増加し、
15 GPx 活性が低下した。SDH 活性は曝露 7 日目から 60 日目まで減少した。酸素消費量は 60
16 日目に減少した。ウェスタンブロッティングにより、オゾン曝露 60 日目にチトクローム c
17 が増加し、オゾン曝露 60 日目までは iNOS が増加していた。PGC-1 α の発現は、15 日、30
18 日、60 日後にそれ以前と比べて減少した。Bcl-2 は、60 日後に、それ以前と比べて増加し、
19 Bax は、30 日、60 日後に、それ以前と比べて増加した。また、60 日後の曝露では、細胞
20 の損傷、ミトコンドリアのクリスタの消失を伴うミトコンドリアの膨潤が観察された。こ
21 れらの変化は、低用量のオゾンがミトコンドリアの異常を引き起こし、それが細胞の損傷
22 につながる可能性を示唆している。

23
24 *Win-Shwe et al. (2013)* は、二次有機エアロゾル (SOA) の急性曝露がマウスの脳と肺の
25 様々なバイオマーカーの発現レベルに及ぼす影響を調査した。ディーゼル排気粒子 (DEP)
26 と O₃ を反応させ SOA を生成し、8 週齢の雄の BALB/c マウスに DEP、または DEP + O₃
27 (SOA)(50 μ g/50 μ L/マウス) を鼻腔内投与した。SOA の急性単回曝露の 24 時間後に、すべて
28 のマウスから嗅球、海馬、および肺を採取し、神経学的および免疫学的バイオマーカーの
29 mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 解析と病理組織学的検査により調べた。SOA に曝露さ
30 れたマウスの肺では炎症誘発性サイトカイン、それらの転写因子と”ニューロト’フィン
31 mRNA が著しく増加したが、脳では増加しなかった。嗅球、海馬、肺の病理組織学的検査
32 の結果、SOA に曝露されたマウスの脳、肺で変化はみられなかった。マイクロアレイのデ
33 ータでは、炎症反応と代謝酵素遺伝子クラスターの変化が脳と肺で観察されたことを示さ
34 れた。以上の結果から著者らは、SOA の急性単回曝露が健全な個体の脳内のバイオマー
35 カーに影響を与えないことを示唆した。また、SOA が炎症誘発性サイトカイン、転写因子
36 と炎症性応答性ニューロトロフィンを調節することにより、肺の炎症反応を誘発すること

1 も明確に示しているとした。

2

3 Gómez-Crisóstomo *et al.* (2014)は、酸化シグナルによって活性化され、細胞の増殖や
4 酸化ストレスに対する耐性を制御している Forkhead box O (FoxO) ファミリーの転写因子
5 について、ラットの海馬におけるオゾン慢性曝露の影響を調べた。雄の Wistar ラットに、
6 空気または 0.25 ppm O₃ を 1 日 4 時間、0、7、15、30、60、または 90 日間曝露した。処置
7 後、各群は FoxO 3a、Mn SOD、サイクリン D2、FoxO 1a、活性型カスパーゼ 3 に対するウ
8 ェスタンブロットングと免疫組織化学の処理を行った。オゾン曝露により、30 日目と 60
9 日目に FoxO 3a の活性化が増加し、すべての処理時間で Mn SOD の発現が増加した。さら
10 に、曝露 7 日目から 90 日目までのサイクリン D2、15 日目、30 日目、60 日目の FoxO 1a、
11 曝露 30 日目から 60 日目までの活性化カスパーゼ 3 の増加が認められた。これらの結果は、
12 オゾンが抗酸化システムと細胞周期の両方に関連する制御経路を変化させ、神経細胞の細
13 胞周期へのニューロンの再突入とアポトーシスを誘発することを示唆している。

14

15 Gonzalez-Guevara *et al.* (2014)は、O₃ が呼吸器系以外の組織に影響を与える炎症のメカニ
16 ズムを特徴づけるために、肺と脳の両方において炎症性因子を評価した。1 ppm の O₃ に 1、
17 3、6 時間曝露したラット、同様に 5 日間にわたり毎日 1 時間または 3 時間曝露したラット
18 は、肺において TNF- α および IL-6 レベルの増加を示し、同様に大脳皮質における TNF- α 、
19 IL-6、NF- κ Bp50 および GFAP 量も増加した。これらの結果は、神経炎症反応が中枢神経
20 系への O₃ 曝露の影響の原因かもしれないという仮説を支持する。

21

22 Akhter *et al.* (2015)は、アルツハイマー病 (AD) 発症の原因を明らかにするため、O₃ 曝
23 露による中枢神経におけるアミロイド β ペプチド (A β) 産生への影響と酸化ストレスにつ
24 いて調べた。6 週齢の雄と雌のアミロイドベータ前駆体タンパク質 (APP) /プレセニリン
25 (PS1) 過剰発現 (APP/PS1) マウスと非遺伝子組換えマウスに、空気または 0.8 ppm O₃
26 を 1 日 7 時間日、5 日間曝露、9 日間休憩の順で 8 サイクル曝露した。雄の APP/PS1 マウ
27 スでは学習・記憶機能の低下が加速するが、雌の APP/PS1 マウスや非遺伝子組換えマウス
28 では加速しないことを明らかにした。雌の APP/PS1 マウスは、雄の APP/PS1 マウスと比較
29 して、脳内のアミロイド β ペプチド (A β 42) および A β 40 の濃度が高かったが、O₃ 曝露は
30 雄雌ともに脳内の A β 産生には影響を及ぼさなかった。さらに、雄の APP/PS1 マウスは、
31 雌の APP/PS1 マウスに比べて、抗酸化物質 (グルタチオンおよびアスコルビン酸) のレベ
32 ルが低く、O₃ 曝露により NADPH オキシダーゼの誘導、脂質過酸化、神経細胞のアポトー
33 シスが增大することがわかった。非遺伝子組換えマウスでは、これらのパラメータに対す
34 る O₃ の影響は認められなかった。さらに *in vitro* の研究では、O₃ に曝露された雄 APP/PS1
35 マウスの血漿および大脳皮質/海馬で増加した脂質過酸化産物である 4-ヒドロキシノネナ
36 ールが、神経芽細胞のアポトーシスを誘導した。O₃ 曝露だけでは AD は発症しないが、遺

1 伝的なリスク因子と相乗効果を発揮して、遺伝的に素因のある集団ではADの病態生理を
2 加速させる可能性があることが示唆された。また、男性は女性に比べて抗酸化物質のレベ
3 ルが低いため、O₃による神経病理生理学的な影響を受けやすいことも示唆された。

4
5 Chounlamountry *et al.*(2015)は、O₃曝露がラットの肺迷走神経求心路の終末野における孤
6 束神経路(NTS)領域において神経細胞を活性化させること、星状細胞におけるタンパク
7 質発現に影響を及ぼし得ることが報告されていることから、O₃の吸入曝露がNTSにおけ
8 るアストログリア細胞の変化を引き起こすかどうかを調べた。Wistarラット(雄、6~7週
9 齢、n=4-5/群)に2ppmのO₃を24または72時間曝露させた後、孤束核領域における影
10 響について免疫染色及び電子顕微鏡により観察した。O₃曝露により孤束核のグルタミン酸
11 作動性シナプスのアストログリア被覆率は19%増加したが、アストログリア体積率と膜密
12 度は変化しなかった。また、孤束核において、反応性アストログリアにおいて増加するこ
13 とが知られているグリア線維性酸性タンパク質およびS100βの発現は変化しなかった。こ
14 れらの結果は、O₃誘発性のニューロン障害は、非特異的な脳全体の変化(アストログリ
15 ア活性化)により生じるのではなく、肺の炎症に応答して迷走神経特異的にグリア細胞の
16 可塑性を変化させることを示唆している。

17
18 Hernandez-Zimbron *et al.* (2015)は、低用量のオゾンに慢性的にさらされた場合に起こる神
19 経変性プロセスやオルガネラの損傷に関するメカニズムについて調べた。オゾンに慢性曝
20 露したラットの海馬神経細胞のミトコンドリアにおけるβA42およびβA40ペプチドの産
21 生・蓄積量の変化に及ぼすオゾンの慢性曝露の影響を解析するために、雄のWistarラット
22 に、ろ過空気または0.25ppm O₃を1日4時間、7、15、30、60、90日間曝露し、Presenilins
23 1および2とADAM10のミトコンドリア発現レベルを調べた。オゾン曝露60日目と90日
24 目に、ミトコンドリア画分にβA42ペプチドが蓄積するとともに、βアミロイド1-40の蓄
25 積量が減少し、Pres2が過剰発現し、ADAM10の発現量が減少した。βアミロイドの免疫
26 検査では、細胞内にβA42の沈着が見られ、βA42とミトコンドリアマーカーであるOPA1
27 およびCOX1が共在していた。以上の結果から、オゾンに曝された時間とラットの海馬
28 細胞のミトコンドリアへのβA42の蓄積は相関していることがわかった。また、βA42ペプ
29 チドの蓄積や過剰生産により、ミトコンドリアの機能障害が促進される可能性が示唆され
30 た。

31
32 Mokoena *et al.* (2015)は、うつ病は大気汚染との関連を評価するため、オゾンの慢性吸入
33 がうつ病および不安関連行動、認知機能、酸化ストレスの脳内マーカーに及ぼす影響を調
34 べた。また、抗酸化物質のメラトニン、抗うつ薬のデシプラミンやエスシタロプラムに対
35 する反応を評価した。雄のFlinders Sensitive LineラットとFlinders Resistant Lineラットに、
36 空気または0.3ppm O₃を1日4時間、15日間曝露し、同時に生理食塩水または上記の薬剤

1 を投与した。オゾンを経時的に吸入することにより、記憶障害、不安や抑うつ様症状が誘
2 発され、皮質や海馬のスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼの活性が低下し、う
3 つ病で指摘されるような中枢性モノアミンレベルの低下が見られた。さらに、メラトニン、
4 デシプラミン、エスシタロプラムの行動および神経化学的作用は、オゾンの存在下でほと
5 んど減弱した。高レベルの酸化ストレスにさらされた遺伝的に感受性の高い個体は、気分
6 障害や不安障害を発症するリスクが高く、より大きな酸化還元バランスの乱れと行動の変
7 化を示す。また、これらの動物は、現代の抗うつ剤治療に対してより耐性がある。本研究
8 で用いたモデルは、うつ病の神経細胞の酸化ストレス、抗うつ薬の作用、神経細胞の酸化
9 ストレスを防ぐメカニズムの研究に適している。

10
11 Rivas-Arancibia *et al.* (2015)は、パーキンソン病の発症において酸化ストレスが大きく関
12 与していることが示唆されていることから、低用量のオゾン曝露による慢性的な酸化スト
13 レスにより、黒質のグリアの変化を伴う進行性の細胞死が誘発されるかどうかを調べた。
14 雄の Wistar ラットに、空気または 0.25 ppm オゾンを 1 日 4 時間、7, 15, 30, 60, 90 日間
15 曝露した。曝露 2 時間後に、(1)分光光度計によるタンパク質酸化の分析、(2)ウエスタンブ
16 ロットによるミクログリアの反応性と核内因子カプパ B の発現レベルの検査、(3)免疫組織
17 化学によるチトクローム c, GFAP, Iba-1, NFkB, COX-2 の検査を行った。オゾンは黒質
18 におけるタンパク質酸化レベルの上昇、活性化したアストロサイトやミクログリアの変化、
19 細胞死を誘導することがわかった。NFkB とチトクローム c は曝露 30 日まで、シクロオキ
20 シゲナーゼ 2 は曝露 7 日から 90 日までの間、黒質で増加した。これらの結果は、オゾン
21 曝露による酸化ストレスが、ラットの黒質における炎症反応の変化と進行性の細胞死を誘
22 発することを示唆しており、これはパーキンソン病でも同様に起こっている可能性がある。

23
24 Hernandez-Zimbron *et al.* (2016)は、酸化ストレスがアルツハイマー病の危険因子であり
25 A42 ペプチドの過剰生産に先立って酸化損傷が生じること、オゾンが酸化ストレスを引き
26 起こしラットの脳で神経変性を誘発すること、A42 はミトコンドリアや小胞体などのオル
27 ガネラで産生・蓄積され細胞の代謝に影響を与えると考えられていることから、オゾン暴
28 露が小胞体における A42 の過剰生産や蓄積を誘導するかを調べた。雄の Wistar ラットに、
29 空気または 0.25ppm オゾンを 1 日 4 時間、7, 15, 30, 60, 90 日間曝露し、曝露 2 時間後
30 に海馬細胞の小胞体を解析した。小胞体中の A42 の存在が及ぼす影響を、シャペロンであ
31 るシンタリン 5 の発現により評価した。曝露 60 日目および 90 日目のラットの海馬細胞の
32 小胞体画分において A42 ペプチド増加が観察された。また、投与 60 日目および 90 日目
33 では、シャペロンであるシンタリン 5 の過剰発現が観察された。これらの結果は、環境汚染
34 物質への曝露が神経変性プロセスのリスクファクターとして関与している可能性を示して
35 いる。

1 Mumaw *et al.* (2016)は、大気汚染は神経変性疾患のリスクと進行、およびミクログリアの
2 活性化に関係していることが知られているが、そのメカニズムはよく分かっていないこと
3 から、この研究では、ラットの O₃ への曝露後 24 時間においてミクログリアが活性を保っ
4 ていたことから、肺から脳への持続的な伝達があることが示唆された。①8 週齢の雄の
5 Sprague-Dawley ラットに 1ppm の O₃ を 4 時間吸入曝露させ、曝露後 24 時間後に脳組織と
6 全血を採取した。また 8 週齢/18 週齢の雄の C57BL/6 マウスに 300mg/m³ の mixed vehicle
7 exhaust (MVE)を吸入曝露させ、最終曝露の 24 時間後に脳組織を採取した。その後、RT-PCR
8 と免疫組織化学的評価、ELISA、H₂O₂ 産生、NO 産生、細胞活性について評価した。②Fisher
9 344 ラット胎児から培養した初代培養ミクログリア細胞を O₃ 曝露ラット血清で処理し、
10 TNF α および H₂O₂ の産生、細胞増殖について評価した。O₃ 曝露ラットではミクログリア
11 の活性化が認められ、曝露 24 時間後においても形態学的な変化が持続していた。初代培養
12 ミクログリアを用いた解析では、LPS 処理で誘発された TNF- α 産生、H₂O₂ 産生、細胞増
13 殖活性化が O₃ 曝露ラットの血清処理により増強された。ベータアミロイド 42 処理による
14 H₂O₂ の産生の増加、細胞増殖活性の低下についても、O₃ 曝露ラットの血清処理により影
15 響が大きくなった。LPS 処理および O₃ 曝露ラット血清処理によるミクログリアの TNF- α
16 産生増加は、macrophage-1 antigen (MAC1) 受容体を阻害する抗体処理により抑制された。
17 MVE 曝露は 8 週齢の若齢マウスでは BALF 中の総細胞数や好中球数、肺における
18 lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)を増加させたが、18 ヶ月齢の高齢マウスでは
19 これらの増加はみられなかった。脳においては、若齢マウスと比較して、高齢マウスでは
20 O₃ 曝露による TNF- α mRNA の発現増加と、ミクログリアの形態変化が認められた。また、
21 海馬から調整した混合培養グリア細胞の LPS に対する TNF- α 産生は、O₃ 曝露ラットの血
22 清処理により増加したが、増加度合いは高齢ラットでより大きかった。CD36(-/-)マウスに
23 おいても O₃ 曝露により脳組織における TNF- α および IL-1 β mRNA が増加し、ミクログリ
24 アの形態学的変化が認められたが、CD36(+/+)マウスでは変化はみられなかった。これらの
25 結果は 肺-脳軸についての概観を説明するものであり、大気汚染物質の曝露によりサイト
26 カイン非依存性の循環シグナルが生じ、肺での応答と協調して脳の炎症を増強させること、
27 またこの影響は年齢とともに増強することを示している。

28

29 Rodríguez-Martínez *et al.* (2016)は、中枢神経系における酸化ストレスが小胞体ストレスを
30 生じさせること、アルツハイマー病などの疾患において小胞体が重要な役割を果たしてい
31 るタンパク質のフォールディングの乱れを生じさせることから、慢性的な酸化ストレスが
32 ER ストレスに与える影響と、アポトーシスとの関係性を評価した。雄の Wistar ラットに、
33 空気または 0.25 ppm O₃ を、1 日 4 時間、7、15、30、60、または 90 日間曝露した。曝露 2
34 時間後にラットを屠殺し、海馬を摘出した後、ウェスタンブロットおよび免疫組織染色を
35 行った。また、TUNEL アッセイと電子顕微鏡検査を行った。オゾンに 60 日および 90 日
36 曝露したラットの海馬では、ATF6、GRP78、カスパーゼ 12 が増加し、ER の超微細構造の

1 変化や TUNEL 陽性細胞の増加が見られた。低濃度オゾン慢性曝露によって引き起こされる
2 酸化ストレスは、小胞体ストレスを引き起こすと考えられた。小胞体ストレスは、ATF6
3 を活性化させ、細胞質内の GRP78 の増加を誘発し、ATF6 の核内転位を増加させる。その
4 結果、ATF6 の核内移行が促進され、アポトーシスによる細胞死のカスケードが活性化さ
5 れるといふ悪循環に陥り、小胞体ストレスが持続すると考えられた。

6
7 Rivas-Arancibia *et al.* (2017)は、低用量のオゾンに曝露したラットの海馬の歯状回におい
8 て、アミロイド β 1-42 ($A\beta$ 1-42) の二次ペプチド構造の変化に対する酸化ストレスの影響
9 を調べた。雄の Wistar ラットに、オゾンを含まない空気(対照群)と 0.25 ppm オゾンを、
10 1日4時間、7、15、30、60、90日間曝露した。サンプルは以下の方法で調査した。(1)ラ
11 マン分光法を用いて、 α ヘリックスと β シートの二次構造を持つペプチドのグローバルな
12 コンフォメーション変化を、アミド I バンドのデコンボリューションプロファイルに従っ
13 て検出する。(2) $A\beta$ 1-42 に対する免疫組織化学を行う。アミド I バンドのデコンボリューシ
14 ョン画像処理の結果から、オゾンに曝露されると、 α -helix 二次構造の存在率が徐々に低下
15 することがわかった。さらに、 β シート二次構造はその存在率が増加した。また、オゾン
16 曝露 60 日後には、 $A\beta$ 1-42 ペプチド標準品と同様の波数の β シートバンドが確認された。
17 免疫組織化学検査では、 $A\beta$ 1-42 の免疫反応が増加し、60 日および 90 日後の $A\beta$ 1-42 のラ
18 マンスペクトルで観察されたコンフォメーション変化と一致した。酸化ストレスは、歯状
19 回におけるアミロイド β ペプチド構造の折り畳み過程に変化をもたらし、最終的な β シー
20 ト構造へのコンフォメーション変化をもたらす。これは、アルツハイマー病 (AD) 患者の
21 脳で起こるものと同様に、 $A\beta$ 1-42 の発現の増加に関連している。

22
23 Tyler *et al.* (2018)は、血液脳関門 (BBB) の透過性が高まることで神経炎症を起こしやす
24 くなると考えられる高齢マウスを用いて、オゾン (O_3) の急性曝露による神経学的影響を
25 調べた。8~10 週齢および 12~18 ヶ月齢の雄の C57BL/6 雄マウスに、ろ過空気または 1.0
26 ppm のオゾンに 4 時間曝露した後、曝露の 20 時間後にフルオレセインナトリウム (FSCN)
27 を投与した。FSCN 投与した動物を 1 時間後に灌流し、BBB の透過性を免疫組織化学的に
28 分析した。B-アミロイドタンパクの発現は ELISA で評価した。好中球、マクロファージ、
29 ミクログリアを含む浸潤免疫細胞のフローサイトメトリーによる解析は、 O_3 曝露の 20 時
30 間後に行った。フローサイトメトリー分析では、成体マウスに比べて高齢マウスにおいて、
31 ミクログリアの活性化と CD11b、F4/80、MHCII の提示が増加しており、これらの加齢に
32 よる違いは急性 O_3 曝露によって増強された。老齢マウスの脳皮質および辺縁系領域では、
33 O_3 曝露後に反応性ミクログリアが増加し、 β -アミロイドタンパク質の発現が増加した。老
34 齢マウスの小脳では、 O_3 曝露後に浸潤性好中球、末梢性マクロファージ/単球、Ly6C+炎症
35 性単球が増加したが、成体マウスの小脳では増加は見られなかった。 O_3 曝露は、BBB を越
36 えた FSCN の浸透、末梢免疫細胞の浸潤、ミクログリアの反応性グリオシスを増加させた。

1 高齢マウスの BBB は刺激に対して脆弱であり、O₃ 曝露に応じて高い浸透性を示すように
2 なり、より大きな神経炎症に繋がる。

3 4 1.5. 変異原性・遺伝子傷害性及び発がん影響に関する知見

5 Bermudez *et al.* (1999)は、Sprague-Dawley ラットの雄 3 月齢 (390-410g) に O₃ と NO₂ を
6 吸入曝露した。3 日連続曝露を行った。O₃ の曝露濃度は 0.3 ppm (588 μg/m³)、NO₂ の曝露
7 濃度は 1.2 ppm (2,256 μg/m³) とした。曝露群の構成を①空気を曝露した対照群、②NO₂
8 曝露群、③O₃ 曝露群、④NO₂+O₃ 曝露群の 4 群 (1 群 4 匹) とした。観察を行った健康影
9 響指標は BAL 細胞数、タンパク量、LDH 及び DNA 鎖切断を観察し、急性曝露の影響につ
10 いて検討した。曝露後に回収した BAL 中の細胞から抽出 (ポリカーボネートフィルターか
11 らのアルカリ溶出法) した DNA 鎖切断は、NO₂ 単独で曝露した群では対照群と差がなく、
12 NO₂ と O₃ との複合曝露では、対照群と比較して増加した。

13
14 Witschi *et al.* (1999)は、雌の A/J マウスに 0.12、0.5、1.0 ppm の O₃ 又は清浄空気を 6 時
15 間/日、5 日/週で吸入曝露させた。各濃度の O₃ に曝露されるマウスを更に 5 ヶ月間 O₃ 曝露、
16 9 ヶ月間 O₃ 曝露、5 ヶ月間の O₃ 曝露の後、4 ヶ月間清浄空気曝露による回復の 3 群に分割
17 した。曝露期間又は回復期間の終了後、マウスを屠殺し、O₃ の慢性影響として肺における
18 腫瘍を観察した。O₃ への曝露は、いずれの濃度においても、清浄空気のみでの曝露と比較し
19 て肺腫瘍発生率、平均腫瘍数への影響を及ぼさなかった。O₃ は 1.0 ppm 以下のレベルでは
20 A/J マウスの肺に対する発がん性はなく、また、A/J マウスは O₃ の慢性毒性に対する耐性
21 が認められると結論された。

22
23 Bermudez (2001)は、月齢 3 か月の雄の Sprague-Dawley ラットに 1.2 ppm (2256 μg/m³) の
24 NO₂、0.3 ppm (588 μg/m³) の O₃ を単独あるいは複合で、3 日間連続吸入曝露させた。ラッ
25 トは O₃ 曝露群、NO₂ 曝露群、O₃+NO₂ 曝露群及びろ過空気曝露の対照群にそれぞれ 4 匹ず
26 つとした。曝露終了後、ラットを安楽死させて BALF を採取し、肺細胞の DNA 傷害につ
27 いて評価するため、ポリ ADP リボース合成酵素活性を測定した結果、対照群と比較して、
28 O₃ を単独で曝露した群では、25%の酵素活性増加がみられ、O₃ と NO₂ を複合曝露した群で
29 は、53%の酵素活性増加がみられた。これは、オキシダントによって生じた DNA 傷害に反
30 応した修復を反映していると結論している。

31
32 Kim *et al.* (2001)は、雌雄の B6C3F1 マウスに 0.5 ppm の O₃ 又はろ過空気を 6 時間/日、5
33 日/週で 12 週間全身吸入曝露させ、週 1 回体重を測定した。曝露終了後には、肺、心臓、
34 腎臓、肝臓、脾臓、卵巣、精巣の絶対重量、相対重量の測定、肺、気管、心臓、脳、腎臓、
35 副腎、肝臓、胸腺、脾臓、すい臓、子宮、卵巣、精巣の病理組織学的検索を実施した。体
36 重については、雌雄の曝露群で減少したが、雌では統計学的に有意ではなかった。肝臓、

1 心臓（雌のみ）、腎臓、脾臓、卵巣、精巣の絶対重量、相対重量は、O₃ 曝露群が対照群より
2 りも低かった。大部分の臓器では O₃ 曝露による腫瘍の発生増加は認められなかったが、雌
3 の曝露群の 10 匹中 3 匹に卵管腫瘍が認められた。

4
5 Bornholdt *et al.* (2002)は、雌の BALB/c マウスに 1、2 ppm の O₃、又は対照として環境大
6 気を 90 分間吸入曝露させた。曝露終了後、20～1,400 分間の回復期間において屠殺し、心
7 臓から血液を採取し、血清中の酸化タンパク質について分析した。血液採取後、BALF を
8 採取し、コメットアッセイ、細胞の特定を行うと共に、肺組織中の 8-oxo-dG、サイトカイン
9 mRNA、ERCC-1 (excision repair cross-complementing-1) mRNA を測定した。コメット
10 アッセイの結果、O₃ 曝露後 200 分以内は DNA 鎖切断の指標となる BALF 細胞の tail moment
11 が対照群よりも増加したが、200 分以上では影響はみられなかった。曝露による 8-oxo-dG、
12 ERCC-1 mRNA への影響はみられなかったが、IL-6 mRNA の誘導は認められた。O₃ 曝露に
13 おける変異原性の有無を定めるため、雌の MutaTM マウスに 2 ppm の O₃ を 90 分/日で 5 日
14 間曝露させた結果、変異原性は認められなかった。以上の結果から、短期の O₃ 曝露によ
15 って DNA 鎖切断と炎症メディエーターが誘導されたが、肺組織遺伝子の変異として検出
16 されるものではなかった。

17
18 Jorge *et al.* (2002)は、ヒトの細胞を用いて O₃ の変異原性について評価した。20 ppm の
19 O₃ に 10～60 分曝露させたプラスミド DNA を 293-KMT11 細胞に導入して増幅し、シーク
20 エンス解析により DNA の変異、切断、置換を評価した。ヒト細胞における突然変異スペ
21 クトルを解析したところ、O₃ が強力な変異原性を有していると考えられた。また、シーク
22 エンス解析により、O₃ 曝露は G: Cs に位置する塩基置換を引き起こすこと、O₃ による二本
23 鎖 DNA の切断は部分的にヒドロキシルラジカルによって媒介されていることが示唆され
24 た。

25
26 Cheng *et al.* (2003)は、コメットアッセイおよびフローサイトメトリーを用いて、低濃度
27 の O₃ に曝露された A549 細胞における DNA 損傷を調べた。A549 細胞を 0, 60, 80, 120ppb
28 の O₃ に 1 時間曝露し、単細胞ゲル電気泳動（コメットアッセイ）およびフローサイトメ
29 リーを用いて、DNA 一本鎖切断および 8-オキソグアニンレベルを測定した。さらに、
30 ホルムアミドピリミジングリコシラーゼ (Fpg) 修復酵素をコメットアッセイに加えて
31 酸化的損傷の検出力を高めた。また、ビタミン C とビタミン E も O₃ 曝露による 8-オキソ
32 グアニン誘発抑制効果を決定するために加えられた。O₃ 曝露濃度の上昇に伴い、細胞生存
33 率は低下した。コメットアッセイでは、Fpg 酵素なしでは、80ppb 以上の濃度でテールモ
34 ーメントが増加した。Fpg 酵素添加では、60ppb 以上でテールモーメントの増強、80ppb
35 以上でテール強度の増強、120ppb 以上でテール長の増加が認められた。フローサイトメ
36 トリーによる測定では、8-oxoguanine レベルが 80ppb 以上の O₃ 曝露によって上昇し、こ

1 の上昇は、ビタミン C および E による前処理により抑制された。これらの結果は、比較
2 的低濃度の O₃ 曝露により DNA 切断と酸化的 DNA 損傷が生じることを示唆している。

3
4 Hoogervorst *et al.* (2003)は、O₃ などの曝露による肺細胞増殖の誘発と組み合わせてベンゾ
5 [a]ピレン (B [a] P) などの多環芳香族炭化水素 (PAH) に曝露されると肺腫瘍発生のリス
6 クが高まることが懸念されていることから、この懸念について、野生型 (WT) C57BL/6
7 マウス、高発がんヌクレオチド除去修復欠損系統である A 型色素性乾皮症マウス (Xpa^{-/-})、
8 およびさらに高感受性の Xpa^{-/-}/p53^{+/-}マウスを用いて検討した。亜慢性試験では、6-9 週齡
9 の雄および雌の WT、Xpa^{-/-}および Xpa^{-/-}/p53^{+/-}マウスに対して B [a] P を含む餌を与える
10 とともに週に 1 回、0.8ppm の O₃ を 8 時間曝露させ、13 週間飼育した。慢性試験では 13
11 週間の飼育後に、対照飼料およびろ過空気条件下で 6 か月間飼育した。B [a] P の経口曝露
12 は、WT マウスと比較して、Xpa^{-/-}および Xpa^{-/-} p53^{+/-}マウスに対しては発がん性が高か
13 った。がん種としては、前胃腫瘍と食道がんの高い発生率が認められた。B [a] P 曝露はま
14 た、肺において BPDE-DNA 付加体の形成を引き起こし、遺伝毒性効果が認められた。し
15 かしながら O₃ 曝露による細胞増殖の誘導は、高感度 Xpa^{-/-}および Xpa^{-/-} p53^{+/-}マウスに
16 おいて、B [a] P 曝露による肺腫瘍の発生、lacZ 変異、DNA 付加体の形成については増加
17 を引き起こさなかった。以上 の結果より、C57BL/6 マウスへの B [a] P 経口投与は前胃腫
18 瘍および食道がんを形成する。しかしながら O₃ 曝露は B [a] P 投与による肺がんの誘発に
19 は寄与しなかった。

20
21 Kim *et al.*(2004)は、4-(N-methyl-Nnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)や dibutyl
22 phthalate (DBP)などの変異原性物質と O₃ の交互作用を、hprt 突然変異試験によって調べた。
23 B6C3F1 マウス (雌雄、5-6 週齡、n=5/群) を 0.5 ppm O₃、1.0 mg/kg NNK、5,000 ppm DBP
24 に単独または複合で 6 時間/日、32 週間または 52 週間曝露し、リンパ球変異および hprt 遺
25 伝子変異を解析した。O₃ 曝露は脾臓細胞における hprt 遺伝子の突然変異頻度を増加させた。
26 変異頻度は単独曝露よりも NNK および DBP との複合曝露で大きく、また 32 週齡マウス
27 よりも 52 週齡マウスでより大きかった。hprt 遺伝子において最も多くみられた特異変異型
28 は transversion であり、transition はわずかだった。これらの結果は、O₃ 単独曝露よりも
29 NNK、DBP との複合曝露で遺伝毒性が増強されること、またその増強は transversion 変異
30 が起きやすくなることで生じていることを示唆している。

31
32 Kim and Cho (2009a)は、5~6 週齡の雌雄の B6C3F1 マウスに 0.50±0.02 ppm の O₃ を 6 時
33 間/日、5 日/週で 1 年間吸入曝露させた。O₃ と喫煙や内分泌かく乱作用を有する物質など
34 との複合曝露による発がん促進作用の有無を検討するため、1.0 mg/kg-体重の NNK 週 3 回
35 皮下投与、飼料中 5000 ppm の DBP (dibutyl phthalate) 投与を行った。これにより、マウ
36 スは無処置対照群、O₃ 群 (O₃ 吸入曝露のみ)、NNK 群 (NNK 皮下投与のみ)、DBP 群 (DBP

(案)

1 給餌投与のみ)、O₃+NNK 群、O₃+DBP 群、O₃+NNK+DBP 群に分けられる(各群 20 匹)。
2 曝露によって死亡したマウスはいなかったが、曝露期間中、O₃+NNK+DBP 群で体重抑制
3 がみられた。曝露終了後、肺、その他の器官における腫瘍を観察した結果、O₃ 群では腫瘍
4 発生はなく、雄の NNK 群の 20%、O₃+NNK 群の 10%、雌の O₃+NNK+DBP 群の 10%に
5 おいて肺腫瘍(腺がん)が認められた。卵管腫瘍については、DBP 群の 10%、O₃+NNK
6 +DBP 群の 10%において認められた。以上の結果から、O₃ 単独で発がん性は認められず、
7 また発がん促進作用を疑わせる知見は得られなかった。

8

9 Zhang *et al.*(2017)は、一酸化窒素(NO)が、一酸化窒素合成酵素(NOS)によってL-ア
10 ルギニンからつくられる重要な細胞シグナル伝達分子であり、肺損傷におけるNOSシグナ
11 ル伝達の効果は相克していることから、本研究で、肺損傷の発生と発症およびそのメカニ
12 ズムにおけるNOSおよびアルギナーゼシグナル伝達的作用を調べた。NO前駆体である
13 L-アルギニンまたは非選択的NOS阻害剤であるN-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル
14 (L-NAME)の投与有または投与無しの条件下で、オゾンストレス誘起肺損傷動物モデル
15 は12日間継続して毎日30分間2.0 ppmのO₃に曝露することにより作成された。次に、肺
16 の病理組織診断、炎症性メディエーターの放出およびROSの産生を、それぞれ免疫組織化
17 学、ELISA、およびフローサイトメトリーによって解析した。NOSおよびアルギナーゼ
18 の活性および発現は、生化学的方法およびウエスタンブロットによって解析された。同様
19 に、8-オキシグアニングリコシラーゼ1(8-OxoG)および8-オキシグアニングリコシラー
20 ぜ1(OGG1)の放出はELISAおよびウエスタンブロットによって解析された。NOS/ア
21 ルギナーゼシグナル伝達と8-OxoG/OGG1の相関性は、ピアソン相関係数とNOS欠乏気管
22 支上皮細胞の免疫蛍光法によって分析された。オゾン誘発性肺損傷ラットでは、時間依存
23 的に肺の炎症と肺の構造の破壊が確認された。L-アルギニンを加えたオゾン処理は肺にお
24 ける有害な組織病理学的変化を大幅に減衰させ、L-NAMEによる処理は炎症と組織修復を
25 促進した。重要なことに、NOSの発現はL-アルギニンによって促進され、L-NAMEによ
26 って阻害された。また、アルギナーゼの発現はL-NAME処理によって促進された。さらに、
27 オゾン曝露群において高い8-OxoGレベルと低いOGG1レベルが認められた。これらはL-
28 アルギニン処理によって戻され、L-NAMEによって促進された。NOSの発現は
29 8-OxoG/OGG1と密接に関連していた。これらの発見は、NOSシグナル伝達が塩基除去修
30 復に関連していることを示すさらなる証拠を与える。

31

32 1.6. 生殖及び成長発達への影響に関する知見

33 Rivas-Manzano and Paz (1999)は、胎仔期のO₃曝露により小脳の形態に何らかの影響が生
34 じるか検討するため、雌のWistarラットに1.0 ppmのO₃を12時間/日で全妊娠期間中吸入
35 曝露させ、生後第0、12、60日の仔の脳病理組織について観察した。胎仔期にO₃曝露を受
36 けた仔において、生後第0日に小脳の壊死、生後第12日にプルキンエ細胞層の減少、生後

1 第 60 日にプルキンエ細胞の核の変性が確認された。これらの結果から、著者らは胎仔期の
2 O₃ 曝露は長期にわたる小脳傷害を誘発するとした。

3
4 Sorace *et al.* (2001)は、O₃ 曝露による成熟マウス及び O₃ 曝露した雌マウスから生まれた
5 仔マウスの学習行動への影響について検討するため、実験 1 では雌雄の CD-1 マウス成獣
6 に 0.0、0.3、0.6 ppm の O₃ を連続的に 30 日間、実験 2 では雌マウスを交配から妊娠第 17
7 日まで 30 日間全身吸入曝露を継続した。O₃ を 30 日間曝露した雄マウス成獣では、曝露第
8 4、19 日及び曝露終了 3 日後にオープンフィールド試験、曝露第 24～28 日にモリス水迷路
9 を行った。曝露マウスから生まれた仔マウスに対しては、生後第 2～20 日に身体的、神経
10 行動学的発達状況の評価、生後第 12 日に帰巢試験、第 21 日に自発行動試験、第 22～23
11 日に受動回避試験、第 70～74 日にモリス水迷路、第 100 日にホットプレート試験を行った。
12 オープンフィールド試験では、曝露第 4 日に 0.6 ppm の O₃ を曝露した雄マウスにおいて対
13 照群よりも横断行動が増加したが、その後は相違がみられなくなった。モリス水迷路では、
14 成獣、仔マウスともに 0.3 ppm の O₃ 曝露により逆転ステージでの学習障害が認められた。
15 また、仔マウスへの受動回避試験及びホットプレート試験では、潜伏時間の増加が認めら
16 れた。以上 の実験結果より、O₃ 曝露では濃度依存性はみられないが、げっ歯類の神経行
17 動的成績に選択的にわずかな影響を与えることが確認された。

18
19 Campos-Bedolla *et al.* (2002)は、O₃ が生殖器に与える影響について明らかにされていない
20 点が多いことから、妊娠ラットにおける子宮の収縮応答に対する O₃ の急性吸入曝露の影響
21 を評価した。非妊娠ラットと妊娠ラット(Wistar、妊娠第 5、10、18 日、n=5-9/群)に、空気
22 または 3 ppm の O₃ を 1 時間曝露し、16-18 時間後にラットから単離した子宮片のアセチル
23 コリン及びオキシトシンへの収縮反応パラメータ(曲線下面積、振幅、周波数)について測
24 定した。妊娠第 5、10 日における O₃ 曝露は、アセチルコリン刺激に対する曲線下面積最大
25 応答の増加を引き起こした。また、妊娠第 5 日においてオキシトシン刺激に対するすべて
26 の応答パラメータの最大値が増加した。以上 の結果は、O₃ 吸入が妊娠子宮内の異常な収
27 縮を引き起こすことを示唆している。

28
29 Jedlinska *et al.*(2006a)は、O₃ の慢性吸入曝露が精子の形成および運動性に与える影響を調
30 べた。Wistar Hannover ラット (雄、5 ヶ月齢、n=8-10/群) を 1 日 5 時間で 50 日間、0.5 ppm
31 の O₃ に曝露させ、O₃ 曝露の終了 1 週間前に、O₃ 曝露群と対照群の両方における受精率と
32 新生児の生存率を評価した。50 日間の曝露後にラットを過剰量のハロタンで屠殺し、精巢
33 の形態および運動性を評価した。精子の形態、運動性パラメータはいずれも、O₃ 曝露群と
34 対照群で差異を示さなかった。産後 1 年以内の交尾成功数および 1 腹あたりの新生児生存
35 率も両群で同等であった。しかし、対照動物と比較して、O₃ 曝露群では精子濃度が 17%低
36 かった。以上 の結果は、統計学的有意差は認められなかったものの、O₃ の慢性曝露が精

1 子濃度の低下傾向を生じさせることを示唆している。

2

3 Jedlinska *et al.*(2006b)は、O₃の慢性吸入曝露による精巣への影響を調べるとともに、ビタ
4 ミンC及びE摂取の増加がO₃の精巣への悪影響からの保護効果を示すかを調べた。Wistar
5 Hannover ラット(雄、5ヵ月齢、n=8/群)に0.5ppmのO₃を5時間/日、50日間曝露すると
6 共に、5日間隔で0.5、1.5、4.5、15mgのビタミンE、0.5、3、9、50mgのビタミンCのい
7 ずれか、またはビタミンCとE両方を筋肉注射により投与した。O₃処理したラットでは、
8 生殖腺切片のPAS染色において生殖細胞の枯渇が認められた。ビタミンE処置群では、
9 0.5mg用量群でのみ、血管周囲の線維化および管内の硝化が観察された。ビタミンC処置
10 群では、尿管間の硝子化、部分的精子形成の停止、精細上皮の落屑が、ビタミン投与量
11 に依存して認められた。また、ビタミンCの投与量50mgでは早期精子が認められた。両
12 方のビタミンを注射したラットでは、精子形成および液胞変性の部分的停止に加えて、硝
13 子化および線維化が現れた。以上の結果から、O₃の慢性曝露は精巣における生殖細胞の
14 枯渇を生じさせること、ビタミンEは用量にかかわらずO₃の有害影響からラット精巣を
15 保護するが、ビタミンCでは保護効果は観察されず、高用量のビタミンC投与ではむしろ
16 O₃による精巣の損傷が増強されることが示唆された。

17

18 Santucci *et al.* (2006)は、未経産の雌のCD-1マウスに0、0.3、0.6ppmのO₃を連続30日
19 間、全身吸入曝露させた後、曝露させていない雄マウスと交配し、妊娠第17日まで曝露を
20 継続させた。生後130日の仔マウスに対し、攻撃的行動、防御的行動について連続5日間
21 試験し、その後、脳を取り出し、海馬及び線条体における脳由来神経栄養因子、NGF(神
22 経成長因子)濃度を測定した。母マウスのO₃曝露により、仔マウスで硬直時間、防御的姿
23 勢持続時間、回避時間といった防御的行動の持続時間の伸長が認められ、さらに、仔マウ
24 スの海馬におけるNGF濃度の減少、線条体における脳由来神経栄養因子の濃度増加が認め
25 られた。

26

27 Gonzalez-Pina *et al.* (2008)は、雌のWistarラット12匹にろ過空気又は1ppmのO₃を12
28 時間/日で全妊娠期間の21日間、全身吸入曝露させ、雄の仔ラット60匹から生後第0、5、
29 10日に小脳を取り出し、組織中のドーパミン、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニ
30 リン酸、ノルエピネフリン、セロトニン、5-ヒドロキシインドール酢酸の濃度を調べた。
31 その結果、O₃に曝露された母ラットの仔では、生後第0、5日においてドーパミン、3,4-
32 ジヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸、ノルエピネフリンがO₃に曝露されていない
33 母ラットの仔と比較して減少したが、セロトニンは差がなく、5-ヒドロキシインドール
34 酢酸は生後第10日において増加した。また、O₃の出生前曝露により3,4-ジヒドロキシフ
35 ェニル酢酸+ホモバニリン酸/ドーパミン比は生後第0日及び第5日に減少が見られ、5-ハ
36 イドロキシインドール酢酸/セロトニン比は生後第0日において減少した。これらの結果が

1 ら、妊娠中の母ラットへの O₃ 曝露により、その仔ラットにおいて時間の経過に従って、小
2 胞においてインドールアミンシステムではなくカテコールアミンシステムの破壊が生じ、
3 その破壊によって失調症状をきたすこと、成長後の大脳傷害からの回復を抑制することが
4 示唆される。

5
6 Lopez *et al.* (2008)は、妊娠中の雌の Wistar ラットにろ過空気又は 1 ppm の O₃ を妊娠第 1
7 日から 12 時間/日で吸入曝露させ、妊娠第 18、20、21 日に屠殺し (各群 2 匹)、胎児それ
8 ぞれ 3 匹/1 腹について肺の微細構造変化を透過型電子顕微鏡によって観察した。妊娠第 18
9 日の胎児の肺でミトコンドリアの膨化と細胞質の空胞化が観察され、妊娠第 20 日ではグリ
10 コーゲンの増加、上皮細胞とラメラ体の剥離が、妊娠第 21 日ではミトコンドリアの膨化と
11 電子線密度の高い顆粒の出現が観察された。以上 の結果から、妊娠期間中の高濃度 O₃ へ
12 の短期曝露は胎児の肺の微細構造変化をもたらすことが示唆された。

13
14 Boussouar *et al.* (2009)は、自家交配による妊娠中の雌の Sprague-Dawley ラット (8 匹)
15 に環境大気又は 0.5 ppm の O₃ を 12 時間/日で妊娠第 5~20 日、全身吸入曝露させた。雄の
16 出生仔中、胎仔期 O₃ 曝露群、非曝露群、各 8 匹を無作為抽出し、成獣時、半数に 1 時間の
17 拘束ストレスを与え、残りの半数には与えなかった (各群 4 匹)。拘束ストレス後、2 時間
18 の回復期間において脳組織を採取し、孤束核におけるチロシン水酸化酵素 (tyrosine
19 hydroxylase)、Fos タンパク質の発現量を調べた結果、胎仔期に O₃ 曝露を受けたラットの
20 チロシン水酸化酵素タンパク質発現量は、非曝露群と比較して高かった。しかし、拘束ス
21 トレス負荷をかけた場合、胎仔期に O₃ 曝露を受けていないラットでは、チロシン水酸化酵
22 素タンパク質発現量、Fos タンパク質発現量が増加したが、胎仔期に O₃ 曝露を受けたラッ
23 トでは発現量の変動が認められなかった。以上 の結果から、胎仔期の O₃ 曝露は、成長後
24 の延髄孤束核における刺激応答性を減弱させ、その影響が長期にわたり持続することが示
25 唆された。

26
27 Sharkhuu *et al.* (2011)は、胎児期の大気汚染物質曝露による免疫系やその他の恒常機能の
28 発達への影響を調べた。妊娠中の BALB/c マウス (n=20 匹/群) を 0, 0.4, 0.8, 1.2 ppm の O₃
29 に 4 時間/日で妊娠第 9~18 日の 10 日間曝露し、仔マウス (雄雌、6 週齢、n=3~7) にお
30 ける肺の炎症及び免疫反応を評価した。1.2 ppm の O₃ 曝露は産仔数を 25%低下させた。ま
31 た、仔マウスの出生後体重増加率が低下するとともに、気管支肺胞洗浄液 (BALF) にお
32 ける乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性が増加した。O₃ 曝露は、仔マウス BALF 中の総タンパク
33 質量、IFN- γ 、IL-17、IL-4 量、CD4(+)CD8(+)CD25(+)T 細胞数、TCR β (+)CD1d(+)T 細胞数
34 には影響を与えなかった。また、1.2ppm の母体 O₃ 曝露により、OVA 感作した雌仔マウス
35 において BALF 中の総細胞、マクロファージ、リンパ球、好酸球の数が減少した。雌仔マ
36 ウスでは、早期(PND3)に OVA 抗原感作を受けたマウス群において、後期(PND42)に感作さ

1 れたマウス群と比較して、好酸球増加、BALF における LDH 活性および全タンパク質レベ
2 ルの上昇、およびメタコリンへの肺応答性の増加が認められたが、O₃ 曝露群ではこれらの
3 差異は認められなかった。以上 の結果は、O₃ 曝露が母体の生殖に影響を及ぼすとともに、
4 仔マウスの免疫機能に影響を与えることが示唆された。

5
6 Miller *et al.* (2017)は、着床時の短期間のオゾン吸入が胎児の成長に及ぼす影響を評価す
7 るため、その一因として子宮動脈血流における変化が起因する可能性を調べた。Long-Evans
8 の妊娠 5 日目および 6 日目の着床時に、ろ過空気または 0.4、0.8 ppm オゾンを 1 日 4 時間
9 曝露した。GD15、19、21 に尾部血圧と子宮動脈血流を測定した。GD21 では、着床前後の
10 オゾン曝露による肺や全身への影響が持続しているかどうかを評価するため、気管支肺胞
11 洗浄液、血清代謝・炎症性エンドポイント、腎臓の病理組織学を評価した。また、GD21
12 の子供の成長パラメータとして、胎児の体重、体長、体組成を評価した。母体の子宮動脈
13 血流を測定したところ、GD15 から GD21 にかけて 0.8 ppm の曝露群では抵抗が増加し、対
14 照群では減少したが、GD21 では両群ともに同程度であった。また、GD21 において、オゾ
15 ン曝露群では対照群に比べて血清グルコースが低く、遊離脂²酸濃度が³かった。GD21 では、
16 仔ラットでは雄雌共に対照群に比べて体重が少なく、除脂肪量および脂肪量ともに少なか
17 った。これらの結果は、着床時にオゾンに曝露されたラットの子供は、おそらくオゾンに
18 よって誘発された母体の血管機能障害の結果として、成長が阻害されたことを示唆してい
19 る。

20
21 Miller *et al.* (2019)は、ラットにおいて着床期のオゾン曝露が妊娠末期における胎児の体
22 重減少を生じさせることから、栄養膜細胞の機能に及ぼす影響を調べた。11 週齢の
23 Long-Evans ラットに、妊娠 5 日目および 6 日目（着床時期）において、0.4、0.8、1.2 ppm
24 オゾンを 4 時間曝露し、換気、肺障害、およびホルモン、炎症、代謝マーカーなどの循環
25 因子の変化を調べた。また、この曝露が栄養膜細胞の機能に及ぼす影響を調べるために、
26 胎盤由来の妊娠第 1 期の HTR-8/Svneo 細胞を、大気またはオゾン (0.8ppm×4 時間) に曝露
27 したラットの血清に曝露し、代謝能力、創傷閉鎖、浸潤への影響を調べた。妊娠ラットの
28 着床前後のオゾン曝露は、換気機能障害と肺血管漏出を誘発した。測定されたほとんどの
29 血中マーカーにはほとんど影響を与えなかったが、いくつかの血清サイトカイン（インター
30 フェロン- γ 、インターロイキン-6、インターロイキン-13) および血清 HDL コレステロー
31 ルが減少した。HTR-8/Svneo のトロフォブラストをオゾン曝露した母体の血清で 16 時間処
32 理すると、空気曝露した母体の血清やウシ胎児血清で処理した細胞と比較して、代謝能力、
33 創傷閉塞、マトリゲル膜からの浸潤が抑制された。また、オゾン曝露した母体の血清で処
34 理した培養細胞は、空気曝露した母体の血清で処理した培養細胞と比較して、浸潤と血管
35 新生の重要な阻害因子 (soluble fms-like receptor 1; sFlt1) の放出が増加した。以上 より、
36 着床可能な時期にオゾンに曝露された妊娠ラットの血清中の因子が、着床の重要なプロセ

1 ス (例えば、浸潤と移動) を妨げ、栄養膜の代謝能力を損なう可能性があることが示唆さ
2 れた。

3 4 1.7. その他の影響に関する知見

5 Weber *et al.* (1999)は、角質層が O₃ の様なオキシダントの標的として知られていることか
6 ら、ヒト皮膚毒性のモデルとなる雌の SKH1 ヘアレスマウス (6~9 週齢) に清浄空気又は
7 0.8、1、10 ppm の O₃ を 2 時間全身吸入曝露させ (各群 6 匹)、tape stripping 法により回収
8 した皮膚の角質層におけるビタミン C、グルタチオン、尿酸といった水溶性の抗酸化物質
9 量を測定した。その結果、1 ppm 以上 の O₃ 曝露により、角質層におけるビタミン C、グ
10 ルタチオン、尿酸の含量が低下した。

11
12 Neuhaus-Steinmetz *et al.* (2000)は、IgE 応答性の異なるマウスにおける OVA 感作への O₃
13 曝露の影響について検討するため、IgE 高応答性の BALB/c マウス及び低応答性の C57BL/6
14 マウスの雌 (6~8 週齢) に室内空気又は 180、250、500 µg/m³ の O₃ を 4 時間/日、3 日/週
15 で 4 週間全身吸入曝露させると共に、OVA エアロゾルを 20 分/回、5 回/週で O₃ 曝露中の 4
16 週間吸入させることにより感作させた。OVA エアロゾル最終曝露の 24 時間後、メサコリ
17 ン刺激に対する気道反応性、皮膚過敏性を調べた。また、BALF、血液を採取し、血清中
18 抗体価、BALF 中の細胞数、サイトカイン及び LT の産生について調べた。その結果、BALB/c
19 マウスでは、O₃ 曝露による濃度依存的な血清中 IgE 産生、サイトカイン産生、好酸球、リ
20 ンパ球の気道への集積による Th (T-helper) 2 型の反応の増加がみられた。BALB/c マウス
21 の O₃ 曝露+OVA 感作群では、それらの反応は増強し、気道抵抗の上昇、皮膚反応の陽性率
22 増加もみられた。一方、C57BL/6 マウスでは、O₃ 曝露+OVA 感作群でのみ Th2 型の反応増
23 加がみられた。

24
25 Elsayed *et al.* (2001)は、O₃ 曝露による傷害は通常フリーラジカルの形成及び酸化ストレ
26 スに関連しており、食料の制限は抗酸化ストレス状態をきたす。このことが O₃ 吸入への反
27 応に影響するか否かを検討するため、雄の Sprague-Dawley ラット(生後 1 か月)を、自由に
28 餌を与える FF(Freely-fed)群、餌の 1 日平均摂取量を FF 群の 20%に制限した DR
29 (Diet-restricted)群に分け、60 日間飼育した後、ろ過空気、又は 0.8 ± 0.1 ppm (1570 ± 196 µg/m³)
30 の O₃ を連続 3 日間、全身吸入曝露させた。また、別の FF 群、DR 群のラットそれぞれに 4
31 ± 0.5 ppm (7,848 ± 981 µg/m³)の O₃ を 8 時間吸入曝露させた。O₃ は都市の光化学スモッグ汚
32 染による強い酸化物質であり、低濃度の O₃ 曝露は肺傷害と感受性の高い個体群の疾病率を
33 上昇させ、高濃度の曝露は実験動物に致死的である。低濃度 O₃ に曝露したラットは曝露終
34 了直後に安楽死させ、肺の重量測定、酸化ストレスの生化学マーカーとして肺組織中の O₂
35 消費量、総スルフヒドリル量、非タンパク結合スルフヒドリル、総タンパク質量、DNA 含
36 有量、肺組織中の酵素活性としてグルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン還元酵素、

1 ブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素、6-ホスホグルコン酸 6-デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸脱
2 水素酵素の活性を観察した。高濃度 O₃ に曝露したラットについては、曝露中及びその後
3 16 時間の回復期間中の死亡について観察した。60 日間の餌の制限により、DR 群のラット
4 の体重は FF 群の 50% に低減した。低濃度 O₃ 曝露により、FF 群のラットは DR 群と比較
5 し、より大きな変化が観察された。高濃度 O₃ 曝露では、DR 群のラットは FF 群と比較し、
6 はるかに高い生存能力が示された (それぞれ 90% vs. 8%)。これらの結果は、体重の減少
7 をもたらすような食料制限には便益があり、抗 O₃ 作用の役割を果たしている可能性が示唆
8 された。

9

10 Valacchi *et al.* (2003) は、ヘアレスマウス (7~10 週齢) に 0.0、0.8 ppm の O₃ を 6 時間吸
11 入曝露させ、曝露終了直後、6、12、18、24、48 時間後に皮膚を採取し、脂質過酸化マー
12 カーである 4-HNE (hydroxynonenal)-タンパク質、ストレスタンパク質である HSP27、HO-1、
13 酸化ストレスマーカーである MMP-9 を観察した。4-HNE タンパク質は曝露終了から 48 時
14 間後まで持続的に増加を示した。HSP27 は曝露終了 24 時間後に発現ピークを示し、その
15 後減少した。HO-1 は、曝露終了 18 時間後に発現ピークを示し、その後減少を続け、48 時
16 間後にはベースラインレベルに回復した。MMP-9 の酵素活性は曝露終了 6 時間後にピーク
17 を示し、24 時間後にはベースラインレベルに回復した。また、MMP-9 mRNA に関しては、
18 曝露終了 12 時間後にピークを示し、その後回復した。

19

20 Valacchi *et al.* (2004) は、健康な若年 (7~10 週齢) の SKH-1 無毛マウス (10 匹) に室内
21 空気又は 0.8 ppm の O₃ を 6 時間/日で連続 6 日間、曝露させた。曝露中の体重を測定し、
22 曝露終了後、血液及び皮膚、肺の組織を採取し、 α -トコフェロール、I κ B α リン酸化反応、
23 COX-2、HO-1、PCNA、K-10 (Keratin-10) について調べた。体重については、曝露第 6 日
24 において、O₃ 曝露群は室内空気曝露群より約 6~18% 少なかった。O₃ 曝露群では、肺や血
25 漿中の α -トコフェロールが減少し、皮膚及び肺に HO-1、COX-2、PCNA が誘導された。
26 O₃ 曝露による肺と皮膚における COX-2、PCNA の上方調節は同程度であったが、HO-1 に
27 ついては、肺では 2 倍の誘導だったのに対し、皮膚では 7 倍となり、皮膚でより強い反応
28 を示した。これらの酸化ストレス反応指標に加えて、O₃ 曝露は肺、皮膚の両組織における
29 I κ B α リン酸化反応として測定した NF- κ B の活性化を生じさせた。室内空気曝露群の皮膚
30 に比べ、O₃ 曝露群の皮膚で K-10 が増加した。本モデルにおいて、高汚染レベルでの O₃ 曝
31 露は、 α -トコフェロールの減少や皮膚上皮及び気道上皮におけるストレス関連反応の誘導
32 といった影響を肺及び皮膚に与える可能性がある結論した。

33

34 Lim *et al.* (2006) は、O₃ 曝露が様々な組織における低分子量抗酸化物質の枯渇、タンパク
35 質酸化、脂質過酸化、細胞反応の活性化を生じさせることが知られていることから、O₃ 曝
36 露が皮膚創傷の治癒に与える影響を調べた。SKH-1 ヘアレスマウス (雌、8 週齢または 18

1 ヶ月齢、n=6/群) に 0.5 ppm の O₃ を 6 時間/日で最長 9 日間曝露した。傷害後に 9 日間 O₃
2 に曝露した老齢 (18 カ月) マウスでは、若齢 (8 週齢) マウスと比較して皮膚創傷の治癒
3 が遅延すること、皮膚創傷における酸化タンパク質、過酸化脂質が増加することを報告し
4 た。また、若齢マウスで見られた皮膚創傷における P-IkB α および TGF β タンパク質の増加
5 が 18 ヶ月マウスでは見られなかった。これらの結果は、オキシダントの曝露と加齢がに
6 よる創傷治癒の阻害に、交互作用が存在していることを示唆している。

7
8 Fortino *et al.* (2007)は、O₃ 曝露の皮膚への影響を検討するため、若齢 (8 週齢) 及び高齢
9 (18 か月齢) の雌の SKH-1 ヘアレスマウスに空気、0.25 ppm の O₃ 又はタバコの煙 (5 本
10 分) の 6 時間/日、4 日間の全身曝露、あるいは 0.3 MED (最小紅斑量: minimal erythema dose)
11 の紫外線 (各群 3 匹) の 4 日間照射を行った。曝露終了後、皮下脂肪、皮膚組織を採取し、
12 MMP-2、MMP-9、MMP-12 活性、TIMP-1 (tissue inhibitors of metalloproteinases -1)、TIMP-2
13 活性を調べた結果、O₃ 曝露により、皮膚組織の MMP-2、MMP-12 活性は若齢マウス、高
14 齢マウスで増加し、MMP-9 活性は高齢マウスで増加した。TIMP 活性は変化しなかった。
15 O₃ 全身曝露により皮膚の MMP 活性が上昇し、その影響は若齢マウスに比べて高齢マウス
16 で強くみられることが示された。

17
18 Aibo *et al.* (2010)は、O₃ への急性吸入曝露がマウスにおける薬物誘発性肝損傷の悪化を引
19 き起こすかどうかを調べた。C57BL/6 マウス (雄、8~10 週齢、n=6/群) に、肝臓損傷の
20 誘発剤としてアセトアミノフェン (APAP、300mg/kg) を腹腔内投与し、小葉性肝細胞壞
21 死を発症させ、2 時間後に 0、0.25、0.5 ppm の O₃ を 6 時間吸入曝露し、APAP 投与から 9
22 または 32 時間後に屠殺して O₃ 曝露による肝臓損傷の変化を評価した。APAP 投与マウス
23 への O₃ 曝露は、空気曝露と比較して、壊死性肝組織の悪化、血漿アラニンアミノトランス
24 フェラーゼ活性の増加、好中球の蓄積増加を引き起こし、肝障害を増悪させた。また、APAP
25 曝露は BrdU 標識肝細胞数を 10 倍に増加させたが、O₃ 曝露はその増加を著しく減弱させた。
26 APAP と O₃ の複合曝露は、APAP または O₃ の単独曝露と比較して、炎症、酸化ストレス、
27 細胞再生に関与する遺伝子の発現を変化させた。これらの結果は、O₃ の急性吸入曝露が
28 肝臓の修復を遅らせることによって、薬物誘発肝臓障害を悪化させることを示唆している。

29
30 Miller *et al.* (2018)は、アペリンには血管拡張と内皮バリアの維持を促進する心肺保護
31 作用があり、アペリンの減少は肺水腫を含む様々な肺疾患の一因として同定されているこ
32 とから、アペリンが O₃ の下流標的であるかどうか、またそのような発現の変化が肺にお
33 ける DNA メチル化の変化に関連しているかどうかを調べた。雄の Long-Evans 系ラットを、
34 ろ過空気または 1.0ppm の O₃ に 4 時間曝露した。曝露直後の呼吸機能を全身プレチスモグ
35 ラフィーを用いて評価し、肺水腫と炎症のマーカーを気管支肺胞洗浄 (BAL) 液で評価し
36 た。肺における DNA メチル化の酵素的制御因子を、アペリンプロモーターのメチル化と

1 ヒドロキシメチル化とともに測定した。O₃曝露は気道抵抗の増加と BALF 中のタンパク質
2 増加を生じさせた。また O₃曝露は DNA シトシン-5-メチルトランスフェラーゼ (DNMT)
3 活性と Dnmt3a/b 遺伝子発現を低下させた。アペリンプロモーターにおけるメチル化の増加
4 とヒドロキシメチル化の減少が測定された。これらのエピジェネティックな修飾は、O₃
5 によるアペリン発現の低下と肺水腫の発症を伴っていた。以上より、エピジェネティック
6 な制御、特に DNA 損傷の下流におけるアペリン・プロモーターのメチル化の増加は、ア
7 ペリン作動性システムの保護シグナル伝達の減少につながり、酸化性大気汚染への曝露後
8 に観察される肺水腫の一因となる可能性がある。

9 10 2. PAN の影響に関する知見

11 Campbell *et al.* (1967)は、ヒトにおいて PAN による健康影響についての報告がなされて
12 いることから、PAN の基本的な吸入毒性としてマウスに対する急性致死影響の調査を行っ
13 た。①2-5 週齢の雄の A-strain マウスに、76-169ppm PAN を 2 時間曝露した。その結果、
14 マウスの死亡は曝露直後と 2 週目にピークがあり、曝露 4 週間後では、296 匹のうち、209
15 匹が死亡した。曝露 0-1 日、1-2 日、3-7 日、8-16 日、17-22 日、23-29 日後で死亡した割合
16 は死亡全体の 19.1%、1.9%、7.2%、52.2%、15.3%、4.3%であった。②98-114 日齢の雄の
17 A-strain マウスに、97-145 ppm PAN を 2 時間曝露した。その結果、曝露 1 日-1 週間、2-4
18 週間、4 週間後の LC50 は、120-140 ppm、100-115 ppm、104-108 ppm であった。③60-70
19 日齢又は 98-115 日齢の雄の A-strain マウスに、PAN (濃度不明) を 1 日 2 時間曝露した。
20 その結果、PAN の感受性は年齢とともに増加し、4 週間後 LC50 はそれぞれ 145-150 ppm、
21 100-110 ppm であった。④119-157 日齢の雄の A-strain マウスに、PAN (濃度不明) を 1 日
22 2 時間曝露した (曝露中の温度：17.7°Cまたは 32.2°C)。その結果、17.7°Cの方が 32.2°C時
23 よりも感受性が低く、4 週間後 LC50 はそれぞれ 125 ppm、85 ppm であった。⑤98-114 日
24 齢の雄の A-strain マウスに、PAN (濃度不明) を 1 日 2 時間曝露した (温度：25.5°C、湿度：
25 25%-40%又は 80%-89%)。その結果、湿度は PAN の致死率にほとんど影響しなかった。⑥
26 58-168 日齢の雄の C57BL と BALB/C マウスに、類似の曝露を行った。その結果、死亡の
27 遅延が同様に観察された。C57BL マウスでは、曝露温度が高いほど致死率が高くなること
28 も観察された。ただ、年齢と温度の変数が交絡していたため、A 株マウスで見られた年齢
29 の影響を明確に確認することはできなかった。硝酸ペルオキシアセチル (PAN) の急性致
30 死毒性は、LC50 (生後約 3 ヶ月半の雄 A 系マウスを華氏 25.5 度で 2 時間曝露し、28 日間
31 死亡を観察) で表すと 106ppm と推定された。PAN の毒性は二酸化硫黄より大きい、二
32 酸化窒素と同程度であり、オゾンより小さい。致死量の中央値では、ほとんどの死亡は曝
33 露後 2 週目および 3 週目に発生した。致死毒性は若いマウスよりも年長のマウスで、また
34 低い温度よりも高い温度で大きかったが、相対湿度には大きな影響を受けなかった。

35
36 Dungworth *et al.* (1969)は、光化学オキシダントの代表格であるオゾンの人間や動物への

1 影響については多くの情報が得られているが、PANの影響についてはほとんど知見が得ら
2 れていないことから、PANによる慢性影響を明らかにするため、マウスへの曝露実験を行
3 った。6-8週齢の雄マウスA株に、ろ過空気または15ppmPANを6時間、6か月間毎日(計
4 130回)曝露した。曝露マウスでは体重が減少し、曝露期間中に18%が死亡した。死亡の
5 原因は、主に細菌性の重度滲出性気管支肺炎因によるものであった。PANによって生じた
6 合併症ではない病変は、本質的に慢性過形成性気管支炎、細気管支炎、および非感染
7 性肺炎で構成されていた。上皮の形質転換が見られたが、その性質は呼吸器系の病変の程
8 度によって異なっていた。気管支における最も顕著な特徴は、壁内の腺房構造の形成であ
9 り、非定型の上皮変化を伴っている場合もあった。気管および主幹気管支では、約50%の
10 マウスで扁平上皮の病巣が観察された。気管支周囲の上皮過形成は顕著であったが、試験
11 期間中、腺腫は発生しなかった。また、PANに対する反応として、気管支の脱落および斑
12 状の軽度遠心性肺気腫が見られた。光化学大気汚染物質の人の健康影響におけるPANの
13 相対的な重要性はまだ判断できない。PANの分布及び影響だけでなく、オゾン、窒素酸化
14 物、アルデヒド、その他の化合物についてもさらなる研究が必要である。

15
16 Campbell *et al.* (1970)は、光化学大気汚染の主要成分である硝酸ペルオキシアセチル(PAN)
17 について、マウスに対する急性致死濃度が報告されていることから、PANのより低レベル
18 で生じる影響、特に自発的な活動の阻害効果について調査するとともに、他の大気汚染物
19 質との比較を行った。75-149日齢の雄のC57BLマウスに、2.8、3.7、5.5、6.4、8.6ppmPAN
20 を6時間吸入させ、自発的な回し車での活動の抑制を測定した。いずれの濃度においても、
21 曝露前と比較すると、曝露開始後6時間と24時間の活動を大幅に抑制した。高濃度の曝露
22 では、低濃度と比べてうつ病様行動がより早期に観察された。6時間曝露により活動強度
23 が半減した濃度は4.5ppmであった。過去の研究との比較により、PANの毒性強度はオゾ
24 ンより弱く、二酸化窒素、一酸化炭素より強かった。

25
26 Kruyse *et al.* (1977)は、オゾンと比較してPANはの亜急性および亜慢性毒性に関する定
27 量的な研究結果が少ないことから、PANの急性、亜急性および亜慢性吸入毒性を評価した。
28 4/5/9週齢の雄と雌Wistarラットに、ろ過空気またはPANを曝露した。急性曝露では78~
29 151ppmPANを4時間、亜急性曝露では0、0.9、4.1、11.8ppmPANを4時間6時間/日、5
30 日/週、4週間、亜慢性曝露では0、0.2、1.0、4.6ppmPANを6.5時間/日、5日/週、13週間
31 曝露した。急性曝露のLC50は95ppmであった。亜急性曝露では、11.8ppmへの曝露は、
32 異常な行動、成長遅延、死亡率、ヘモグロビン含有量の上昇、ヘマトクリット値と赤血球
33 数、肺重量の増加、重度の炎症性変化、気道の上皮過形成および化生を引き起こした。
34 4.1ppmでは、最小限の行動障害、一過性の成長抑制、肺重量のわずかな増加、気道にお
35 ける軽度の病理組織学的変化が見られた。0.9ppmでは変化は見られなかった。亜慢性曝露で
36 は、4.6ppmへの曝露は、亜急性曝露の11.8ppmと同様の変化をもたらしたが、死亡は発

1 生しなかった。1.0 ppm では、鼻腔内の粘膜の最小限の刺激が、観察された唯一の PAN 関
2 連の影響であった。0.2 ppm では変化は見られなかった。PAN の無毒性濃度は 1.0ppm よ
3 りもわずかに低い程度であると考えられ、すでに報告されているオゾンの毒性値と比較し
4 て毒性は低かった。

5
6 Thomas *et al.* (1981)は、急性および慢性呼吸器感染症への感受性に対する PAN が及ぼす
7 影響を明らかにすることを目的として実験を行った。6~16 週齢の雌ラット及びマウス
8 (Sprague-Dawley、C57BL/6、CD2F) を 14.8~28.4 mg/m³ の PAN に 2 または 3 時間、また
9 は 7.4 mg/m³ PAN に 3 時間/日、5 日/週、2 週間曝露した。PAN の 2 または 3 時間曝露によ
10 り、化膿レンサ球菌エアロゾルの吸入によって引き起こされる急性呼吸器肺炎による死亡
11 率が増加した。過剰死亡率は 8 から 39%の範囲であり、生存期間は 2.4~7.9 日減少した。
12 25 mg/m³ PAN への単回曝露では、肺洗浄液中の総細胞数は増加したが、肺胞マクロファ
13 ージの ATP のレベルは減少した。PAN の 2 週間曝露では、遊離した肺細胞の総数が減少し、
14 肺胞マクロファージの ATP レベルが大幅に減少したが、化膿レンサ球菌エアロゾル吸入に
15 による死亡率や生存率には変化はみられなかった。PAN への単回および複数回の曝露後、
16 鼻腔および気管における非繊毛細胞の隆起および脱落、ならびに粘液化成が見られた。PAN
17 は肺の白血球や気道の組織に軽微な損傷を与えると同時に、死亡率の上昇と生存時間の短
18 縮を生じさせた。

19
20 Kligerman *et al.* (1995)は、ペルオキシアセチルナイトレート (PAN) は、揮発性有機化合
21 物と窒素酸化物から太陽光によって形成される一般的な大気汚染物質 1 つであり、細菌に
22 おける変異原であることが示されていることから、PAN が哺乳類細胞においても DNA 損
23 傷を引き起こす可能性があるかどうかを調べた。マウス末梢血リンパ球を複数濃度の PAN
24 に *in vitro* で曝露し、染色体異常 (CA)、姉妹染色分体交換 (SCE) およびシングルセルゲ
25 ル (SCG) アッセイにより DNA 損傷について評価した。また、6 週齢の雄 B6C3F1 マウス
26 に 0、15.4、39.2 または 78.0 ppm の PAN を 1 時間鼻部吸入曝露した後、肺細胞を取り出し
27 て培養し、SCE および CA についての評価を行った。78.0 ppm の曝露では DNA 損傷の増
28 加が認められたが、細胞毒性 (細胞分裂阻害) についても生じており、非特異的な DNA
29 鎖の切断の可能性が考えられた。より低い濃度では、SCE、CA または DNA 損傷の増加は
30 見られなかった。*in vivo* 曝露試験では、いずれのアッセイでも濃度依存的な影響は見られ
31 なかった。以上の結果から、著者らは PAN が *in vivo* または *in vitro* いずれにおいても哺乳
32 類細胞に対する強力な染色体異常誘発物質または DNA 損傷剤ではないことを示唆してい
33 るとした。

34
35 DeMarini *et al.* (2000)は、4 週齢の雄の B6C3F1 BigBlue マウスに 0 (清浄空気)、13.4、39.2、
36 78.0 ppm (最大耐容量に近い濃度) の PAN (peroxyacetyl nitrate) を 60 分間鼻部吸入曝露さ

(案)

1 せ、24 日後、肺を取り出し、肺組織 lacI 遺伝子の変異パターンを観察した。また、サルモ
2 ネラ菌に対する変異パターンの解析を行い、Big Blue マウスの変異と対比した。最大耐容
3 量に近い 78.0 ppm の PAN 曝露は肺組織遺伝子の変異を引き起こした。

4

5