

「高齢呼吸器疾患モデルの免疫系指標による環境 有害物質の影響評価法の確立」

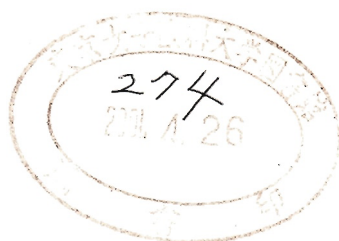
課題番号 10680524

平成 10-12 年度科学研究費補助金（基盤 C）研究報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 石原陽子

（東京女子医科大学医学部助教授）



「高齢呼吸器疾患モデルの免疫系指標による環境
有害物質の影響評価法の確立」

課題番号 10680524

平成 10-12 年度科学研究費補助金（基盤 C）研究報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 石原陽子

（東京女子医科大学医学部助教授）

[研究組織]

研究代表者：石原陽子（東京女子医科大学・医学部・助教授）
研究分担者：丸山良子（宮城県立宮城大学・看護学部・助教授）
研究分担者：青柴和徹（東京女子医科大学・医学部・助手）
研究分担者：郡 和宏（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究協力者：中川 清（東京女子医科大学・医学部・講師）
西川俊郎（東京女子医科大学・医学部・助教授）
新関 満（柴田科学株式会社・開発部）

研究経費

平成 10 年度	1300 千円
平成 11 年度	1000 千円
平成 12 年度	800 千円
計	3100 千円

[研究発表]

(1) 学会誌等

1. Ishihara Y, Iijima H, Matsunaga K: Natural killer cell tumoricidal activity and deterioration of lung tumor metastasis in silicotic mice and stressed silicotic mice. *Cancer Letter*, 163, 11-15, 2001
2. Ishihara Y, Yasuhara T, Ishiyama S, Kawashima H, Miyasaka M, Miyazaki T: The role of leukocytes during acute phase of inflammatory in crystalline silica-induced lung injury. *Exp Lung Res*, in press
3. Ishihara Y: Health effects of asbestos and other mineral fibers-In vitro studies on biological effects of fibrous minerals, *Indust Health*, in press
4. Ishihara Y, Nishikawa T, Kagawa J: Expression of cytokines in the lungs of normal and sensitized mice single transtracheally injected with diesel exhaust particles or its organic solvent extracted particles, *International Inhalation Symposium Series*, ILSI Press, Washington D.C., p.393-396, 2000
5. 石原陽子、飯島弘子、松永謙一、香川 順: オゾン暴露による肺傷害と免疫応答へのストレス負荷の影響、*東京女子医大総研紀要*、20, 18-20, 2000
6. Kyono H, Serita F, Toya T, Kubota H, Arito H, Takahashi M, Maruyama R, Honmama K, Ohta H, Yamaguchi Y, Nakakita M, Seki Y, Ishihara Y, Kagawa J: A new model rat with acute bronchitis and its application to research on the toxicology of inhaled particle matter, *Indust Health*, 37:47-54, 1999
7. Ishihara Y, Kyono H, Kohyama N, Otaki N, Serita F, Toya T, Kagawa J: Acute biological effects of intratracheally instilled titanium dioxide whiskers compared with nonfibrous titanium dioxide and amosite in rats, *Inhal Toxicol*,

- 11:131-149, 1999
8. Ishihara Y, Matsunaga K, Iijima H, Fujii T, Oguchi Y, Kagawa J: Time-dependent effects of stressor application on metastasis of tumor cells in the lung and its regulation by an immunomodulator in mice, *Psychoneuroendocrinology*, 24:244-258, 1999
 9. Ishihara Y, Matsunaga K, Kagawa J: C-C and C-X-C chemokine synthesis and release via receptors by human alveolar macrophages treated with three types of stimulants, *In vitro Mol Toxicol (Formally In Vitro Toxicol)*, 12:213-223, 1999
 10. 石原陽子：間質性肺炎と環境要因、*Molecular Medicine*, 36:26-35, 1999
 11. Ishihara Y, Kohyama N, Kagawa J: Contribution of human pulmonary macrophage-derived cytokines to asbestos-induced lung inflammation and fibrosis, *Inhal Toxicol*, 10:205-225, 1998
 12. Ishihara Y, Kohyama N, Nagai A, Kagawa J: Cellular biological effects and a single transtracheal injection test in three types of whisker fibers, *Inhal Toxicol*, 10:275-291, 1998
 13. Ishihara Y, Fujii T, Iijima H, Saito K, Matsunaga K: The role of neutrophils as cytotoxic cells in lung metastasis; Suppression of tumor cell metastasis by a biological response modifier, *IN VIVO*, 12:1-8, 1998
 14. Ishihara Y, Kyono H, Kohyama N, Otaki N, Kagawa J: Acute effect of intratracheal instilled TiO₂ whisker on the rat lung: 3. Evaluation of fiber-induced lung injury based on bronchoalveolar fluid analysis. *Medica Internal Cong Series*, 1153:606-610, 1998
 15. Ishihara Y, Iijima H, Matsunaga K: Contribution of cytokines on the suppression of lung metastasis, *Biotherapy (Netherlands)*, 11:267-275, 1998
 16. Ishihara Y, Aoshiba K, Kagawa J: Comparative study of Japan fiber material (JFM) standard samples: 2 The effects of whisker fibers on the cell cycle and cell death in A549 epithelial-like cells, *Medica Internal Cong Series*, 1153:686-690, 1998
 17. Ishihara Y, Kagawa J: Comparative study of Japan fiber material (JFM) standard samples: 1. Evaluation of refractory fiber-induced TNF- α generation and cytotoxicity in murine macrophage cells, *Medica Internal Cong Series*, 1153:681-685, 1998
 18. 石原陽子：大気中の恐ろしい物質ーアスベストおよび代替繊維の安全性評価法の検討から、癌と宿主、10:199-214, 1998

(2) 口頭発表

1. Y. Ishihara, T. Nishikawa, H. Hagiwara: The effects of various particulate matters in mice with acute bronchiolitis. 8th International Inhalation Symposium—Crucial Issues in Inhalation Research—Mechanistic, Clinical and Epidemiologic, 6-9 June, 2001
2. Y. Ishihara, T. Nishikawa, J. Kagawa: Modulation of airway reactivity in mice lacking nitric oxide synthase II exposed to 0.8 ppm ozone. American Lung Association/American Thoracic Society International Conference, 18-23 May, 2001
3. Y. Ishihara, S. Ishiyama, T. Nishikawa, J. Kagawa: Lung function and expression

- of nitric oxide synthase in the lung of rats exposed with 0.8 ppm ozone. American Lung Association/American Thracic Society International Conference, 18-23 May, 2001
4. Y. Ishihara, H. Iijima, K. Matsunaga, T. Fukushima, S. Takenoshita: p53 mRNA expression and mutations in p53 gene in mice with silicosis. American Lung Association/American Thracic Society International Conference, 18-23 May, 2001
 5. タバコ煙に暴露されたシリコーシスマウスでの肺 Cytochrome P450 (CYPs) mRNA の発現. 日本産業衛生学会総会、2001年、4月
 6. Y. Ishihara, T. Yasuhara, S. Ishiyama, H. Kawashima, M. Miyasaka: Administration of anti-L-selectin antibody cause pulmonary granuroma formation in rat with transtracheal injection of crystalline silica. American Lung Association/American Thracic Society International Conference, 5-10 May, 2000
 7. Y. Ishihara, H. Iijima, K. Matsunaga, T. Nishikawa: Expression of matrix metallo-proteinase and lung metastasis in mice with silicosis. American Lung Association/American Thracic Society International Conference, 5-10 May, 2000
 8. Y. Ishihara, S. Ishiyama, R. Maruyama, J. Kagawa, K. Fukuda: Expression of nitric oxide synthase and ozone-induced hyperreactivity in rats. Experimental Biology 2000, 15-18 April, 2000
 9. 石原陽子、西川俊郎、香川順：シリコーシスマウス肺におけるがん抑制遺伝子 p53 の発現. 日本産業衛生学会総会、2000年、4月
 10. R. Maruyama, Y. Ishihara, J. Kagawa, Y. Fukuda: Long term effect of cigarette smoked-induced respiratory changes with high protein nutrition. Experimental Biology '99, April, 1999
 11. Y. Ishihara, Y. Oguchi, H. Iijima, T. Fujii, K. Matsunaga, J. Kagawa: Effects of crystalline silica compared with non-fibrous titanium dioxide on metastasis of tumor cells in the lung and its regulation by an immunomodulator in mice. Experimental Biology '99, April, 1999
 12. Y. Ishihara, M. Naruse, J. Kagawa, H. Demura: Expression of leptin receptor in maturation of the lung and its suppression by cigarette smoke. American Lung Association/American Thracic Society International Conference, April, 1999
 13. Y. Ishihara, H. Iijima, T. Fujii, K. Matsunaga, J. Kagawa: immunoresponce to tumor cell inoculation in mice treated with crystalline silica or titanium dioxide. American Lung Association/American Thracic Society International Conference, April, 1999
 14. Y. Ishihara, J. Kagawa: Expression of cytokines in the lung of normal and sensitized mice single transtracheally injected with diesel exhaust particles or its organic solvent extracted particles. 7th International Inhalation Symposium, February, 1999

[研究成果]

1.研究目的

これまでの多くの環境有害物質の評価は、健康人の健康障害を基準に行われてきたが、最近の高齢化社会や呼吸器疾患有症者の増加は、今後環境有害物質暴露に対する高感受性集団についても、十分に安全な環境基準の設定が必要であることを示している。最近、大気汚染物質や喫煙と慢性閉塞性肺疾患及び気管支喘息発症との因果関係について、各種動物実験あるいは疫学調査によって次第に明確にされつつあるが、これらの疾患の多くは若齢又は50代前後より発症し、進行性の不可逆的換気障害を起こすことから、発育や加齢による身体的変化の関与が大きいものと考えられる。そこで申請者らは、高感受性群に対する有害物質の生体影響を評価するために急性気管支炎動物モデルラットを用いて、低濃度有害物質暴露による肺傷害を鋭敏に反映する指標を検索した。その結果、急性気管支炎発症への加齢の影響は若齢動物に比較して老齢動物では炎症反応の程度は僅かに軽度であったが、気道炎症の進行の遅延と白血球動員数の低下、修復機能の低下を認めた。一方、転移肺癌移植マウスへの各種ストレス負荷では、若齢群では脾NK活性及びACTH分泌の変化を認めるが、老齢群では認めない。

これまで得られた結果は、老齢期の予備力、回復力、防衛反応、適応力などの低下が、神経-免疫-内分泌ネットワークを介して有害物質に対する肺の感受性を制御していることを示唆するものと考えられた。従って、高感受性群での有害物質吸入による生体影響の評価は、肺傷害に直接関係する指標のみならず、宿主抵抗性にも深く関与する免疫応答関連指標を含めた両側面から評価する必要があるという考えに至った。特に、吸入有害物質の免疫系への影響は、非特異的免疫担当細胞である肺胞マクロファージとT細胞の相互作用による各種サイトカインの産生・放出に強く関与することが考えられることから、若齢及び老齢マウスを用い、より鋭敏な指標としての遺伝子レベルでの検討も加えて下記の点を明かにすることにした。

- (1) 肺免疫担当細胞機能への加齢の影響を細胞性及び体液性免疫の両面から検索し、加齢影響を受ける免疫指標を明確にする。
- (2) 気管支炎の発症・進展と肺免疫担当細胞機能：細胞性及び体液性免疫系への影響を、若齢と老齢気管支炎モデルで比較検討してその差異を明確にすると共に、鋭敏な免疫系の指標を明かにする。
- (3) 老齢気管支炎群への低濃度五酸化バナジウム、オゾン、関東ローム粉の短期暴露による肺傷害への肺免疫担当細胞機能：細胞性及び体液性免疫の関与を明かにする。
- (4) 加齢による免疫応答の変化が気管支炎発症・進展の制御因子となるか明確にする。
その際の肺免疫担当細胞としての肺胞マクロファージ及びT細胞によるサイトカイン産生・分泌等を通じた相互関係や機能変化についても検索して、生体影響評価法における有用な免疫関連指標を明確にする。

[実験方法]

1.急性気管支炎モデルマウスの作成

実験動物：マウス(C57/BL,雄、SPF)を、4週齢で購入し、SPF動物飼育室で飼育した。暴露実験時には、マウス用に作成した吸入チャンパーに移し、塩化ニッケルエアロゾルを5日間暴露して、急性気管支炎モデルマウスを作成した。対照群は、フィルターを通した清浄空気で飼育した。

塩化ニッケル暴露条件の設定：既に京野ら（1）によって報告された塩化ニッケル暴露による気管支炎ラットの下記に示す暴露条件を基に、マウス用に作成した暴露チャンパーでの暴露条件を検討した。

急性気管支炎モデルラットの作成条件

暴露第1日目：2%塩化ニッケル(pH 6.56)を超音波ネブライザーにより質量平均径(MMAD) 1.8 μm , 幾何学標準偏差(σ)1.6 のエアロゾルを発生させ、0.85mg/m³で5時間暴露。

暴露第2-5日：1日目と同一エアロゾルサイズで、0.25 mg/m³の条件下で5時間暴露。

暴露条件の検討：柴田科学製の暴露装置に超音波ネブライザー（オムロン製、NE-U12）を接続し塩化ニッケルエアロゾルを発生させた。エアロゾルは80度以上で加熱後、速やかに冷却して暴露チャンパー内に吸引ポンプで吸引して注入した。暴露チャンパーは、42cmx30cmx30cmで、常時30L/minで吸引し、排気部には20cmx20cmx15cmのフィルターを装着した。粒子数は、柴田科学製のDigital dust indicatorを用いてモニターした。尚、動物暴露時の、チャンパー内の温度は23+1.0度、湿度50%であった。表1及び図1-4に、アンダーセンサンプラーを用いて、塩化ニッケル0.1%, 0.2%, 2% 溶液エアロゾルを毎分29.3Lで60分間吸引した際の塩化ニッケル濃度とエアロゾル濃度の関係及び粒子サイズの分布を示した。ニッケル量は、フレーム原子吸光法によって測定した。これらの結果から、暴露第1日目に0.13%,第2日目以降0.09%の塩化ニッケルでの条件を設定した。この時のエアロゾル粒子の質量平均径(MMAD)は約1.26 μm , 幾何学標準偏差(σ)は約1.71、チャンパー内濃度は約0.37 mg/m³と設定された。ラットの肺重量は、体重100gあたり2.2-2.3g、マウスは約3.7g/100 g体重であることから、暴露時間を体重量から換算してマウスでは1時間とした。2.五酸化バナジウム暴露実験

塩化ニッケル暴露5日目の急性気管支炎マウスに、塩化ニッケル暴露終了後2時間同一暴露チャンパー内で五酸化バナジウムエアロゾルを2時間暴露した。

2.五酸化バナジウム暴露実験

塩化ニッケル暴露5日目の急性気管支炎マウスに、塩化ニッケル暴露終了後2時間同一暴露チャンパー内で五酸化バナジウムエアロゾルを2時間暴露した。

3. 関東ローム粉暴露実験

塩化ニッケル暴露5日目の急性気管支炎マウスに、塩化ニッケル暴露終了後2時間同一暴露チャンパー内で関東ローム粉の懸濁エアロゾルを2時間暴露した。関東ローム粉の組成については、表2-3に示した。

4. オゾン暴露実験

塩化ニッケル暴露5日目の急性気管支炎マウスに、塩化ニッケル暴露終了後大型暴露チャンパー内に動物を移し、柴田科学製のオゾン発生装置を用いて、0.8 ppm オゾンを3時間暴露した。

5. 無拘束下での呼吸パターンの測定

Bartlett & Tenny (2), Pappenheimerの方法(3)を基に、ボディプレチスモグラフを用いてマウス呼吸パターン(呼吸数、一回換気量、分時換気量)と各種濃度のmethacholineに対する呼吸パターンを測定した。マウスをボックス内に無拘束下で入れ、70%窒素と30%酸素の混合ガスの流速下で静置させた。呼吸パターン測定時に、ガス注入口と排出口を一時的に閉鎖して、ボックス内の圧変化を差圧トランスデュースター(日本光電 TP603T)で測定し、日本光電社製呼吸生理機能解析システムで解析した。一回換気量、分時換気量の換算式はDrorbaugh & Fennらの方法(4)によって計測し、BTPS(体温、大気圧、水蒸気飽和状態)で表わした。

methacholineは、MEDISONIC製(U.S.A)超音波ネブライザーを用いて、混合ガス流速下で30秒間ボックス内に注入した。

6. 解剖、試料採取、分析方法

解剖及び試料の採取：塩化ニッケル暴露及び複合暴露終了24時間後に、実験動物はエーテル麻酔下で、開胸し、右心室より採血後、左肺の肺門部を糸で結紮し、組織RNA抽出用に速やかに摘出してアイソジェン(日本ジーン)溶液中で保存した。右肺は、気管より水柱圧10 cmで10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。気管支肺胞洗浄サンプルは、気管内に24Gサーフロー留置針を固定し、5.5g体重あたり0.1mlの生理食塩水で注入、吸引を3回行い、気管支肺胞洗浄液(BALF)とした。

BALFの分析：BALF中細胞数は、自動血球測定装置により、細胞分画はサイトスピンをを用いてマイクロ スライドガラスに付着後、ディフクイック染色を行い、顕微鏡下で分画率を計測した。総蛋白量は、Lowryらの方法(5)によって測定した。

細胞性免疫の検討：脾臓と胸腺は、摘出後氷冷10%FBS含RPMI-1640培養液中に保存し、細胞をばらした後、自動血球測定装置によって細胞数を測定した。脾臓細胞は、NH₄Cl.KOC₃/EDTA液で溶血後、細胞を滅菌ハックス溶液に再浮遊して、表4の各種細胞表面マーカーの抗体を用いて染色し、サイトメトリーシステム(日本分光製)によって測定した。

体液性免疫の検討：血清中Ig G, Ig M及びBALF中のIg Aは、BETHYL製(U.S.A.)のMouse IgG ELISA Quantitation Kit, Mouse IgM ELISA Quantitation Kit,

Mouse IgA ELISA Quantitation Kit を用い、o-phenylene diamine 染色を行い、490 nm でマイクロプレートリーダー（ダイナテック社製）により測定した。

肺組織での各種サイトカイン mRNA 発現の検討：アイソジェン溶液中で保存した肺組織は、ホモジネート後常法(6)に従って組織 RNA 抽出を行った。RNA から、Superscript preamplification system (GIBCO BRM, USA) を用いて cDNA 合成を行った後、各種プライマー（表 5）を用いて、表 6 の条件下で RT-PCR を行った。PCR 産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、メチルブロマイド染色後 Bio-Rad Multi-Analyst (BIORAD, version 1.0.2, U.S.A.) を用いて半定量を行った。泳動用標準マーカとして、 ϕ x174-Hae III を用いた。

サイトカインとしては、マクロファージ、単球、リンパ球から産生され、好中球、単球、T 細胞、B 細胞を遊走させる作用と好中球の活性酸素放出や、マクロファージのサイトカイン放出を増強する MIP-1 α 、単球、血管内皮細胞、線維芽細胞などで産生され、マクロファージを遊走させる MCP-3、リンパ球など免疫細胞と関連性の高い TNF- α 、IL-1 β の遺伝子レベルでの発現量を測定した。

[実験結果]

1.細胞性、体液性免疫及び呼吸パターンへの加齢影響（表 7-9）

生後 10 日後から 24 か月齢までの C57/BL マウスの体重、脾臓、胸腺および脾臓細胞表面マーカのデータを表 7 に示した。体重は、加齢とともに増加したが、若齢時の体重増加率のほうが成熟後のそれよりも大であった。体重量に対する脾重量は、加齢と共に減少したが、老齢では未成熟期と同値を示した。一方胸腺重量の体重比は加齢と共に減少した。脾臓細胞中の B 細胞の割合は、成熟と共に増加し、老齢期では減少した。Ly1 陽性細胞は、成熟過程で増加し、老齢期で成熟期の約 1 / 3 に減少した。T 細胞の CD4/CD8 の比率は、加齢とともに低下し、老齢期での CD4 陽性率の減少は CD8 陽性率のそれに比し顕著であった。マクロファージ系の表面マーカである Asialo GM1 陽性率は、3 か月齢、24 か月齢では明らかな差を認めなかった。体液性免疫としての気管支肺胞洗浄液中 IgA 及び血清 IgG, IgM は、7 週齢に比較して 24 ヶ月齢で高値を示した（表 8）。

呼吸パターンへの加齢影響（表 9）では、呼吸数には明確な差を認めなかったが、一回換気量は成長と共に漸増し、3 か月齢と 24 か月齢ではほぼ同値を示した。分時換気量は、老齢マウスで減少傾向が認められた。

2.老齢及び若齢急性気管支炎モデルでの細胞性及び体液性免疫系への影響比較

(1) 老齢急性気管支炎モデルを用いた実験（表 10-20, 図 5-9）

表 10 に実験プロトコールを示した。24 か月齢の C57/BL 雄性マウスを用いて、対照群（CC 群）、0.8ppm オゾン 3 時間単回暴露群（C+O 群）、急性気管支炎群（Br 群）、急性気管支炎マウスに 0.8 ppm オゾンを 3 時間単回暴露した群（Br+O 群）の 4 群で実験を行った。

表 11-20 に結果をまとめた。脾臓の細胞分析では、Br 群で有意に Asialo GM1 陽性率が上昇したが、オゾン暴露によってその変動は影響されなかった。BALF の分析で

は、Br 群では BALF 回収率の低下傾向と総蛋白量の明らかな増加を認めた。総細胞数は有意な増加を示さなかったが、細胞分画像の分析では肺泡マクロファージの減少と好中球の明らかな増加が認められ炎症が起きていることが推定された。加えて Br+O 群では、総細胞数が Br 群の約 4 倍まで増加しており、オゾン暴露によって炎症細胞の動員がさらに亢進された。

体液性免疫としての免疫グロブリン量では、BALF 中の IgA は Br 群で有意に増加した。CC+O 群の IgA 値は、CC 群とほぼ同値を示したが、急性気管支炎動物へのオゾン暴露では IgA は Br 群よりもさらに上昇した。

血清 IgG 値には 4 群間で明確な差を認めなかったが、IgM 値は Br 群で有意に増加し、オゾン暴露はその影響をむしろ抑制する傾向を示した（表 14-15）。

肺組織でのサイトカイン mRNA 発現についての検討（表 16）では、Br 群で MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-3) mRNA 発現と MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) mRNA 発現の明らかな亢進が認められた。

呼吸パターンの分析（表 17-20）では、CC 群と Br 群間の比較で呼吸数には明確な差を認めなかったが一回換気量が Br 群で有意な増加を示した。Methacholine に対する反応性についての検討では、いずれの群でも呼吸数、一回換気量、分時換気量共に濃度依存性の増減は認めなかった。

病理所見については、図 5-6 が CC 群の、図 7 が Br 群の、図 8-9 が Br+O 群の肺組織 HE 染色像である。Br 群では、気管支粘膜下にリンパ球や好中球の炎症細胞の浸潤が認められ、気管支粘膜上皮の軽度な増生が認められた。Br+O 群では、血管周囲にリンパ球や好中球の炎症細胞の遊走を認め、気管支粘膜下の炎症細胞は顕著な増加ではないが血管周囲の浮腫が Br 群に比較してやや強く認められた。

3 群間の炎症の程度の比較では、CC+O 群 < Br 群 < Br+O 群の順であった。

（2）若齢急性気管支炎モデルを用いた実験（表 21-27, 図 10-13）

表 21 に実験プロトコルを示した。7 週齢の C57/BL 雄性マウスを用いて、対照群（CC 群）、0.8 ppm オゾン 3 時間単回暴露群（C+O 群）、急性気管支炎群（Br 群）、急性気管支炎マウスに 0.8 ppm オゾン を 3 時間単回暴露した群（Br+O 群）の 4 群で実験を行った。

表 22-27 に結果をまとめた。脾臓の体重比は、CC 群に比較して Br 群で明らかに減少したが、脾細胞分析では 4 群間に明確な差異は認めなかった。

BALF の分析では、4 群間で BALF 回収率や総細胞数に明確な変動を認めなかったが、Br 群では総蛋白量の上昇と細胞分画像で好中球分画の増加を認めた（表 24）。

体液性免疫についての検討では、BALF 中 IgA は CC 群、CC+O 群、Br 群の 3 群で明らかな増減を示さず、Br+O 群で約 1.2 倍程度増加したに過ぎなかった。血清 IgG 及び IgM 値は、4 群でほぼ同程度の値を示した。

今回測定した各種サイトカイン mRNA 発現量にも 4 群間で明確な差異を認めなかった。

病理所見は、図 10 が CC 群の、図 11 が Br 群の、図 12 が O 群、図 13 が Br+O 群の

肺組織 HE 染色像である。Br 群では、気管支粘膜下にやや軽度の炎症細胞浸潤（リンパ球）を認めた。粘膜上皮の増生はごく軽度であった。CC+O 群では、気管支粘膜下に軽度の炎症細胞浸潤が認められたが、Br+O 群では気管支粘膜下と血管周囲にリンパ球や好中球など炎症細胞の浸潤を認め、粘膜上皮の軽度な増生も認めた。

3 群間の炎症の程度の比較では、老齢動物と同様に、CC+O 群<Br 群<Br+O 群の順であった。。

実験（1）の老齢マウスと実験（2）の若齢マウスの炎症の程度を比較した場合は、CC+O 群と Br 群では若齢と老齢間で明確な差を認めなかったが、Br+O 群では若齢に比較して老齢マウスでその影響は大であった。

（3）老齢急性気管支炎マウスの回復時の免疫指標などの変化に関する実験（表 28-34, 図 14-16）

24 か月齢の C57/BL 雄性マウスを用いて、急性気管支炎からの回復時の免疫指標の変動について検討した。実験プロトコールを表 28 に示した。実験（1）と同様な方法で急性気管支炎モデルマウスを作成し、最終塩化ニッケル暴露後、清浄空気下で飼育した。最終塩化ニッケル暴露 3 日後 (Post-3 day) と 6 日後 (Post-6 day) に屠殺した。

体重は、Post-3 day の Br 群で CC 群に比較して有意に低値を示したが、Post-6 day では回復し、CC 群との間に有意差は認めなかった。急性気管支炎発症時の脾臓 Asialo GM1 陽性細胞率の増加は、Post-3 day 及び Post-6 day 共に CC 群と Br 群間に差を認めず、正常範囲に復したものと考えられた。一方、Post-3 day と Post-6 day の Br 群では CC 群と比較し Ly1 陽性細胞の減少と、Post-6 day での B-cell 陽性率と CD4/CD8 の低下を認めた。

BALF の分析では、Post-3 day Br 群で総細胞数が有意に高値を示したが、Post-6 day Br 群では CC 群間とに有意差を認めず、急性気管支炎発症に伴い増加した総蛋白量、細胞分画像での好中球分画の増加とそれに伴う肺泡マクロファージ分画の減少の程度が経時的に改善されていることから、速やかに急性気管支炎から回復しているものと推測された。

体液性免疫については、BALF 中 IgA 値の平均値は CC 群に比較して高い値を示したが、バラツキが大きく有意な差ではなかった。この結果は、急性炎症の回復時の程度に個体差があることを示しているものと考えられた。血清 IgM は、Post-3 day, Post-6 day においても CC 群に比較して Br 群で有意に高値を示したが、その程度は Post-3 day に比し Post-6 day で有意に低値であった。

サイトカイン mRNA 発現量は、Post-3 day Br 群で MCP-3 mRNA 発現が CC 群に比較して高値を示したが、Post-6 day では Br 群と CC 群間に有意差は認めなかった。

病理所見は、図 14 が CC 群、図 15 が Post-3 day の Br 群、図 16 が Post-6 day の Br 群の肺組織 HE 染色像である。Post-3 day 及び Post-6 day の Br 群ではいずれも気管支粘膜下に炎症細胞（特にリンパ球）の浸潤を認めたが、その程度は Post-3 day Br 群に比較して Post-6 day Br 群で軽度であった。

（3）老齢気管支炎マウスへの低濃度五酸化バナジウム、オゾン、関東ローソク粉の短

期暴露時の免疫指標の変動に関する実験（表35-47、図47-21）

24か月齢のC57/BL雄性マウスを用いて実験を行った。全ての実験動物に（1）と同様に塩化ニッケル暴露を5日間行い、急性気管支炎を発症させた。最終塩化ニッケル暴露終了後、Br+K群には関東ローム粉の懸濁液アエロゾルを3時間暴露、Br+V群には五酸化バナジウム飽和液アエロゾルを3時間暴露した。実験動物は、暴露実験終了24時間後に屠殺した。実験プロトコールを表35に示した。

肺組織でとり込まれたニッケル量を、湿式灰化後に溶解して、GFAASによって測定した（表36）。肺組織沈着量には3群間で有意な差は認めなかった。一方、バナジウムの沈着量についても同様な手法で測定した結果、Br+V群でのみdry lung 1gあたり約1.1mgのバナジウムが検出された。

Br, Br+K, Br+V群間では、体重、脾臓および胸線の体重比、脾細胞分析結果に著しい差は認めなかった。BALF分析では、いずれの群でも総細胞数の増加を認めたが、細胞分画でBr+K群の好中球分画の顕著な増加を認めた。

BALF中IgA値、血清中IgG及びIgM値にも3群間で有意な差は認めなかった。肺組織での各種サイトカインmRNA発現に関する検討では、Br群に比較してBr+V群でMCP-3とMIP-1 α mRNA発現量の低下を、Br+K群でMIP-1 α mRNA発現量の低下を認めた。MIP-1 α mRNA発現量の低下は、Br+K群に比しBr+V群で大であった。

呼吸パターンの変化については表44-46に成績をまとめた。呼吸数と一回換気量には3群間に有意差を認めなかったが、Br+V群で分時換気量の低下を認めた。Methacholineに対する反応性についての検討ではBr群に比し、Br+K群とBr+V群で一回換気量と分時換気量の濃度依存性の低下傾向を認め、その傾向はBr+K群よりもBr+V群で大であった。

病理所見は、図17がBr群、図18-19がBr+K群、図20-21がBr+V群の肺組織HE染色像である。Br群では気管支粘膜下への炎症細胞浸潤が認められた。それに加えてBr+K群では、血管周囲にリンパ球および軽度の好中球と肺胞内で肺泡マクロファージが散見された。Br+V群では、Br+K群と同様に気管支粘膜下と血管周囲に炎症細胞を認めたが、血管周囲での好中球の出現がBr+K群に比しやや多く見られた。炎症細胞浸潤の程度は、Br群<Br+K群<Br+V群の順であった。

[考察]

動物では気管支分泌細胞の種類やその分布がヒトと異なるため、適切な気管支炎モデル動物が確立されていないのが現状である。代表的な動物慢性気管支炎モデルとしては、1983年にReidら(7)によって報告された50ppmSO₂暴露によるラット気管支炎モデルがあるが、我々はこの条件下で慢性気管支炎ラットを作成することはできなかった。最近京野らによって報告され(1)、我々もその開発に関与した塩化ニッケル気管支炎モデルは、ヒト気管支炎に類似した病理、生化学所見を示すが、免疫系の関与や変動についての検討は未だ十分に検討されていない。我々は、気管支炎の発症と進展について肺泡マクロファージを介した非特異的免疫応答と体液性免疫の関与を示唆する知見を既に得ていることから、本モデルの使用は慢性気管支炎のメカニズムを免疫応答から解明するうえで有用な1つのモデルと考えている。

現在、高齢化社会に向けて老化に関する各種研究が広い領域で行われているが、呼吸器疾患への免疫系の影響についての成績は未だ十分に蓄積されていない。疫学調査から、高齢者は各種生体反応の低下によって、汚染物質暴露に対しリスクが高くなることが示唆されているが、これまで慢性気管支炎への加齢や免疫応答の関与について、動物疾患モデルで詳細に検索した報告は少ない。また、老齢動物への低濃度汚染物質短期間暴露による生体影響を多面的に検討し、鋭敏な指標を示した報告は Evans らの NO₂ に関する報告(8)のみである。

そこで我々は、若齢および老齢マウスを用いて急性気管支炎モデルを作成し、免疫系指標に重点を置き検討し、下記の点を明かにした。

(1) 加齢影響を受ける免疫指標として適切なものはどのような指標か

細胞性免疫指標：脾臓細胞、胸腺細胞、B-cell, T-cell (CD4/CD8) 等
体液性細胞：BAL IgA, 血清各種免疫グロブリン

(2) 若齢と老齢急性気管支炎モデルでの気管支炎発症・進展時の細胞性及び体液性免疫系への影響とその差異

表 48 に、7 週齢急性気管支炎マウスと 24 か月齢急性気管支炎マウスでの各種パラメータの変動についてまとめた。肺病理所見では若齢と老齢急性気管支炎マウスの炎症の程度はほぼ同程度であった。しかしながら、若齢気管支炎マウスでは体液性および細胞性免疫の変動は軽度であり、胸腺重量の明らかな増加が認められたのに対して、老齢気管支炎マウスでは、体液性及び細胞性免疫関連指標で明らかな変動が認められた。この点は、塩化ニッケルに対する加齢影響と考えられた。急性気管支炎モデルでは、特に肺の細胞及び免疫グロブリンの変動が著しく観察されたが、血清中の免疫グロブリンの変動も認めることから、高齢呼吸器疾患モデルを用いた環境有害物質の影響評価においては、局所のみならず循環器系の免疫指標の変動についても評価する必要があることが示唆された。

(3) 老齢急性気管支炎モデルでの低濃度五酸化バナジウム、オゾン、関東ローム粉短期暴露時の免疫指標の変動

表 49 に、急性気管支炎発症老齢マウスに 3 種の環境有害物質を暴露した際の、免疫指標の変動についてのまとめた。これら 3 種の暴露物質の暴露条件が必ずしも同一ではないので、正確に比較することは困難であるが、オゾン暴露では免疫グロブリン系の変動が、関東ローム粉とバナジウムアエロゾルでは局所での細胞免疫指標の変動が観察されたことは、ガス状物質と粒子状物質の差異を反映した結果と考えられた。加えて、関東ローム粉は難溶性物質であり、吸入後速やかに肺胞マクロファージで貪食され、かつ好中球の炎症部位への遊走も著しい(9)が、バナジウムも難易溶性物質ではあるが関東ローム粉に比べてその肺毒性は高く、吸入後の肺での影響が暴露終了 24 時間以降に遅延して認められることがラット急性気管支炎モデルで観察されている。(10)。従って、関東ローム粉とバナジウムの免疫系への影響の差異は、エアロゾルの肺内動態を反映した結果と考えられた。

(4) 加齢による免疫応答の変化が気管支炎発症・進展の制御因子となるか？ その際の肺免疫担当細胞としての肺胞マクロファージ及びT細胞によるサイトカイン産生・分泌等を通じた相互関係はどのようなものか？

今回得られた実験成績は、体液性及び細胞性免疫指標が加齢影響を受けて変動することを示しており、これらの指標の中には急性気管支炎発症あるいは回復時に明らかに影響を受けるものが認められた。従って、加齢による免疫応答の変化は、急性気管支炎発症と進展の制御因子の一部となりえることが示唆された。

今回遺伝子レベルで検討したサイトカインの種類は、サイトカインカスケードに含まれる一部のものであり、肺胞マクロファージ及びT細胞によるサイトカイン産生・分泌等を介した相互関係まで明確詳細には検討出来なかった。この点は、今後の課題といえよう。

(5) 総括

今回我々は、塩化ニッケル暴露による急性気管支炎モデルラットの条件をもとに急性気管支炎モデルマウスの作成を試みた。その結果、ほぼラットの急性気管支炎モデルに類似したモデルを作成することができた。しかしながら、本塩化ニッケル誘導急性気管支炎モデルでは、5日間の塩化ニッケル暴露濃度条件を一定としても必ずしも同程度の急性気管支炎モデルが作成できるわけではなかった。この点は、今後本モデルを使用する際の注意点といえよう。加えて、塩化ニッケルに対する反応性が若齢と老齢マウスでは異なることから、急性気管支炎作成時にはこの点も考慮すべきであろう。血清グロブリンについては、ラット急性気管支炎モデルでは明らかな変動を認めていない(10)。しかしながら、今回使用したC57/BLマウスでは明らかな影響を認めたことから、この相違は動物種や系統差による可能性が考えられる。呼吸パターンについても急性気管支炎ラットでは、呼吸数、一回換気量及び分時換気量の増加(1)や、メサコリンに対する反応性の亢進(11)が報告されている。老齢マウス急性気管支炎では一回換気量の増加は認めたものの顕著な呼吸パターンの変化やメサコリンに対する反応性の亢進は認めなかった。この点についても使用した動物種の違いや週齢が大きく影響しているものと思われた。

[まとめ]

- 1.免疫系指標は加齢影響を受ける。従って、若齢や老齢動物を使用して環境有害物質の健康影響を評価する際には、免疫と関わり深い宿種抵抗性、回復力、防衛反応なども十分に考慮して指標を選定し、その毒性影響を評価する必要がある。
- 2.塩化ニッケル誘導急性気管支炎モデルは、マウスでもラットと同様に作成することができる。但し、塩化ニッケルによる急性気管支炎モデルは暴露条件が同一であっても常に同程度の病態モデルができるわけではない。また、使用動物の週齢等によっても影響を受ける。
- 3.急性気管支炎によって免疫系指標は影響を受ける。その影響は、細胞性および体液性免疫の両指標に見られる。
- 4.高齢呼吸器疾患モデルを用いた環境有害物質の影響評価においては、肺傷害関連指標のみならず、適切な免疫系指標による評価も考慮すべきであり、かつ局所的免疫指標のみならず体液性免疫指標も評価指標として加える必要があることが示唆された。

[引用文献]

- (1)Kyono H, Serita F, Toya T, Kubota H, Arito H, Takahashi M, Maruyama R, Honma K, Ohta H, Yamauchi Y, Nakakita M, Seki, Y, Ishihara Y, Kagawa J: A new model rat with acute bronchiolitis and its application to research on the toxicology of inhaled particle matter. *Ind Health*, 37:47, 1999
- (2)Bartlett DJ, Tenney SM: Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol*, 10:384-395, 1970
- (3)Pappenheimer JR: Sleep and respiration of rats during hypoxia. *J Physiol (Lond)* 266:191-207, 1977
- (4)Drorbaugh JE, Fenn WO: A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16:81-87, 1955
- (5)Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: protein measurement with the Folin phenol reagents. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951
- (6)Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- (7)Lamb D, Reid LM: Mitotic rats, goblet cell increased and histochemical changes in mucus in rat bronchial epithelium during exposure to sulphur dioxide. *J Path Cact*, 96:97-111, 1968
- (8)Evans MJ, Cabral-Anderson LJ, Freeman G: Effects of NO₂ on the lungs of aging rats II. Cell Proliferation. *Exp Mol Pathol*, 27:366-376, 1977
- (9)粒子とスギ花粉症-実験動物を用いた粒子とスギ花粉の混合暴露実験、財団法人日本自動車研究所、2000、p97-126
- (10)京野洋子、芹田富美雄、久保田久代、戸谷忠雄、中喜多実、山内洋司、太田久吉、関幸雄、石原陽子、香川順、丸山良子：呼吸器疾患モデル動物を用いた環境汚染物質の生体影響評価手法の開発に関する研究、環境庁企画調整局環境技術課環境保全成果報告書、平成7年度、p.1-44
- (11)内山巖、神馬征峰、荒川はつ子、有藤平八郎、京野洋子、芹田富美雄、本間克典：NO_xの健康影響に関する研究、公害健康被害補償予防協会業務報告書、平成元年、p21-41

表1 濾紙上に補集されたニッケルの定量

サンプル：直径 6cm グラスウール濾紙

処理法：0.01M HNO₃ 溶液に浸析攪拌、5分 (30分間でも変わらない)

処理液を 13,000rpm、7min でグラスウールを落として、上澄を AA 測定

AA 測定：フレイム原子吸光法

測定器：日本ジャーレルアッシュ製 AA845

モード：C₂H₂ Air flame, peak hight,

測定年月日：H11.5.28 7.21(1999)

測定結果：ニッケル量は濾紙 1 枚分の量を示す

0.2%NiCl ₂		2%NiCl ₂		0.1%NiCl ₂	
濾紙 No	ニッケル量 (mg)	濾紙 No	ニッケル量 (mg)	濾紙 No	ニッケル量 (mg)
0	0	BL	0	0	0.00
1	0	0	0.05	1	0.00
2	0.02	1	0.09	2	0.00
3	0.15	2	0.31	3	0.035
4	0.97	3	2.50	4	0.183
5	1.26	4	5.73	5	0.225
6	0.89	5	2.38	6	0.143
7	0.07	6	1.05	7	0.03
BC	0	7	0.05	8	0.03
TO	0	TO	0.03		

Table 2

Characteristics of Kanto loam dust

Chemical component	wt%
SiO ₂	34-40
Fe ₂ O ₃	17-23
Al ₂ O ₃	26-32
CaO	0-3
MgO	3-7
TiO ₂	0-4
Particle size distribution (µm)	wt%
>1	65+5
>2	50+5
>4	22+3
>6	8+3
>8	3+3
Range of the 50% mass median aerodynamic diameter (µm)	1.6-2.3
Density (g/cm ²)	2.9-3.1

Table 3

Principal ingredients of Kanto loam dust

Elements		Kanto loam dust
Aluminium	%	14
Boron	%	0.024
Calcium	%	0.22
Total chromium	%	0.01
iron	%	12
Total phosphorus	%	0.024
Lead	%	0.003
Zinc	%	0.019
Nickel	%	0.005
Total carbon	%	3.9
Total sulfur	%	0.032
Total silica	%	18.5

表4 サイトメトリ一用細胞染色抗体

item	Antibody
B-cell	Monoclonal antibody mouse CD45R (Beckman Coulter)
NK1.1	Mouse(C3H x Balb/c) Anti-mouse NK1.1 (Southern Biotec Associ Inc)
L3T4	Monoclonal antibody mouse CD4 (Beckman Coulter)
Ly1	Monoclonal antibody mouse CD5 (Beckman Coulter)
Ly2	Monoclonal antibody mouse CD8 Beckman Coulter)
Th1.2	Monoclonal antibody mouse CD90 (Beckman Coulter)
Asialo GM1	Anti asialo GM1 (Rabbit) (Wako Pure Chemical Ind) Affinity Isolated Goat antibodies anti-(rabbit immunoglobulines) Gamma & Light Chains (Biosource International)

Table 5. Oringonucleotide RT-PCR primers for murin cytokine and beta-actin

	product size (bp)	5' primers	3'primers
TNF-alpha	253	AGTGGTGCCAGCCGATGGGTGT	GCTGAGTTGGTCCCCCTTCTCCAG
IL-1alpha	288	TGGAATCCAGGGGAACACTG	CTCTAGAGCACCATGCTACAGAC
IL-1beta	382	GAGCTTCAGGCAGGCAGTATC	GTATAGATTCTTCCITTTGAGGC
MCP-1	242	CACCAAGCTCAAGAGAGAGA	TTCTCTGTCACACTGGTCAC
MCP-3	382	GGTACCACTCTCTTCTCCACCATG	AAGCTTACAGCGGTGAGGAATTTTGC
MIP-1alpha	189	GATGTATTCTTGGACCCAGGT	TATGGAGCTGACACCCCGAC
RANTES	190	ACCTGCCTCCCATATGGCT	GTATTCTTGAACCCACTTCTTC
beta-actin	528	ACCGTGAAAAGATGACCCAG	TACGGATGACAACGTCACAC

表6 RT-PCR条件

item	denaturation (°C x min)	annealing (°C x min)	extension (°C x min)	cycle
TNF-alpha	94 x 1'	64 x 1'	72 x 1'	28
MIP-1alpha	94 x 1'	64 x 1'	72 x 2'	28
MCP-3	94 x 1'	64 x 1'	72 x 2'	28
IL-1beta	94 x 1'	64 x 1'	72 x 2'	32
beta-Actin	94 x 1'	64 x 1'	72 x 2'	24

Table 7

C57/BL (male)		Spleen/B.W.	Thymus/B.W.	Splenic cell	Ly1(%)	CD4/CD8	Asialo GM1(%)
Age	Body weight (g)			B-cell (%)			
10 D	4.8±0.9	0.005±0.001	0.008±0.001	22.4±8.3	4.5±2.4	3.8±3.7	N.A.
7 W	16.3±0.6	0.003±0.001	0.004±0.000	55.3±2.4	16.7±1.7	2.0±0.2	52.4±1.3
3M	25.0±0.2	0.002±0.000	0.002±0.003	57.7±0.6	25.6±3.1	2.0±0.4	37.6±6.5
2Y	31.4±0.8	0.005±0.005	0.001±0.000	40.4±1.2	8.7±1.1	1.7±0.3	30.0±4.6

Table 8

C57/BL (male)

Age	BAL Ig A (ug/ml)	Plasma Ig G (mg/ml)	Plasma Ig M (mg/ml)
7W	0.97±0.06	0.29±0.06	0.02±0.00
2Y	3.33±1.70	0.43±0.07	0.08±0.03

Table 9

Baseline of ventilation, tidal volume and respiratory minute volume

C57/BL

Age	Body weight (g)	Ventilation (breaths/min)	Tidal volume (ml BTPS/100 g B.W.)	Respiratory minute volume (ml BTPS/min/100 g B.W.)
1M	18.5±1.0	283.5±23.4	0.42±0.09	120.0±33.1
3M	29.3±3.8	306.0±66.3	0.56±0.11	169.9±43.4
2Y	31.4±0.8	252.0±26.8	0.55±0.09	137.8±29.3

Table 10

Experimental design (Exp.#1) and sampling time after Ni and/or 0.8 ppm ozone exposure

Group/ Day	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Normal control: CC	Air	Air	Air	Air	Air	SC
Normal+ozone:C+O	Air	Air	Air	Air	Ozone	SC
Bronchiolitis control:Br	0.13% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	SC
Bronchiolitis+ozone:Br+O	0.13% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni + Ozone*	SC

Daily exposure time was 10:00 a.m. to 11:00 a.m.

Ozone*: 0.8 ppm ozone exposed for one hour after the last Ni exposure

SC: animals were sacrificed 24 hours after the last exposure.

N=5 for BALF and blood, and 2-3 for histopathology

Table 11

Effects of 0.8 ppm ozone exposure on body weight, weights of spleen and thymus in aged mice with or without bronchiolitis (Exp.#1)

mean±SD	B.W. (g)	spleen (g)	thymus (g)	spleen/BW	Thymus/B.W.
CC (n=4)	31.4±0.8	0.17±0.16	0.03±0.01	0.005±0.005	0.0010±0.0002
C+O	31.1±2.1	0.10±0.02	0.02±0.01	0.003±0.001	0.0007±0.0002
(n=5) Br	26.1±3.2	0.07±0.03	0.01±0.00	0.003±0.002	0.0005±0.0001
(n=5) Br+O	28.4±1.4	0.06±0.01	0.02±0.01	0.002±0.000	0.0007±0.0002
(n=4)					

Table 12

Analysis of splenic cells in aged mice with and without bronchiolitis
(Exp.#1)

	mean (%)±SD	B-cell	L3T4 (CD4)	Ly1	Ly2 (CD8)	CD4/CD8	Asialo GM1
CC (n=4)	40.4±1.2	29.1±3.9	8.7±1.1	17.2±4.4	1.7±0.3	30.0±4.6	
C+O (n=5)	38.6±5.5	28.5±4.8	8.6±3.0	15.6±2.7	1.8±0.2	35.5±4.5	
Br (n=5)	43.7±6.7	32.1±4.4	9.1±2.1	20.3±7.1	1.7±0.5	45.9±8.3*	
Br+O (n=4)	47.2±1.9*	35.8±3.9	11.6±1.2	19.7±3.4	1.9±0.4	44.0±3.6*	

*:p<0.05 vs CC group

Table 13

Analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in aged mice with and without bronchiolitis (Exp.#1)

mean±SD	Recovery (%)	Total cell (x10 ⁵ /ml)	Total protein (mg/ml)	Cell differential (%) pulmonary macrophage	Neutrophil	Lymphocyte
CC (n=5)	73.3±11.6	8.7±3.8	0.77±0.26	96.7±1.5	2.0±1.0	1.3±1.2
C+O (n=5)	67.5±9.6	9.8±5.1	0.6±0.20	98.2±1.0	0.8±0.5	1.0±1.4
Br (n=4)	54.0±20.7	9.2±4.0	3.7±1.1*	75.8±8.9*	21.6±7.8*	2.6±2.5
Br+O (n=4)	65.0±5.8	37.0±43.8**	4.7±1.6*	73.0±5.7*	25.3±5.3*	1.8±1.3

*:p<0.05 vs the CC and C+O groups

** :p<0.05 vs the Br group

Table 14

Exp.1 The effect of 0.8 ppm ozone exposure on BAL Ig A
in aged mice with or without acute bronchiolitis

	<u>mice without acute bronchiolitis</u>		<u>mice with acute bronchiolitis</u>	
	Control (n=5)	Ozone (n=5)	Control (n=5)	Ozone (n=5)
Ig A ($\mu\text{g/ml}$)	3.33 \pm 1.70	3.44 \pm 1.88	14.5 \pm 3.32*	24.5 \pm 6.24*

*: p<0.05 vs Control and Ozone groups in mice without acute bronchiolitis

Table 15

Exp.1 The effect of 0.8 ppm ozone exposure on plasma Ig G and M in aged mice with or without acute bronchiolitis

group	mice without acute bronchiolitis		mice with acute bronchiolitis	
	Control (n=5)	Ozone (n=5)	Control (n=5)	Ozone (n=5)
Ig G (mg/ml)	0.425±0.07	0.472±0.06	0.480±0.114	0.470±0.03
Ig M (mg/ml)	0.083±0.03	0.098±0.03	0.144±0.06*	0.120±0.02*

*: p<0.05 vs Control and Ozone groups in mice without acute bronchiolitis

Table 16

Expression of various cytokine mRNA in lung tissues (Exp.#1)

Group	Ratio of cytokine mRNA to beta-actin mRNA			
	TNF-alpha	IL-1beta	MCP-3	MIP-1 alpha
CC (n=4)	0.32±0.14	1.37±0.82	0.18±0.13	0.06±0.02
C+O (n=5)	0.22±0.04	0.76±0.30	0.21±0.04	0.09±0.06
Br (n=5)	0.32±0.20	0.92±0.30	0.93±0.29*	0.74±0.45*
Br+O (n=4)	0.35±0.220	0.88±0.14	0.85±0.04*	0.69±0.15*

*:p<0.05 vs the CC and C+O groups

Table 17

Baseline of ventilation, tidal volume and respiratory minute volume in normal and bronchiolitis aged mice exposed to 0.8 ppm ozone

Group	Body weight (g)	Ventilation (breaths/min)	Tidal volume (ml BTPS/100 g B.W.)	Respiratory minute volume (ml BTPS/min/100g B.W.)	
Normal	Control (n=5)	30.50±3.53	252.0±26.8	0.545±0.086	137.8±29.3
	Ozone (n=5)	31.23±1.66	216.0±25.1	0.699±0.125	152.1±38.0
Bronchiolitis	Control (n=5)	27.64±3.33	240.0±0.0	0.815±0.179*	195.7±43.1
	Ozone (n=5)	30.04±1.59	210.0±34.6	0.853±0.174*	175.7±22.3

*: p<0.05 vs Normal group without ozone exposure

Table 18

Changes of ventilation after inhalation of methacholine aerosol in normal and bronchiolitis aged mice exposed to 0.8 ppm ozone

Methacholine ($\mu\text{g/ml}$)	Normal (breaths/min)		Bronchiolitis (breaths/min)	
	Control (n=5)	Ozone (n=5)	Control (n=5)	Ozone (n=5)
0.1	252.0 \pm 26.8	216.0 \pm 57.7	240.0 \pm 42.4	202.5 \pm 15.0
1.0	282.3 \pm 50.2	204.0 \pm 32.9	234.0 \pm 32.9	210.0 \pm 24.5
10.0	264.5 \pm 32.9	210.0 \pm 30.0	270.3 \pm 42.4	195.0 \pm 38.7
100.0	270.0 \pm 60.0	204.0 \pm 25.1	252.3 \pm 34.2	270.0 \pm 60.0

Table 19

Changes of tidal volume after inhalation of methacholine aerosol in normal and bronchiolitis aged mice exposed to 0.8 ppm ozone

Methacholine ($\mu\text{g/ml}$)	Normal (ml BTPS/100 g B.W.)		Bronchiolitis (ml BTPS/100 g B.W.)	
	Control (n=5)	Ozone (n=5)	Control (n=5)	Ozone (n=5)
0.1	0.504 \pm 0.092	0.721 \pm 0.300	0.788 \pm 0.238	0.905 \pm 0.070
1.0	0.399 \pm 0.008	0.702 \pm 0.205	0.708 \pm 0.145	0.854 \pm 0.052
10.0	0.451 \pm 0.138	0.708 \pm 0.122	0.684 \pm 0.114	0.851 \pm 0.148
100.0	0.436 \pm 0.192	0.766 \pm 0.140	0.707 \pm 0.136	0.930 \pm 0.118

Table 20

Changes of respiratory minute volume after inhalation of methacholine aerosol in normal and bronchiolitis aged mice exposed to 0.8 ppm ozone

Methacholine ($\mu\text{g/ml}$)	Normal (ml BTPS/min/100 g B.W.)		Bronchiolitis (ml BTPS/min/100 g B.W.)	
	Control (n=5)	Ozone (n=5)	Control (n=5)	Ozone (n=5)
0.1	137.8 \pm 29.3	146.2 \pm 46.3	188.1 \pm 60.1	183.7 \pm 25.1
1.0	179.6 \pm 25.5	140.4 \pm 31.9	163.7 \pm 32.3	179.6 \pm 25.5
10.0	162.2 \pm 19.0	148.1 \pm 30.5	183.0 \pm 37.2	162.2 \pm 19.0
100.0	178.2 \pm 18.5	155.8 \pm 30.2	177.1 \pm 38.2	178.2 \pm 18.5

Table 21

Experimental design (Exp.#2) and sampling time after Ni and/or 0.8 ppm ozone exposure

Group/ Day	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Normal control: CC	Air	Air	Air	Air	Air	SC
Normal+ozone:C+O	Air	Air	Air	Air	Ozone	SC
Bronchiolitis control: Br	0.13% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	SC
Bronchiolitis+ozone: Br+O	0.13% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni + Ozone*	SC

Daily exposure time was 10:00 a.m. to 11:00 a.m.

Ozone*: 0.8 ppm ozone exposed for one hour after the last Ni exposure

SC: animals were sacrificed 24 hours after the last exposure.

N=5 for BALF and blood, and 2-3 for histopathology

Table 22

Effects of 0.8 ppm ozone exposure on body weight, weights of spleen and thymus in 7-weeks old mice with or without bronchiolitis (Exp.#2)

mean±SD	B. W. (g)	spleen (g)	thymus (g)	spleen/BW	Thymus/B. W.
CC (n=5)	16.3±0.6	0.05±0.01	0.07±0.00	0.003±0.001	0.004±0.000
C+O (n=5)	16.2±0.7	0.04±0.00	0.06±0.01	0.003±0.000	0.004±0.000
Br (n=5)	16.1±0.7	0.04±0.00	0.05±0.01*	0.003±0.000	0.003±0.001*
Br+O (n=5)	15.1±0.7	0.04±0.00	0.04±0.00*	0.003±0.000	0.003±0.000*

*: p<0.05 vs the CC and C+O group

Table 23

Analysis of splenic cells in 7-weeks old mice with and without bronchiolitis (Exp.#2)

	mean (%)±SD	B-cell	L3T4 (CD4)	Ly1	Ly2 (CD8)	CD4/CD8	Asialo GM1
CC (n=5)	55.3±2.4	41.6±3.8	16.7±1.7	20.8±1.9	2.0±0.2	52.4±1.3	
C+O (n=5)	54.3±2.8	41.7±3.0	17.1±1.8	21.6±2.9	2.0±0.2	55.8±1.7	
Br (n=5)	59.4±3.6	40.9±2.1	18.8±2.8	24.3±1.6	1.7±0.1	55.1±4.0	
Br+O (n=5)	53.3±3.8	43.1±2.1	17.8±2.9	22.1±1.7	2.0±0.3	56.9±4.6	

Table 24

Analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in 7-weeks old mice with and without bronchiolitis (Exp.#2)

mean±SD	Recovery (%)	Total cell (x10 ⁵ /ml)	Total protein (mg/ml)	Cell differential (%) pulmonary macrophage	Neutrophil	Lymphocyte
CC (n=5)	83.3±0.0	5.6±2.1	0.76±0.27	99.8±0.5	0±0	0±0
C+O (n=5)	83.3±0.0	7.0±3.2	0.96±0.20	98.5±0.6	0±0	1.5±0.6
Br (n=5)	83.3±0.0	8.8±0.8	3.66±1.14*	90.5±4.7*	7.8±3.3*	1.8±1.7
Br+O (n=5)	83.3±0.0	8.8±0.8	4.70±1.61*	87.8±4.6*	11.5±4.1*	0.8±1.0

*:p<0.05 vs the CC and C+O groups

Table 25

Exp.2. The effect of 0.8 ppm ozone exposure on BAL Ig A in 7-weeks old mice with or without acute bronchiolitis

	mice without acute bronchiolitis	mice with acute bronchiolitis
	Control (n=5)	Control (n=5)
	Ozone (n=5)	Ozone (n=5)
Ig A ($\mu\text{g/ml}$)	0.97 \pm 0.06	1.06 \pm 0.13
		1.28 \pm 0.11*

*: p<0.05 vs Control and Ozone groups in mice without acute bronchiolitis

Table 26

Exp.2 The effect of 0.8 ppm ozone exposure on plasma Ig G and M
in 7-weeks old mice with or without acute bronchiolitis

group	mice without acute bronchiolitis		mice with acute bronchiolitis	
	Control (n=5)	Ozone (n=5)	Control (n=5)	Ozone (n=5)
Ig G (mg/ml)	0.290±0.060	0.298±0.07	0.348±0.073	0.358±0.025
Ig M (mg/ml)	0.021±0.002	0.022±0.001	0.027±0.002	0.025±0.003

Table 27

Expression of various cytokine mRNA in lung tissues (Exp.#2)

Group	Ratio of cytokine mRNA to beta-actin mRNA			
	TNF-alpha	IL-1beta	MCP-3	MIP-1alpha
CC (n=5)	1.08±0.17	1.78±0.56	0.74±0.10	0.13±0.04
C+O (n=5)	0.25±0.13	1.9±0.70	0.58±0.23	0.11±0.05
Br (n=5)	0.21±0.06	1.09±1.06	1.01±0.62	0.24±0.21
Br+O (n=5)	0.14±0.04	1.47±0.79	0.57±0.30	0.19±0.06

Table 28

Experimental design (Exp.# 3) and sampling time after Ni exposure

Group/ Day	Day 1	Day 2-5	Day 8	Day 11
Bronchitis control: Br	0.13% Ni	0.09% Ni	Post day-3	Post day-6
Normal control:CC	Air	Air	CC day-3	CC day-6

Daily exposure time was 10:00 a.m. to 11:00 a.m.
N=5 for BALF and blood, and 2-3 for histopathology

Table 29

The changes of various parameters during restoration in aged mice with or without bronchiolitis (Exp.#3)

mean±SD	B.W. (g)	spleen (g)	thymus (g)	spleen/BW	Thymus/B.W.
Post-day 3					
CC (n=5)	27.9±2.6	0.09±0.02	0.04±0.01	0.003±0.001	0.002±0.000
Br (n=5)	22.4±1.6*	0.11±0.07	0.02±0.01	0.005±0.003	0.001±0.000
Post-day 6					
CC (n=4)	27.4±0.6	0.10±0.03	0.04±0.01	0.004±0.001	0.002±0.000
Br (n=4)	26.5±3.7	0.08±0.00	0.03±0.01	0.003±0.000	0.001±0.001

Table 30

Analysis of splenic cells during restoration term in aged mice with bronchiolitis (Exp.#3)

mean (%)±SD	B-cell	L3T4 (CD4)	Ly1	Ly2 (CD8)	CD4/CD8	NK1.1	Asialo GM1
Post-day 3 CC (n=5)	48.1±2.9	45.1±7.4	9.6±3.5	22.0±3.0	2.1±0.3	4.9±0.5	59.5±5.8
Br (n=5)	46.4±17.1	38.4±5.6	5.3±1.9*	17.7±6.0	2.4±0.7	4.2±0.5	57.1±7.1
Post-day 6 CC (n=4)	45.1±3.4	40.4±1.1	8.3±1.9	17.7±2.2	2.3±0.3	5.0±0.2	50.0±2.2
Br (n=4)	37.7±2.0*	31.2±3.3*	5.8±0.7*	18.7±2.0	1.7±0.1*	4.8±0.5	48.1±5.5

*:p<0.05 corresponding the CC group

Table 29

The changes of various parameters during restoration in aged mice with or without bronchiolitis (Exp.#3)

mean±SD	B.W. (g)	spleen (g)	thymus (g)	speen/BW	Thymus/B.W.
Post-day 3					
CC (n=5)	27.9±2.6	0.09±0.02	0.04±0.01	0.003±0.001	0.002±0.000
Br (n=5)	22.4±1.6*	0.11±0.07	0.02±0.01	0.005±0.003	0.001±0.000
Post-day 6					
CC (n=4)	27.4±0.6	0.10±0.03	0.04±0.01	0.004±0.001	0.002±0.000
Br (n=4)	26.5±3.7	0.08±0.00	0.03±0.01	0.003±0.000	0.001±0.001

Table 30

Analysis of splenic cells during restoration term in aged mice with bronchiolitis (Exp.#3)

mean (%)±SD	B-cell	L3T4 (CD4)	Ly1	Ly2 (CD8)	CD4/CD8	NK1.1	Asialo GM1
Post-day 3 CC (n=5)	48.1±2.9	45.1±7.4	9.6±3.5	22.0±3.0	2.1±0.3	4.9±0.5	59.5±5.8
Br (n=5)	46.4±17.1	38.4±5.6	5.3±1.9*	17.7±6.0	2.4±0.7	4.2±0.5	57.1±7.1
Post-day 6 CC (n=4)	45.1±3.4	40.4±1.1	8.3±1.9	17.7±2.2	2.3±0.3	5.0±0.2	50.0±2.2
Br (n=4)	37.7±2.0*	31.2±3.3*	5.8±0.7*	18.7±2.0	1.7±0.1*	4.8±0.5	48.1±5.5

*:p<0.05 corresponding the CC group

Table 31

Analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in aged mice with bronchiolitis (Exp.#3)

mean±SD	Recovery (%)	Total cell (x10 ⁵ /ml)	Total protein (mg/ml)	Cell differential (%) pulmonary macrophage	Neutrophil	Lymphocyte
Post-day 3						
CC (n=5)	74.0±5.5	7.8±3.0	0.785±0.181	95.0±3.6	2.0±2.0	3.0±1.7
Br (n=5)	76.0±5.5	11.4±5.5*	2.332±0.811*	68.0±24.1*	28.5±25.0*	3.5±1.3
Post-day 6						
CC (n=4)	76.7±5.8	5.3±0.6	0.460±0.087	95.5±1.0	0.8±0.5	3.8±0.5
Br (n=4)	70.0±11.5	6.5±1.3	1.182±0.137*	80.0±8.7*	11.3±5.0*	8.8±4.6

*.p<0.05 vs the CC and C+O groups

Table 32

Exp.3 The change of BAL Ig A during restoration
in aged mice with acute bronchiolitis

	Day after the last NiCl exposure	
	Day 3 (n=5)	Day 6 (n=5)
Ig A (ug/ml)	3.84±2.14	9.42±7.97
		9.55±3.00

Table 33

Exp. 3 The changes of plasma Ig G and M during restoration
in aged mice with acute bronchiolitis

	Normal (n=5)	Day after the last NiCl exposure	
		Day 3 (n=5)	Day 6 (n=5)
Ig G (mg/ml)	0.532±0.018	0.534±0.063	0.585±0.096
Ig M (mg/ml)	0.077±0.020	0.240±0.044*	p<0.05 — 0.128±0.08*

*: p<0.05 vs Normal group

Table 34

Expression of various cytokine mRNA in lung tissues (Exp.#3)

Group	Ratio of cytokine mRNA to beta-actin mRNA			
	TNF-alpha	IL-1beta	MCP-3	MIP-1alpha
Post-day 3				
CC (n=5)	0.44±0.17	0.45±0.14	0.58±0.21	0.09±0.06
Br (n=5)	0.58±0.38	0.67±0.58	1.58±0.87*	0.18±0.11
Post-day 6				
CC (n=5)	0.52±0.16	0.64±0.47	0.33±0.15	0.04±0.02
Br (n=4)	0.94±0.85	0.60±0.69	0.45±0.08	0.25±0.38

Table 35

Experimental design (Exp.# 4) and sampling time after Ni exposure

Group/ Day	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Bronchitis control: Br	0.13% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	SC
Normal+kanto loam dust:Br+K	0.13% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni + K*	SC
Bronchiolitis+vanadium:Br+V	0.13% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni	0.09% Ni + V*	SC

Daily exposure time was 10:00 a.m. to 11:00 a.m.

K* or V*: Kanto loam dust or vanadium pentoxide were immediately exposed for 3 hours to mice after the last Ni exposure.

SC: animals were sacrificed 24 hours after the last exposure.

N=5 for BALF and blood, and 2-3 for histopathology

表 36 ニッケルの肺組織沈着量

Group	Ni (mg/g dry lung tissues)
Br	3.48 ±1.18
Br+Kanto loam dust	4.30±0.29
Br+Vanadium	4.66±0.18

湿式灰化後10mlに溶解して、GFAAS法により測定。

表 37 バナジウムの肺組織沈着量

Group	Vanadium (mg/g dry lung tissue)
Br	No detect
Br+Kanto loam dust	No detect
Br+Vanadium	1.138±0.021 mg/g dry tissue

湿式灰化後10mlに溶解して、GFAAS法により測定。

Table 38

Effects of Kanto loam dust and vanadium on various parameters in aged mice with bronchiolitis (Exp.#4)

mean±SD	B. W. (g)	spleen (g)	thymus (g)	spleen/BW	Thymus/B. W.
Br (n=5)	30.4±4.1	0.122±0.047	0.024±0.010	0.004±0.001	0.0008±0.0003
Br+Kanto loam dust (n=5)	31.4±1.9	0.106±0.016	0.027±0.006	0.003±0.000	0.0009±0.0002
Br+vanadium (n=5)	31.6±1.5	0.094±0.015	0.018±0.006	0.003±0.000	0.0006±0.0002

Table 39

Analysis of splenic cells in aged mice with bronchiolitis exposed to Kanto loam dust or vanadium aerosol (Exp.#4)

mean (%)±SD	B-cell	L3T4 (CD4)	Ly1	Ly2 (CD8)	CD4/CD8	NK1.1	Asialo GM1
Br (n=5)	44.6±9.2	37.4±4.0	11.6±3.6	22.1±5.6	1.76±0.35	4.2±0.6	49.8±5.5
Br+Kanto loam dust (n=5)	41.9±5.8	37.0±3.5	9.5±0.4	21.3±3.0	1.74±0.12	4.5±0.3	48.3±6.1
Br+vanadium (n=5)	48.1±2.2	39.2±3.7	10.0±2.8	23.9±7.8	1.77±0.51	4.2±0.6	54.9±3.2

Table 40

Analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in aged mice with bronchiolitis exposed to Kanto loam dust or vanadium aerosol(Exp.#4)

mean±SD	Recovery (%)	Total cell (x10 ⁵ /ml)	Total protein (mg/ml)	Cell differential (%) pulmonary macrophage	Neutrophil	Lymphocyte
Br (n=5)	66.0±15.2	40.16±20.11	3.00±1.81	60.00±16.51	37.00±15.49	3.00±1.83
Br+Kanto loam (n=5)	68.0±16.4	53.38±21.13	3.43±0.88	32.67±11.93*	66.33±11.3*	1.00±0.00
Br+vanadium (n=5)	70.0±11.6	47.68±28.56	4.06±1.07	68.75±7.93	27.75±6.40	3.50±3.11

*:p<0.05 vs the Br and Br+vanadium groups

Table 41

Exp.4 The effects of inhaled particle matters on BAL Ig A
in aged mice with acute bronchiolitis

	Control (n=5)	Kanto loam dust (n=5)	aerosol of V2O5 (n=5)
Ig A ($\mu\text{g/ml}$)	19.0 \pm 9.6	17.1 \pm 7.5	18.3 \pm 10.1

Table 42

Exp.4 The effects of inhaled particle matters on plasma Ig G and M
in aged mice with acute bronchiolitis

	Control (n=5)	Kanto loam dust (n=5)	aerosol of V2O5 (n=5)
Ig G (mg/ml)	0.45±0.06	0.52±0.07	0.51±0.07
Ig M (mg/ml)	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.05

Table 43

Expression of various cytokine mRNA in lung tissues (Exp.#4)

Group	Ratio of cytokine mRNA to beta-actin mRNA			
	TNF-alpha	IL-1beta	MCP-3	MIP-1alpha
Br (n=5)	3.87±1.01	2.54±0.98	1.53±0.53	1.19±0.63
Br+Kanto loam dust (n=5)	2.79±0.64	1.15±0.10*	0.75±0.29	0.38±0.05*
Br+vanadium (n=5)	5.20±2.10	1.69±0.49	0.79±0.18*	0.22±0.08*

*:p<0.05 vs the Br group

Table 44

Baseline of ventilation, tidal volume and respiratory minute volume in aged mice with bronchiolitis exposed to Kanto loam dust or vanadium aerosol

Group	Body weight (g)	Ventilation (breaths/min)	Tidal volume (ml BTPS/100 g B.W.)	Respiratory minute volume (ml BTPS/min/100g B.W.)
Br (n=5)	30.59±3.52	234.0±39.1	0.797±0.257	178.8±37.3
Br+Kanto loam dust (n=5)	30.83±2.21	222.0±50.2	0.749±0.192	159.0±21.7
Br+vanadium	30.69±1.79	198.0±45.5	0.744±0.272	138.0±23.9*

*: p<0.05 vs The Br group

Table 45

Changes of ventilation after inhalation of methacholine aerosol in mice mice with bronchiolitis exposed to Kanto loam dust or vanadium aerosol

Methacholine ($\mu\text{g/ml}$)	Ventilation (breaths/min)		
	Br (n=5)	Br+Kanto loam dust (n=5)	Br+vanadium (n=5)
0.1	222.0 \pm 45.5	234.0 \pm 44.5	192.0 \pm 34.2
1.0	228.0 \pm 45.5	234.0 \pm 44.5	210.0 \pm 56.1
10.0	264.0 \pm 53.7	246.0 \pm 32.9	216.0 \pm 65.0
100.0	276.0 \pm 53.7	252.0 \pm 50.2	240.0 \pm 56.1

Table 46

Changes of tidal volume after inhalation of methacholine aerosol in mice with bronchiolitis exposed to Kanto loam dust or vanadium aerosol

Methacholine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Tidal volume (ml BTPS/100 g B.W.)		
	Br (n=5)	Br+Kanto loam dust (n=5)	Br+vanadium (n=5)
0.1	0.834 \pm 0.290	0.636 \pm 0.146	0.661 \pm 0.169
1.0	0.720 \pm 0.215	0.628 \pm 0.173	0.597 \pm 0.130
10.0	0.600 \pm 0.241	0.500 \pm 0.118	0.558 \pm 0.086
100.0	0.573 \pm 0.131	0.477 \pm 0.083	0.470 \pm 0.169

Table 47

Changes of respiratory minute volume after inhalation of methacholine aerosol in aged mice with bronchiolitis exposed to Kanto loam dust or vanadium aerosol

Methacholine ($\mu\text{g/ml}$)	Respiratory minute volume (ml BTPS/min/100 g B.W.)		
	Br (n=5)	Br+Kanto loam dust (n=5)	Br+vanadium (n=5)
0.1	176.0 \pm 41.9	146.6 \pm 33.0	122.6 \pm 15.3
1.0	157.4 \pm 28.0	141.0 \pm 12.7	120.5 \pm 16.1
10.0	148.8 \pm 24.1	122.3 \pm 29.4	118.7 \pm 32.0
100.0	150.3 \pm 34.2	121.2 \pm 36.1	87.3 \pm 39.7

Table 48

The changes of various parameters in mice with bronchiolitis compared with normal mice

	7-weeks old mice	aged mice
Body weight		
Spleen/B.W.		
Thymus/B.W.	↓	
<hr/>		
BALF		
Total cell		↑
Total protein	↑	↑
Cell differential		
Alveolar macrophage	↓	↓
Neutrophil	↑	↑
Lymphocyte		
<hr/>		
Splenic cell		
B-cell		
Ly1		
CD4/CD8		
Asialo GM1		↑
<hr/>		
BAL Ig A		↑
Plasma Ig G		
Plasma Ig M		↑
<hr/>		
Cytokine mRNA		
TNF-alpha		
IL-1beta		
MIP-1alpha		↑
MCP-3		↑

Table 49

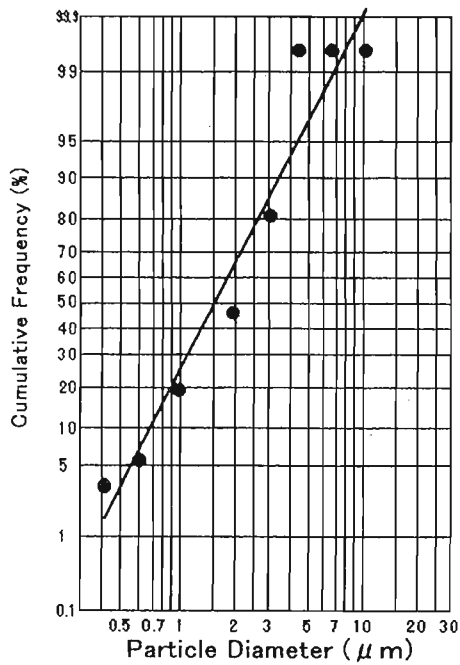
The effects of ozone, Kanto loam dust and vanadium aerosol in mice with bronchiolitis

	0.8ppm Ozone	Kanto loam dust (2 h)	Vanadium aerosol (2 h)
Body weight			
Spleen/B.W.			
Thymus/B.W.			
<hr/>			
BALF			
Total cell	↑		
Total protein		↑	
Cell differential (%)			
Alveolar macrophage		↓	
Neutrophil		↑	
Lymphocyte			
<hr/>			
Splenic cell			
B-cell			
Ly1			
CD4/CD8			
Asialo GM1			
<hr/>			
BAL Ig A	↑		
Plasma Ig G			
Plasma Ig M	↑		
<hr/>			
Cytokine mRNA			
TNF-alpha			
IL-1beta		↑	
MIP-1alpha		↓	
MCP-3			↓

図1 エアロゾル粒度分布分析結果

実験実施日	1999.07.21	ステージ番号 (μm)	測定前 (mg)	測定後 (mg)	捕集量 (mg)	割合 (%)	累計 (%)
実験の番号	7	0 [11.0~]	520.60	526.90	0.00	0.00	100.00
		1 [7.00~11.0]	521.60	528.80	0.00	0.00	100.00
測定器番号	7	2 [4.70~7.00]	531.50	539.20	0.00	0.00	100.00
		3 [3.30~4.70]	520.90	529.60	0.04	6.15	100.00
実験者名	石原、新関	4 [2.10~3.30]	521.00	532.20	0.18	27.69	93.85
		5 [1.10~2.10]	513.00	524.90	0.23	35.38	66.16
エアロゾル名	塩化ニッケル0.1%	6 [0.65~1.10]	528.80	538.90	0.14	21.54	30.78
		7 [0.43~0.65]	528.50	536.30	0.03	4.62	9.24
サンプリング流量 l/min	29.3	BUF[~0.43]	533.60	541.20	0.03	4.62	4.62
サンプリング時間 min	60	総捕集量 (mg)	濃度 (mg/m^3)	MMAD (μm)	標準偏差 (δg)		
エアロゾル温度 ($^{\circ}\text{C}$)	20	0.65	0.37	1.26	1.71		

Particle size distribution curve



Particle size distribution histogram

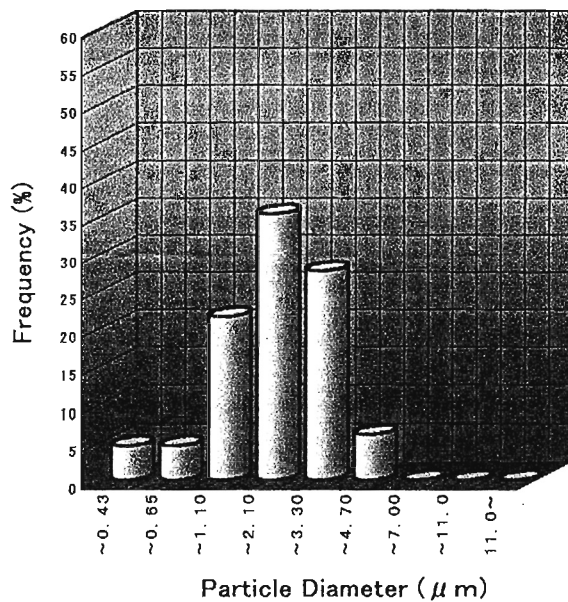
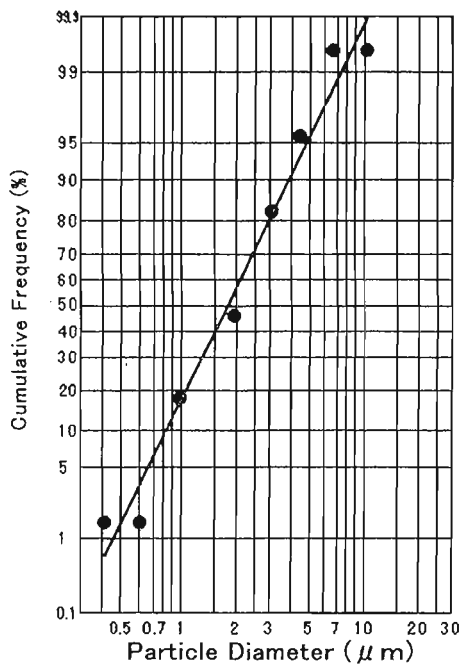


図2 エアロゾル粒度分布分析結果

実験実施日	1999.05.12	ステージ番号 (μm)	測定前 (mg)	測定後 (mg)	捕集量 (mg)	割合 (%)	累計 (%)
実験の番号	5	0 [11.0~]	520.60	526.90	0.00	0.00	100.00
		1 [7.00~11.0]	521.60	528.80	0.00	0.00	100.00
測定器番号	5	2 [4.70~7.00]	531.50	539.20	0.02	0.60	100.00
		3 [3.30~4.70]	520.90	529.60	0.15	4.46	99.40
実験者名	石原、新関	4 [2.10~3.30]	521.00	532.20	0.97	28.87	94.94
		5 [1.10~2.10]	513.00	524.90	1.26	37.50	66.07
エアロゾル名	塩化ニッケル0.2%	6 [0.65~1.10]	528.80	538.90	0.89	26.49	28.57
		7 [0.43~0.65]	528.50	536.30	0.07	2.08	2.08
サンプリング流量 l/min	29.3	BUF[~0.43]	533.60	541.20	0.00	0.00	0.00
サンプリング時間 min	60	総捕集量 (mg)	濃度(mg/m^3)	MMAD(μm)	標準偏差(δg)		
エアロゾル温度 ($^{\circ}\text{C}$)	20	3.36	1.91	1.48	1.66		

Particle size distribution curve



Particle size distribution histogram

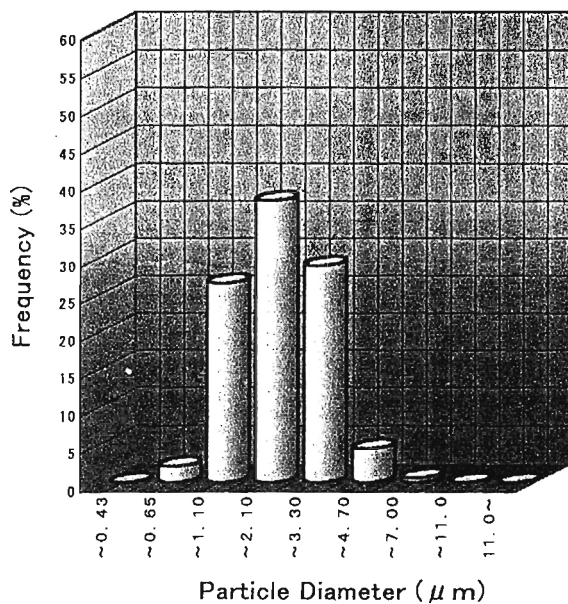
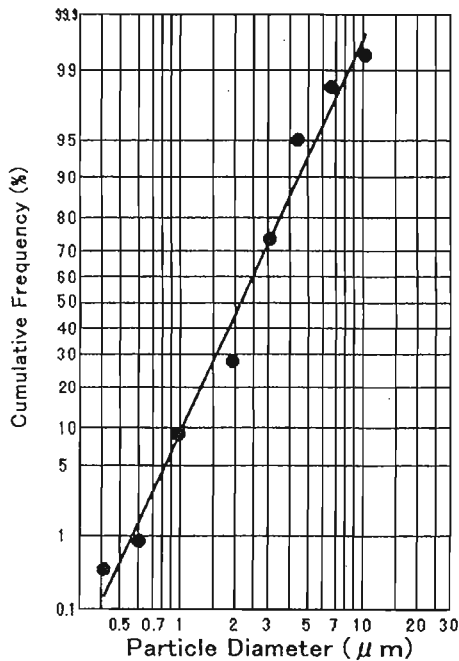


図3 エアロゾル粒度分布分析結果

実験実施日	1999.05.12	ステージ番号 (μm)	測定前 (mg)	測定後 (mg)	捕集量 (mg)	割合 (%)	累計 (%)
実験の番号	6	0 [11.0~]	520.60	526.90	0.05	0.41	100.00
		1 [7.00~11.0]	521.60	528.80	0.09	0.74	99.59
測定器番号	6	2 [4.70~7.00]	531.50	539.20	0.31	2.54	98.85
		3 [3.30~4.70]	520.90	529.60	2.50	20.51	96.31
実験者名	石原、新関	4 [2.10~3.30]	521.00	532.20	5.73	47.01	75.80
		5 [1.10~2.10]	513.00	524.90	2.38	19.52	28.79
エアロゾル名	塩化ニッケル2%	6 [0.65~1.10]	528.80	538.90	1.05	8.61	9.27
		7 [0.43~0.65]	528.50	536.30	0.05	0.41	0.66
サンプリング流量 l/min	29.3	BUF[~0.43]	533.60	541.20	0.03	0.25	0.25
サンプリング時間 min	60	総捕集量 (mg)	濃度 (mg/m ³)	MMAD (μm)	標準偏差 (δg)		
エアロゾル温度 ($^{\circ}\text{C}$)	20	12.19	6.93	2.25	1.76		

Particle size distribution curve



Particle size distribution histogram

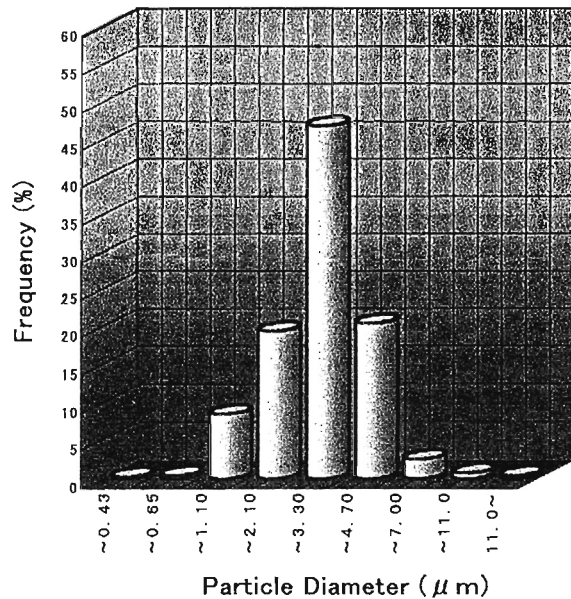


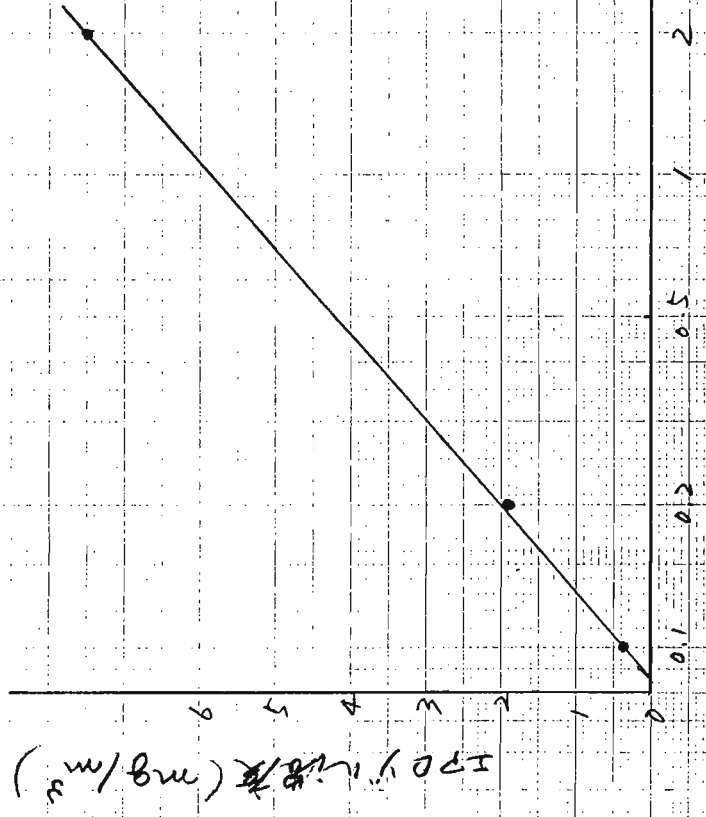
図4 塩化ニッケル濃度～IPO濃度特性

99.7.21

実験機 - (29.3 × 60 min)

原子吸光分析

分析機 - NE-012 (アドイン)



塩化ニッケル濃度 (%)

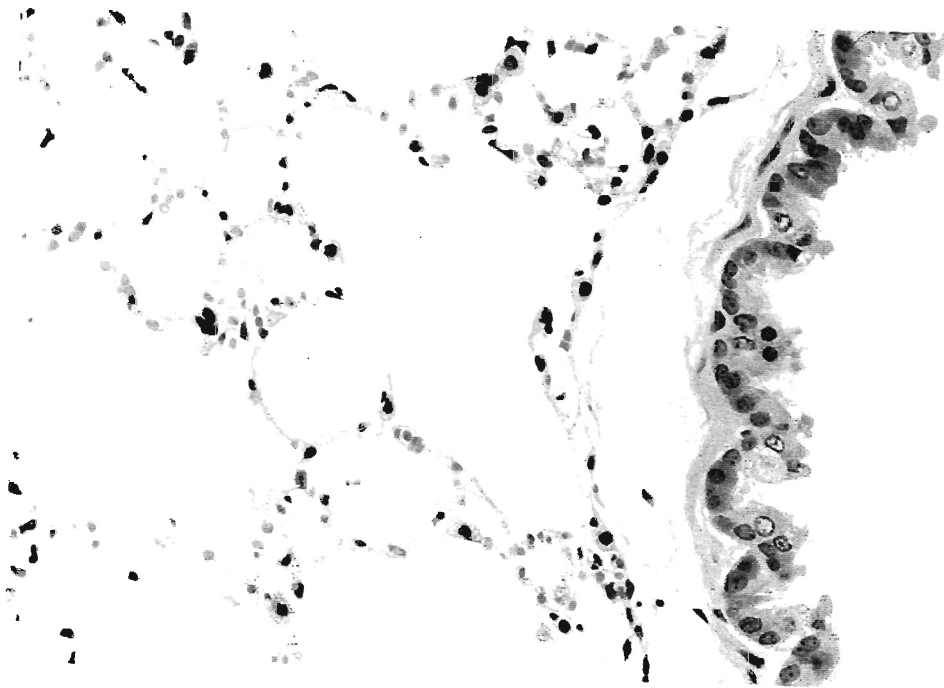
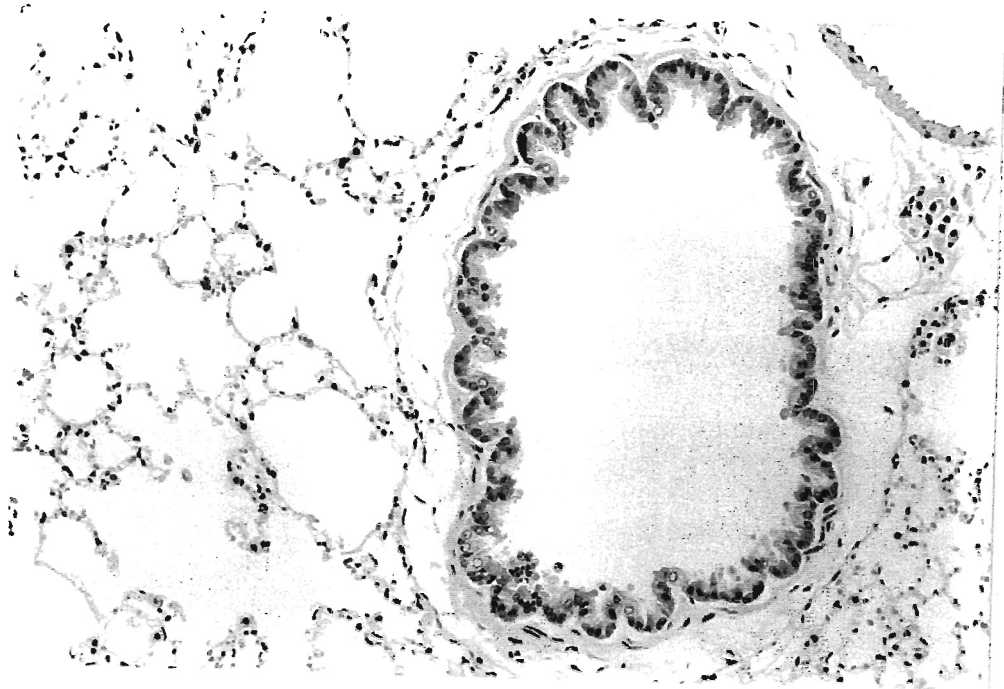


Fig.5 The CC group in aged mice

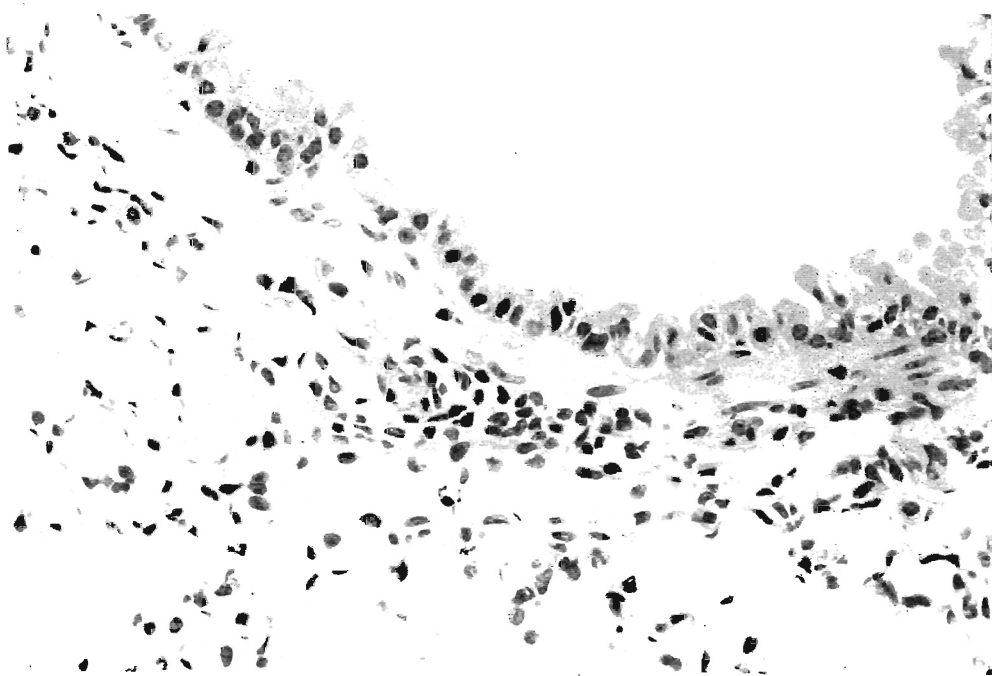
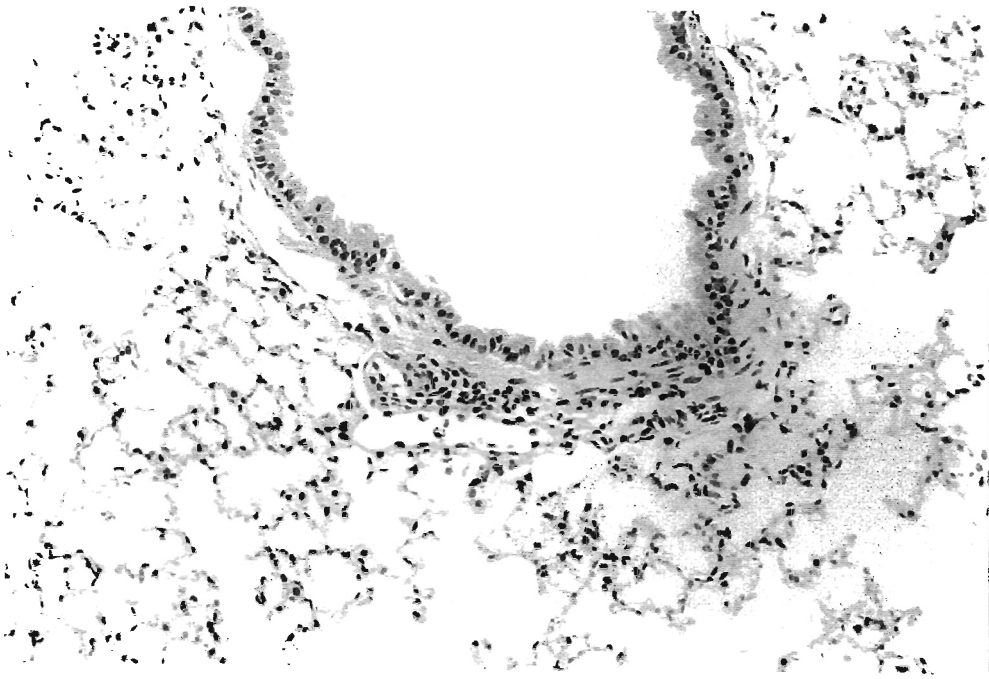


Fig.6 The CC+O group in aged mice

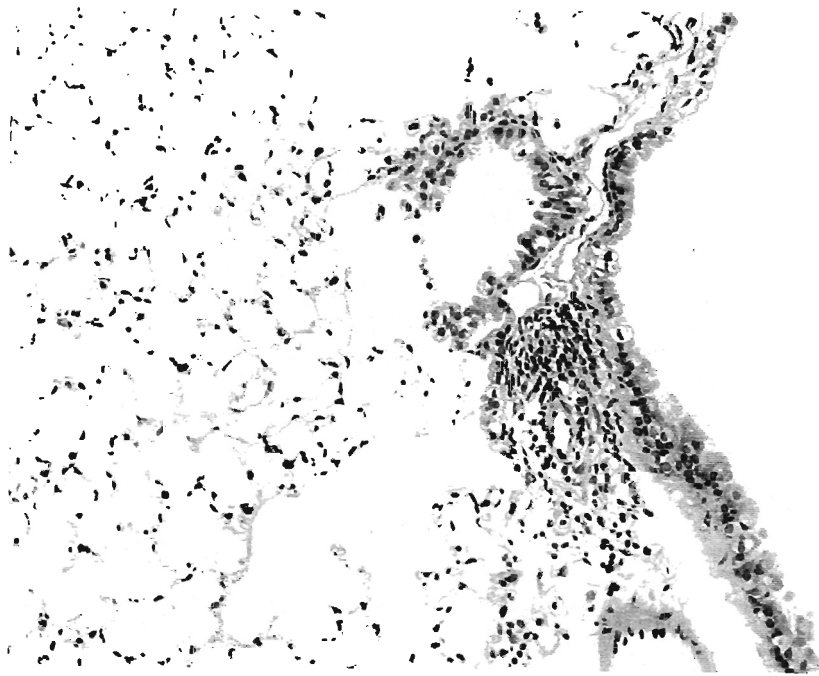


Fig.7 The Br group in aged mice

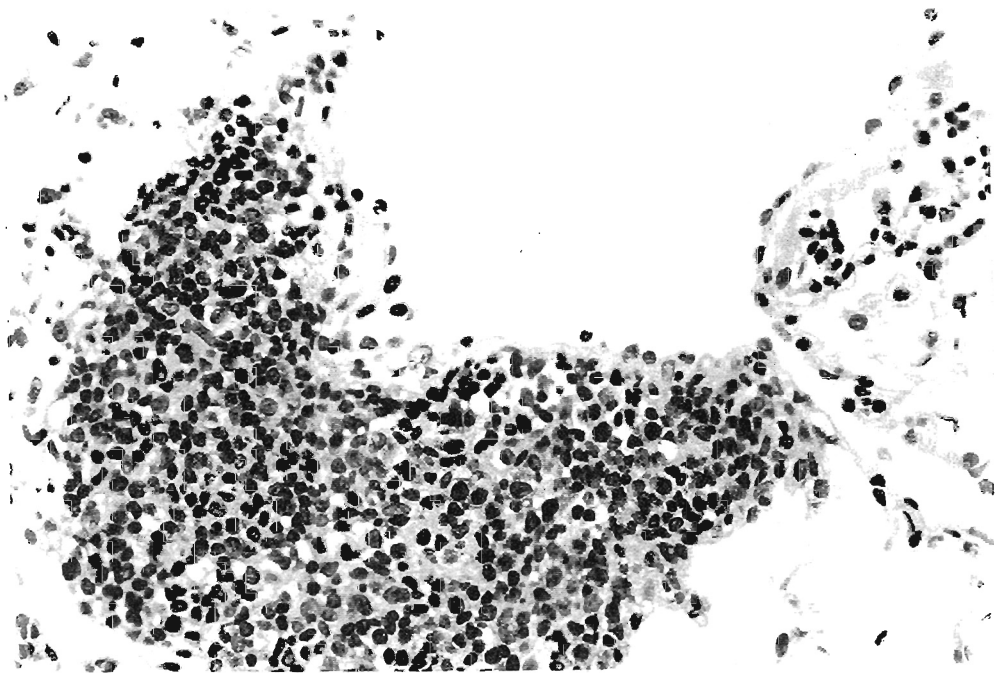
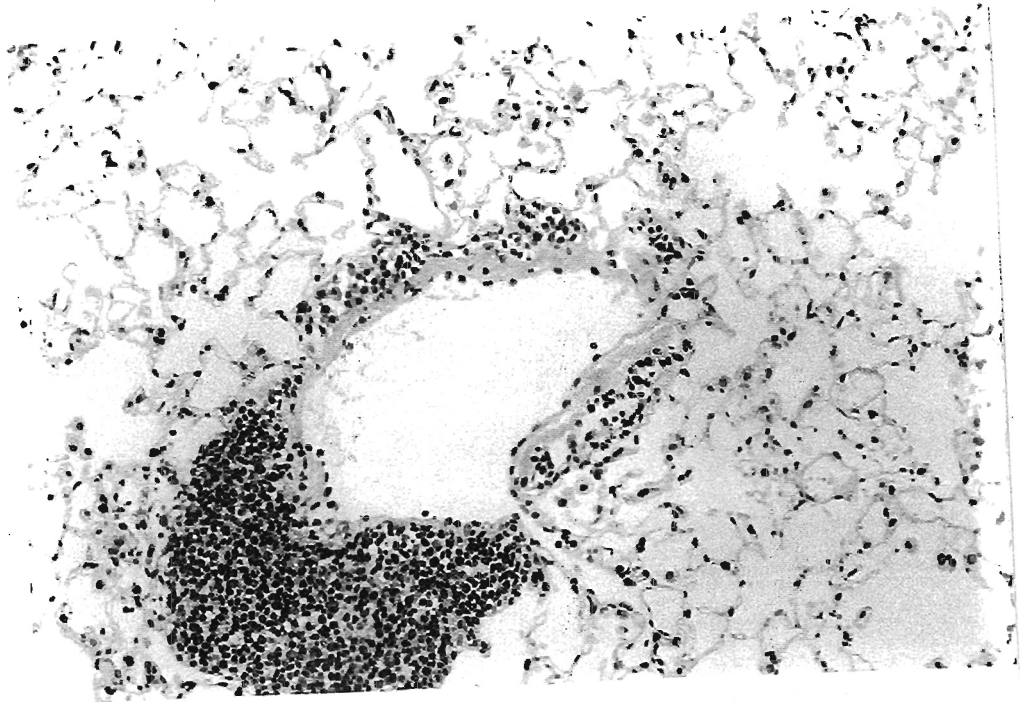


Fig.8 The Br+O group in aged mice

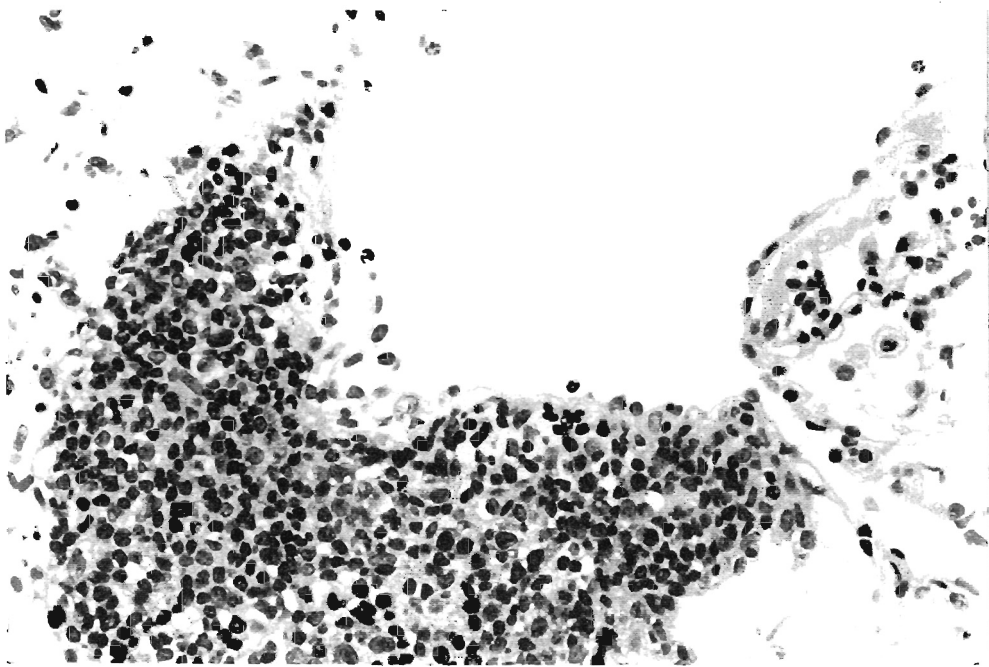
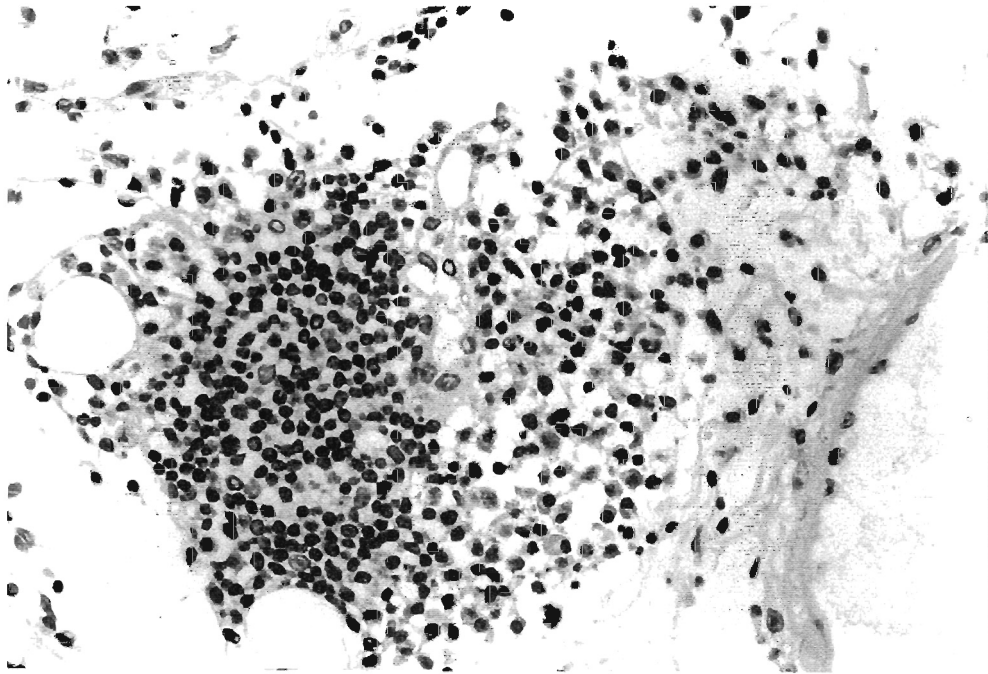


Fig.9 The Br+O group in aged mice

00X

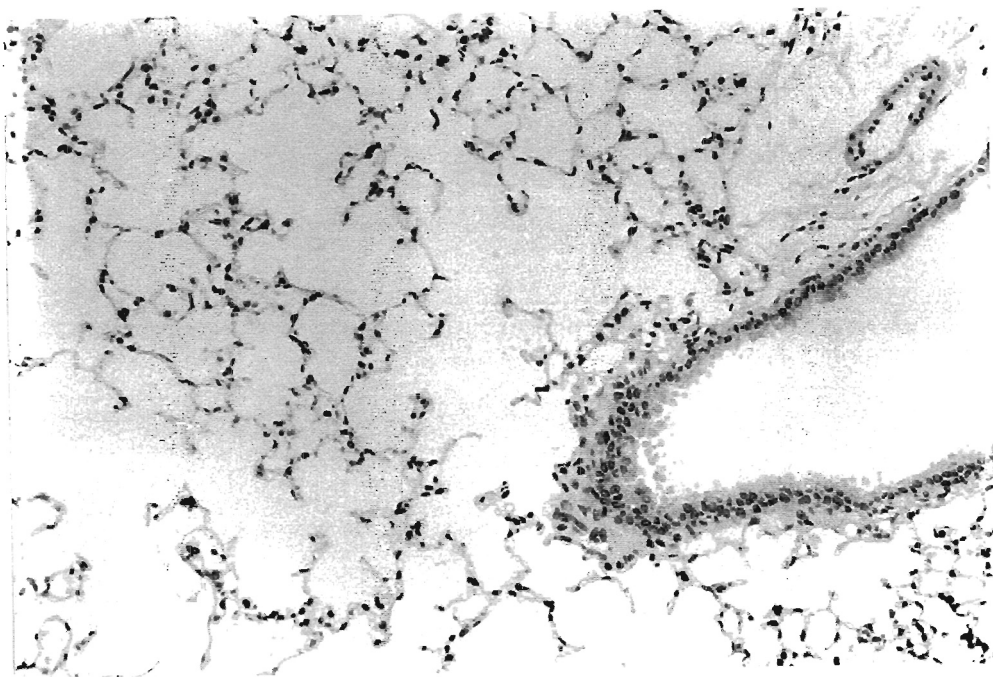
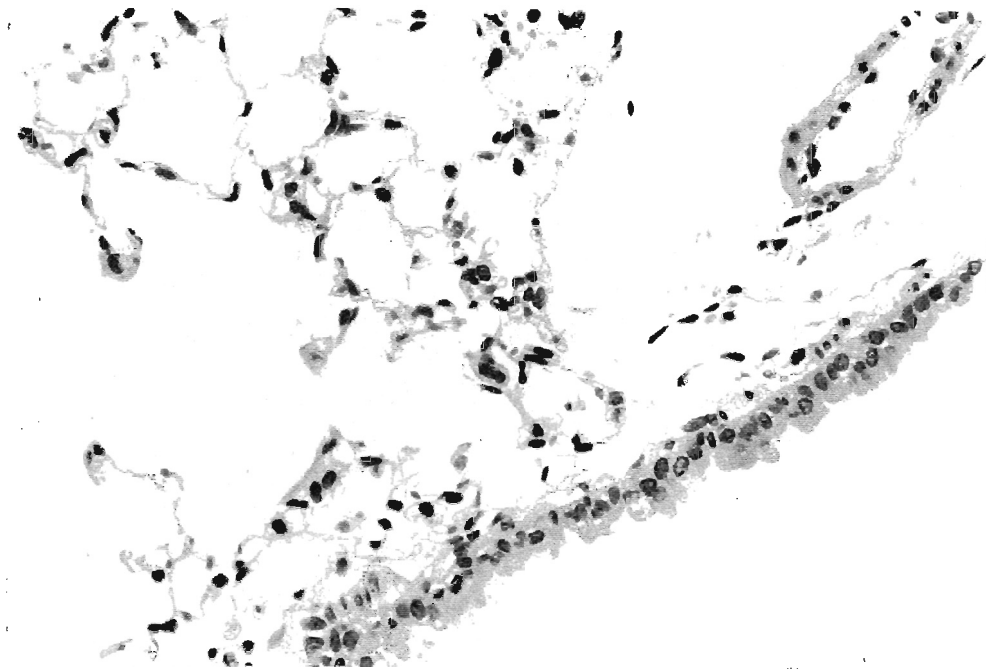


Fig.10 The CC group in 7W old mice

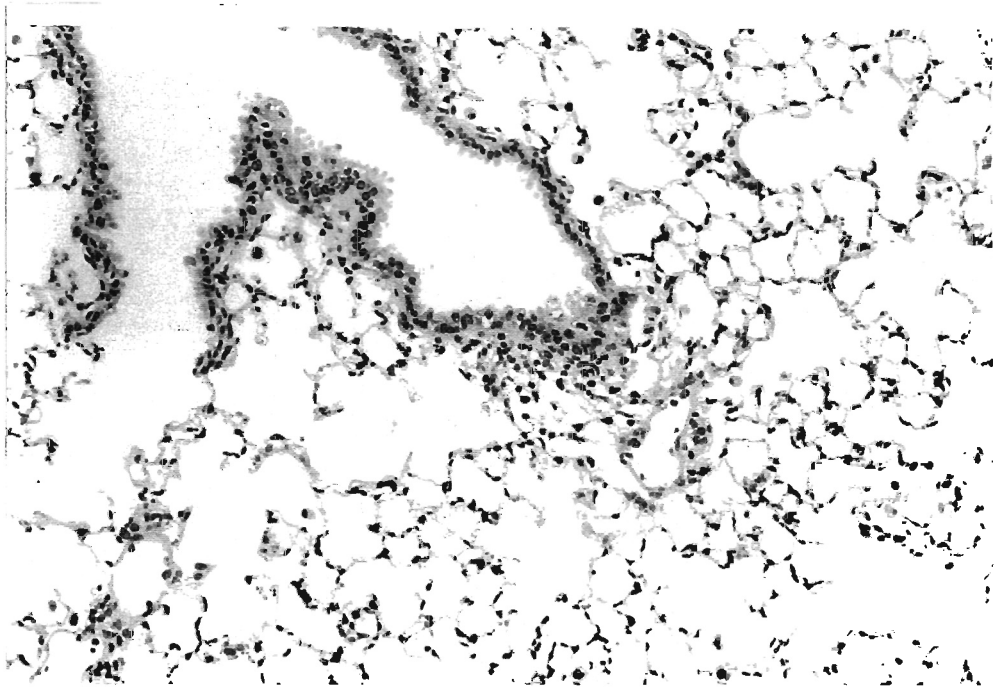
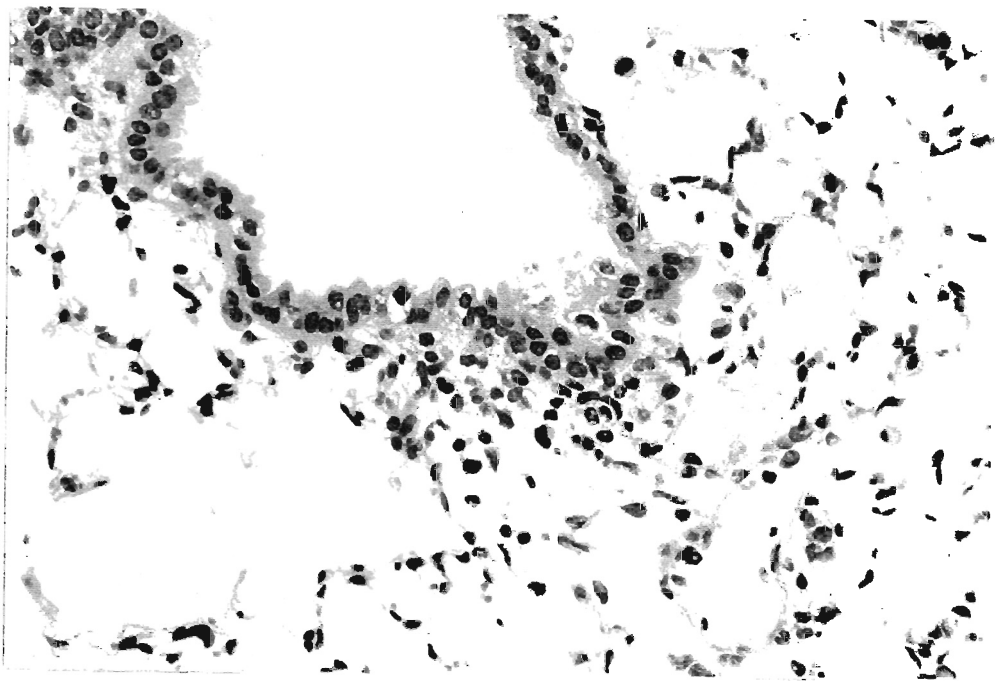


Fig.11 The Br group in 7W old mice

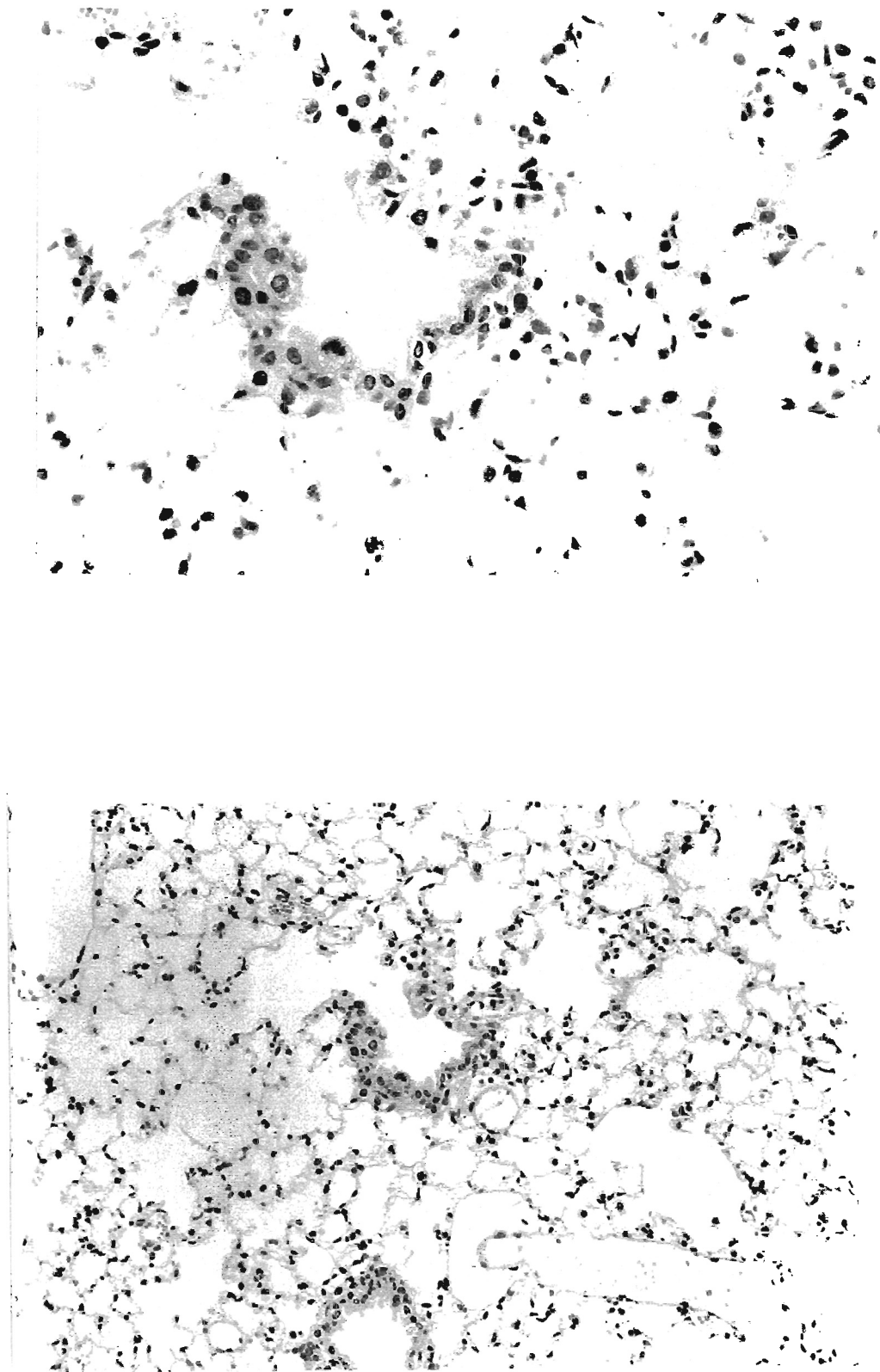


Fig.12 The CC+O group in 7W old mice

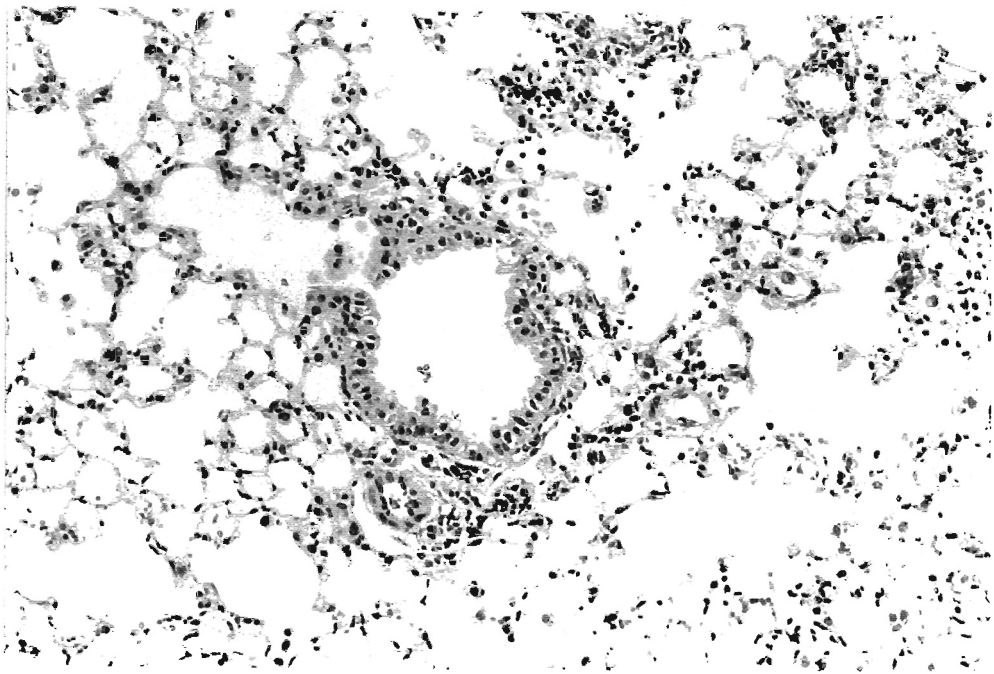
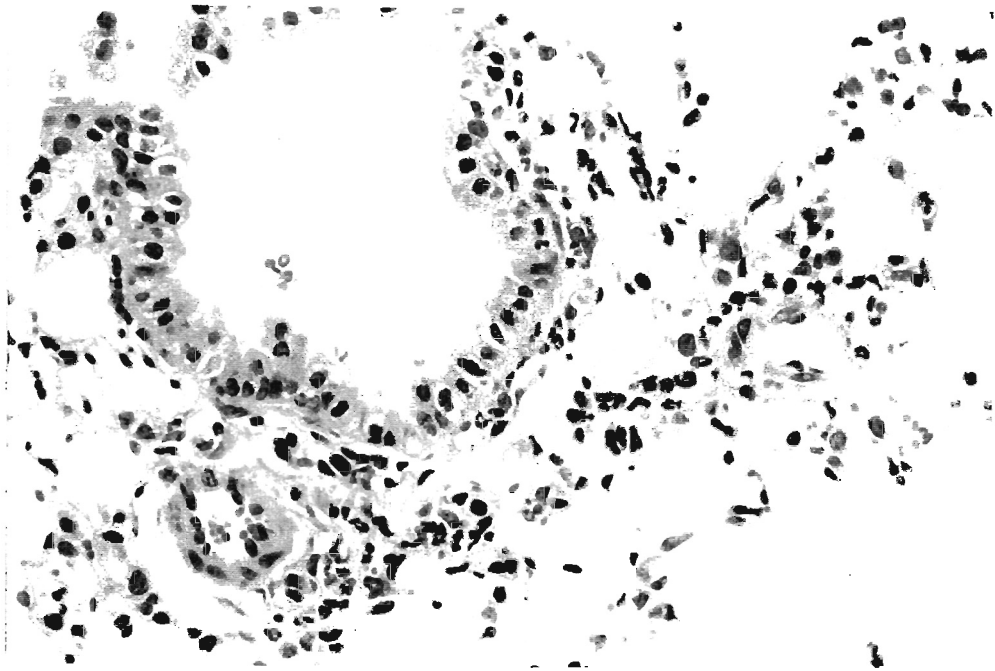


Fig.13 The Br+O group in 7W old mice

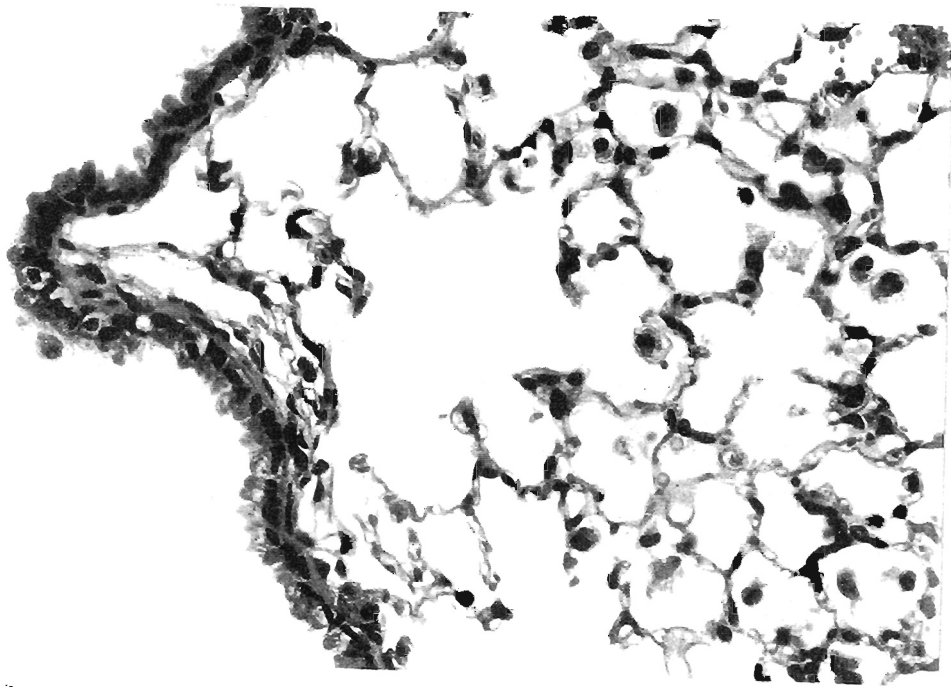
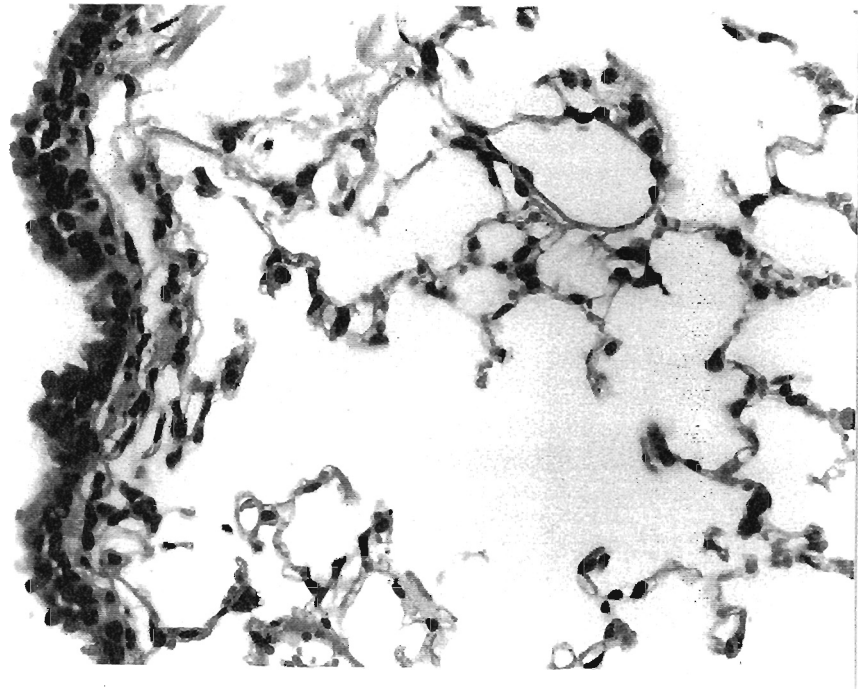


Fig.14 The CC group in aged mice

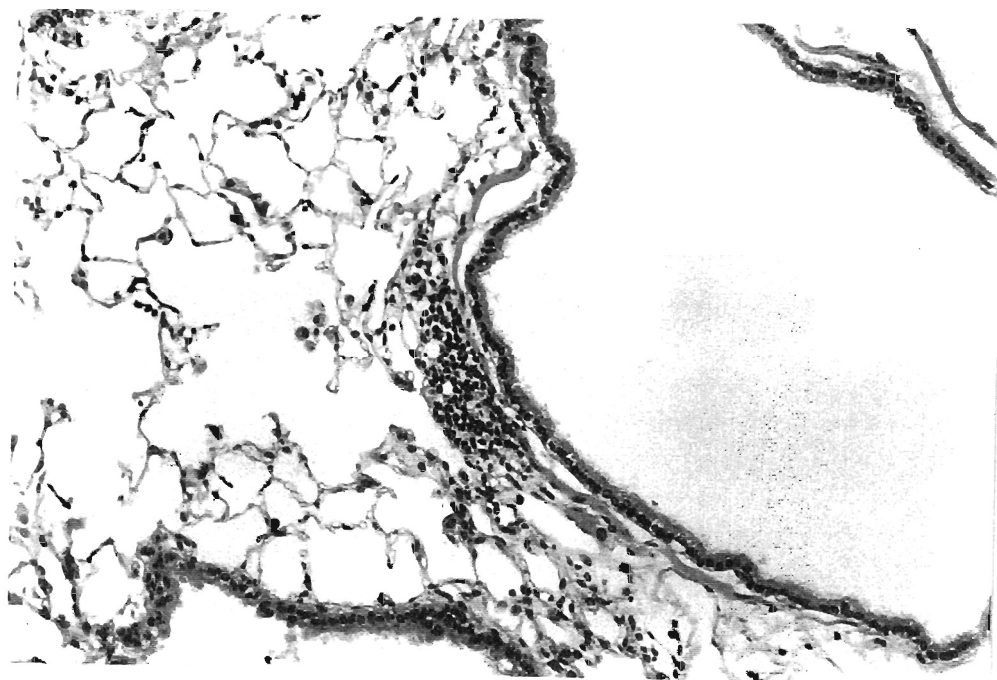
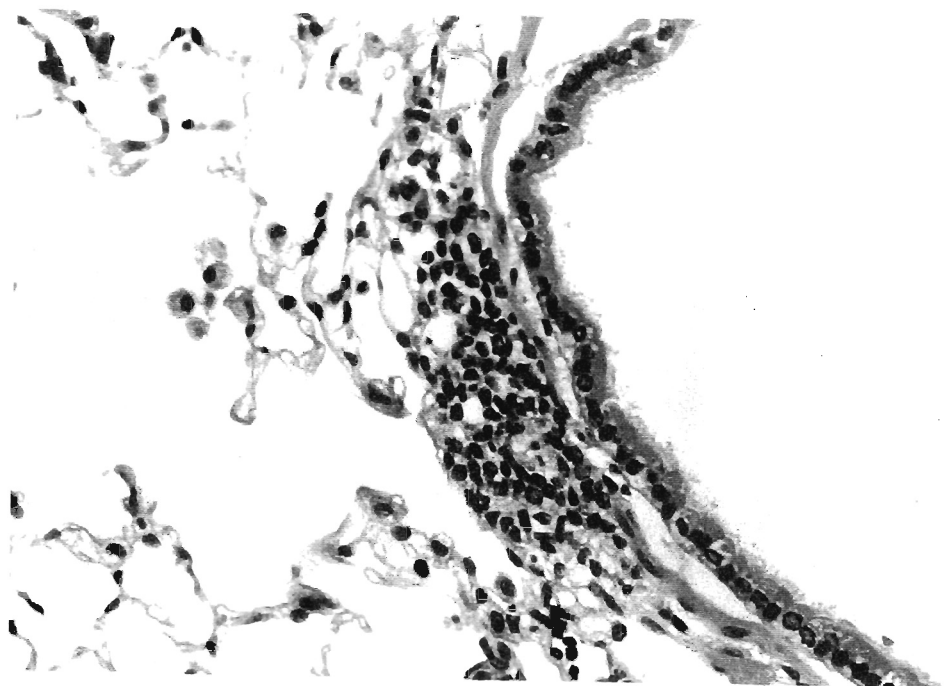


Fig.15 The Br group in Post-3 day of aged mice

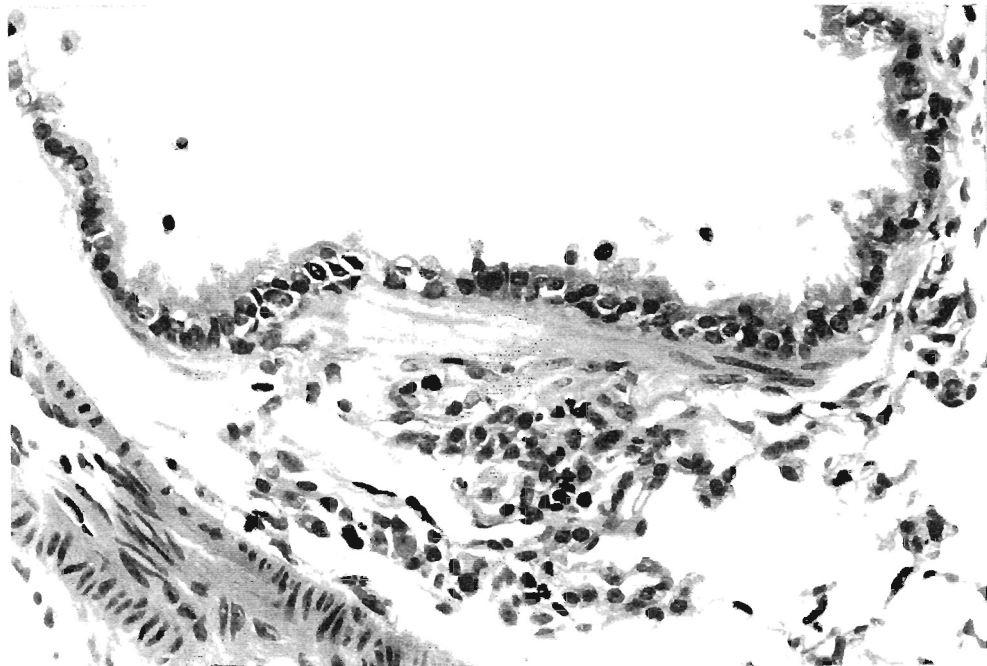
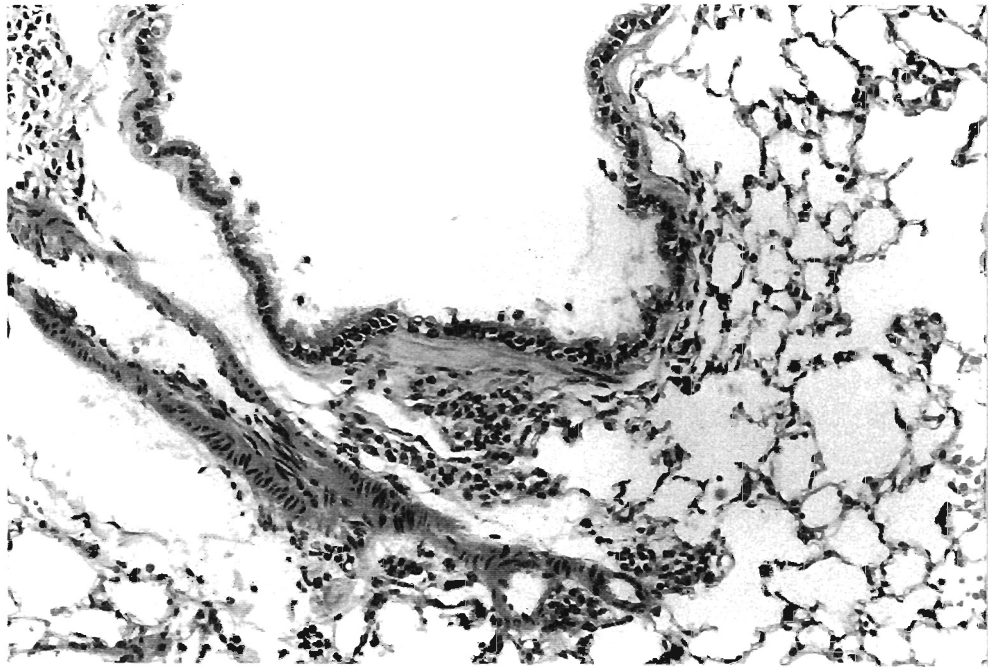


Fig.16 The Br group in Post-6 day of aged mice

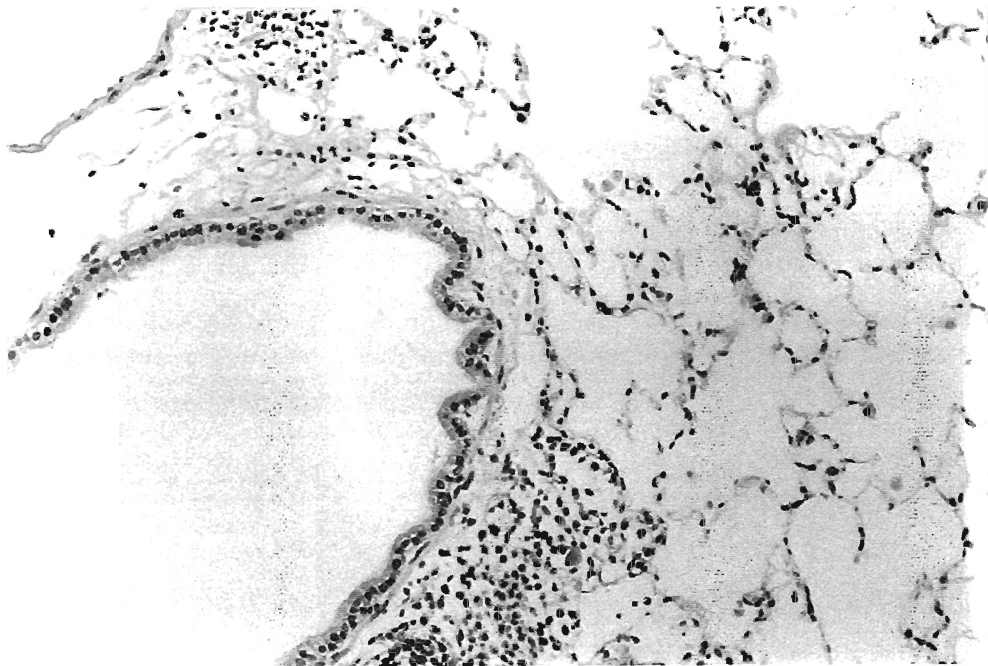
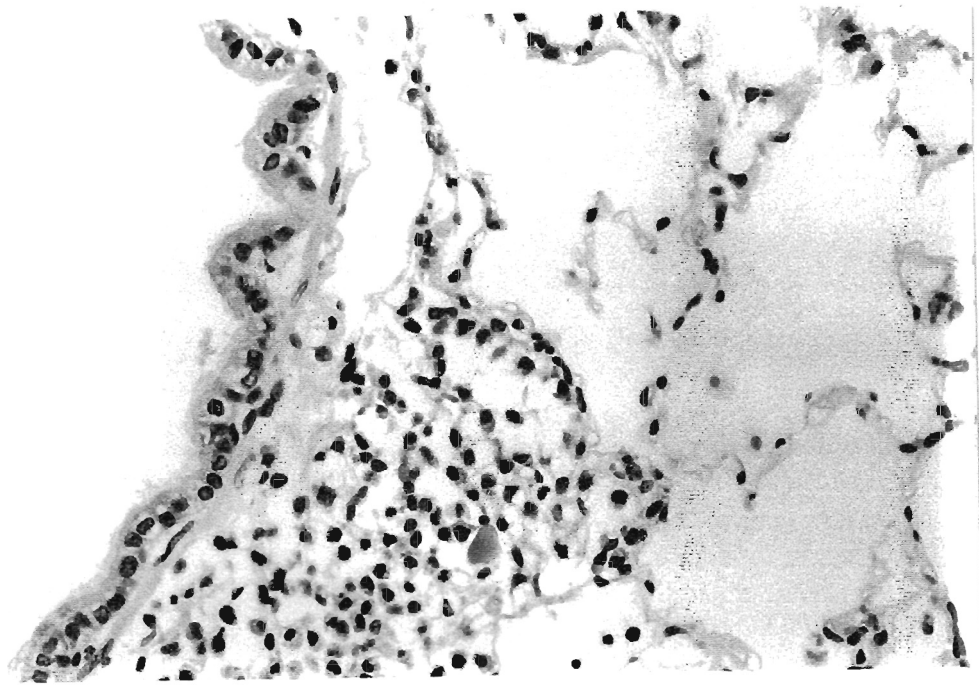


Fig.17 The Br group in aged mice

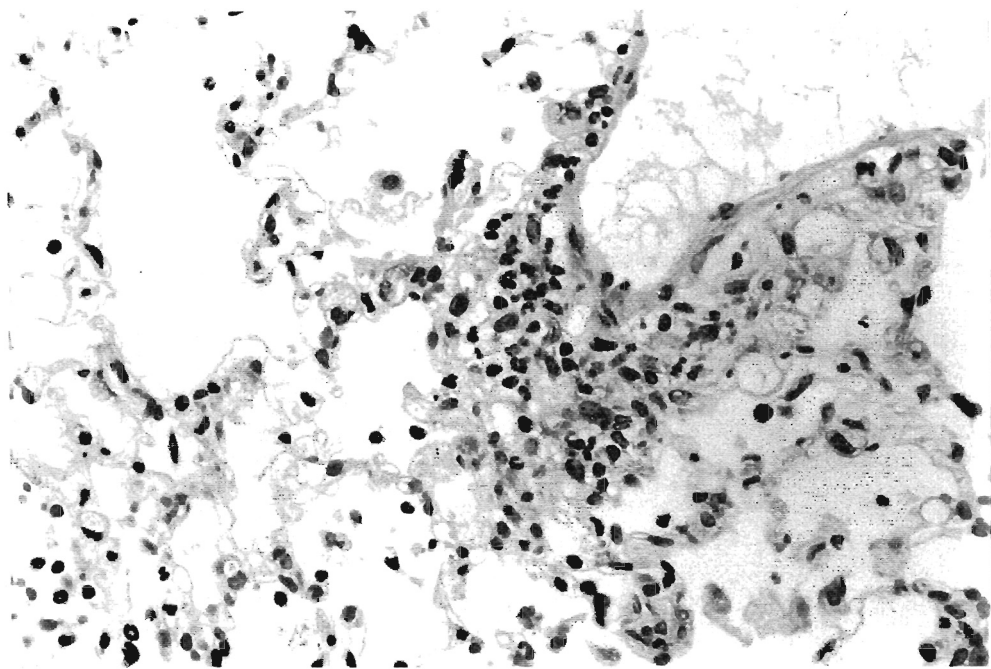
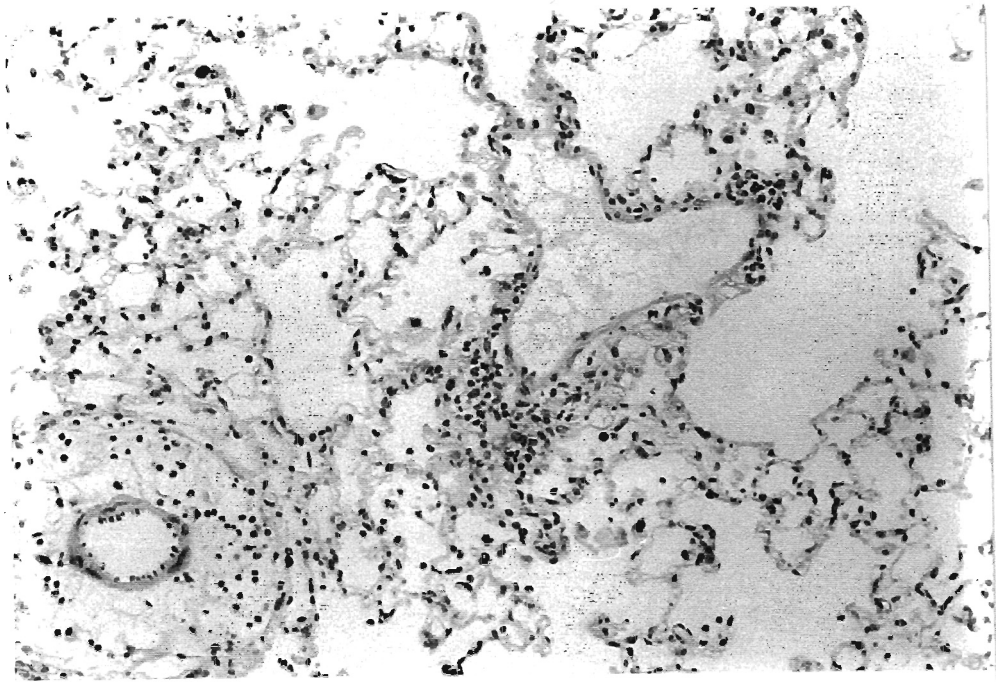


Fig.18 The Br+K group in aged mice

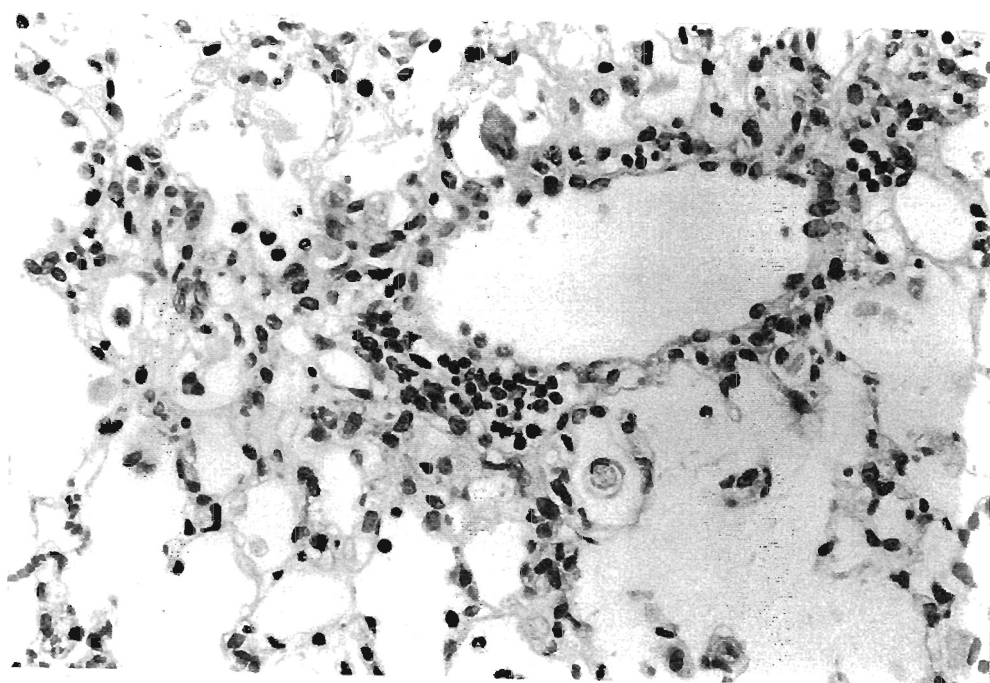
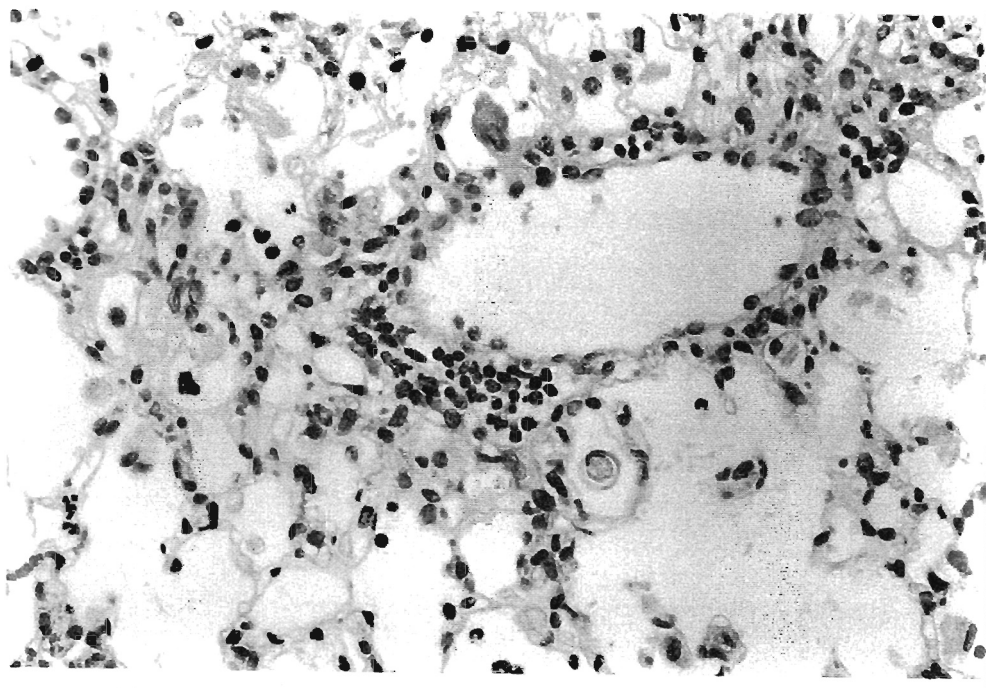


Fig.19 The Br+K group in aged mice

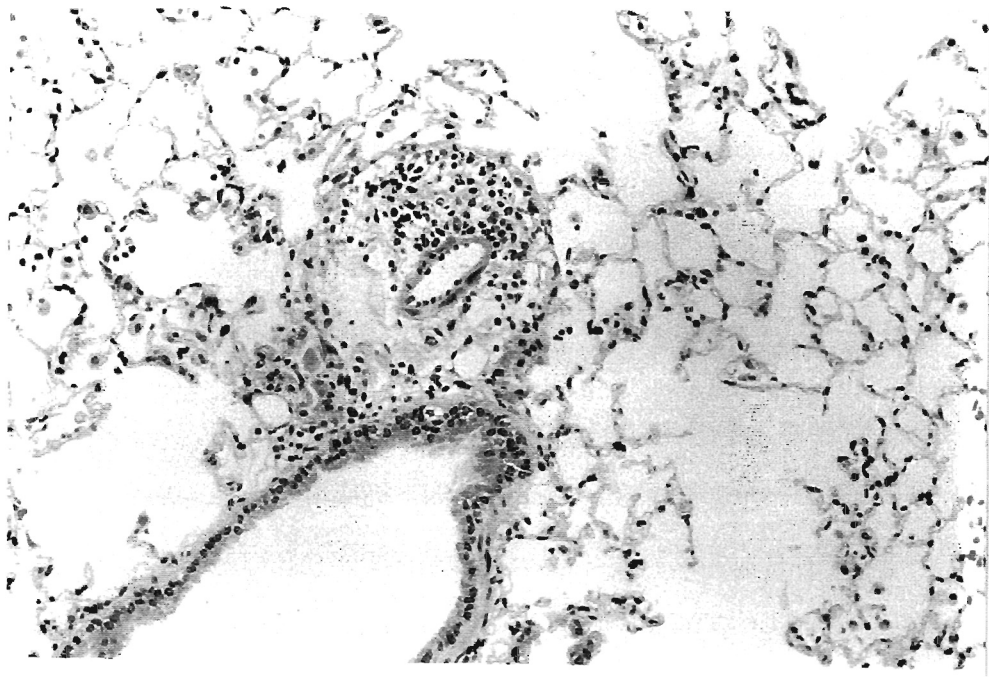


Fig.20 The Br+V group in aged mice

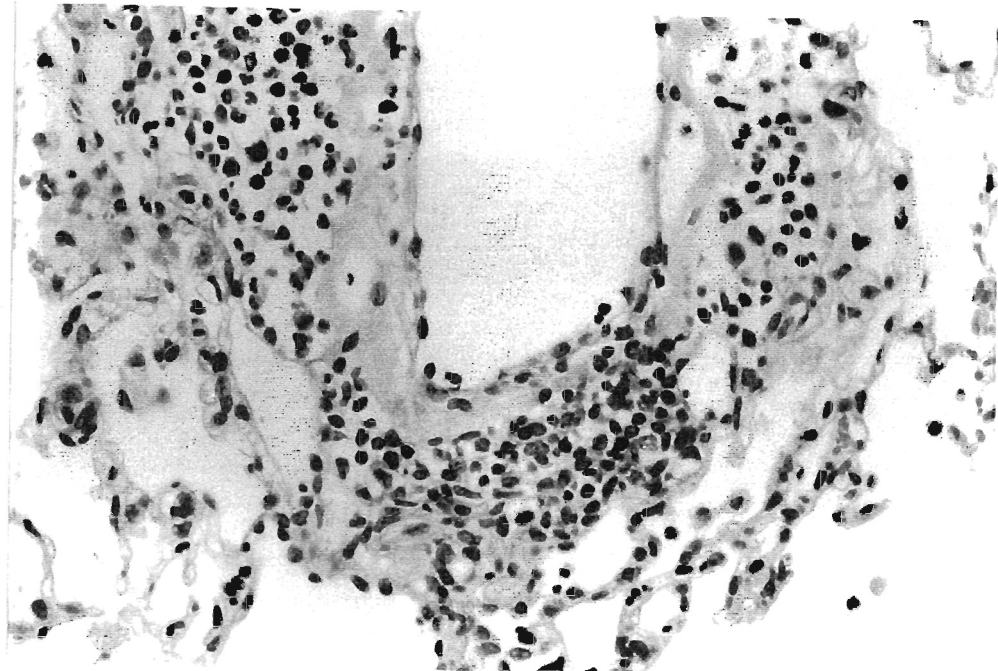
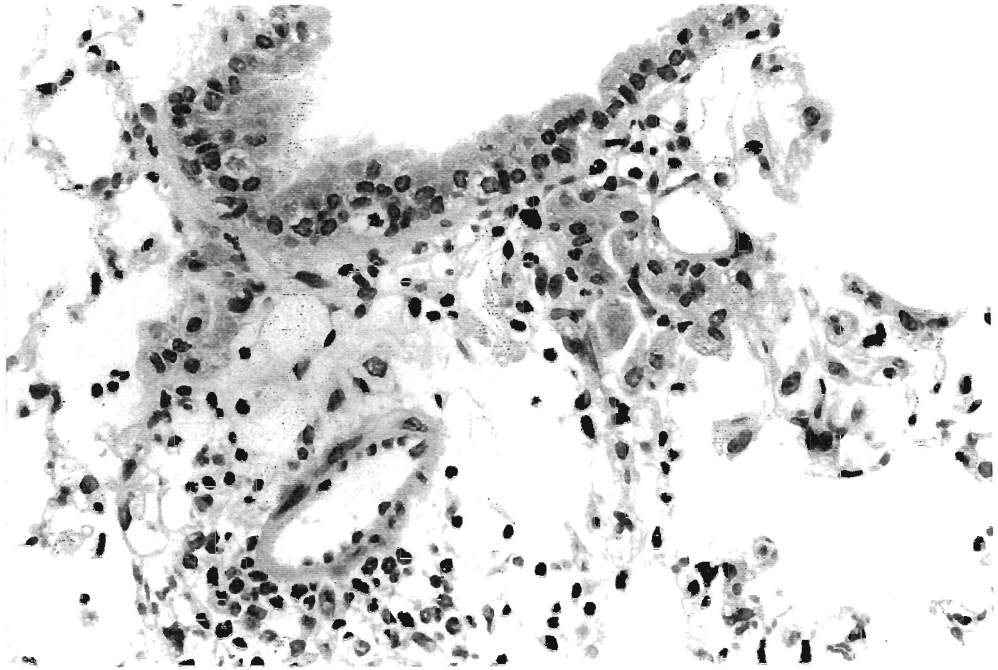


Fig.21 The Br+V group in aged mice