大気中微小粒子状物質 (PM2.5) から生じる 酸化ストレスと脳神経障害：第 2 部

嵯峨井 勝^{*1}, ティンティン・ウィンシュイ^{*2}

^{*1} つくば健康生活研究所 (青森県立保健大学・名誉教授)

^{*2} 独立行政法人・国立環境研究所環境健康研究センター生体影響研究室

Oxidative Stress Derived from Airborne Fine and Ultrafine Particles and the Effects on Brain-Nervous System: Part 2

Masaru SAGAI^{*1} and Tin Tin WIN-SHWE^{*2}

^{*1} Tsukuba Institute for Healthy Life (Aomori University of Health and Welfare)

^{*2} National Institute for Environmental Studies

Abstract Traffic-related air pollution is a major contributor to urban air pollution. Diesel exhaust (DE) is its most important component of near-road and urban air pollutions and is commonly used as a surrogate model of air pollution in health effects studies. In particular, diesel exhaust particles (DEPs) and nanoparticles in DEPs are the components considered hazardous for health. It is widely known that exposure to DEPs is associated with mortality caused by respiratory and cardiovascular diseases. Recently, evidence has been accumulating showing that DEPs and nanoparticles may cause neurodegenerative disorders. Here, we introduce evidence suggesting their association with these disorders. The chemical components and the translocation of DEPs and nanoparticles to the brain are described in part 1. In part 2, we introduce the mechanism of development of neurodegenerative diseases such as stroke, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease via oxidative stress and inflammatory events. Furthermore, there are many lines of epidemiological evidence showing that the particulates impair cognitive function and ability of memory through oxidative and inflammatory events in the brain. These lines of evidences are supported by many animal experiments on neurological disorders.

Key words: PM2.5, diesel exhaust particles (ディーゼル排気微粒子), nanoparticles (ナノ粒子), brain (脳), reactive oxygen species (活性酸素), neurotoxicity (神経毒性)

はじめに

最近、中国などから飛来する微小粒子状物質 (PM2.5, 粒子の径が 2.5 μm 以下の粒子, 正確には粒子の捕集効率が 50% となる空気力学的径が 2.5 μm となる粒子) が人々の健康に不安を与えている。

微小粒子状物質は人の死亡率の増加や呼吸器疾患あるいは循環器疾患の発症増加に関連していることが知られ

ている。さらに、長期間微小粒子状物質に晒されると、上部気道や下部気道で慢性的気道炎症を起こし、さらに脳を含む全身に取り込まれ炎症が誘起されるという。また、微小粒子状物質は鼻部の嗅覚上皮関門を介しても脳に取り込まれ、そこでも炎症を起こし認知機能の低下や脳の病理学的異常を引き起こすことが疫学研究および実験研究で判明してきた。

これらの結果は、微小粒子 (PM2.5) が肺や嗅上皮粘膜を介して体内に取り込まれ、脳を含む全身に侵入して影響を及ぼすことを示している。しかも、その影響に関する報告は高齢者や子供に関するものが多く、今日の少子高齢社会にあっては公衆衛生上の重大な課題である。

第 1 部 (1～2 章) (1) では、1 章で微小粒子の大きさ、発生源、化学組成、微小粒子中の炭素成分による活性酸素生成のメカニズムについて述べ、2 章では、微小粒子

受付 2015 年 1 月 21 日, 受理 2015 年 2 月 16 日
Reprint requests to: Tin Tin WIN SHWE, M. D., Ph. D
Biological Impact Research Section, Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan
TEL: +81(29)850-2542, FAX: +81(29)850-2334
E-mail: tin.tin.win.shwe@nies.go.jp

の脳神経系組織への侵入様式と侵入した微小粒子が脳神経系組織内で活性酸素を生成するメカニズムについて述べた。

本第 2 部では、3～5 章を掲載する。3 章では、活性酸素・酸化ストレスにより生じると報告されている主な脳神経疾患の発症メカニズムを紹介し、脳内で微小粒子によって生じる活性酸素・酸化ストレスが脳神経疾患の発症と深く関わっていることを述べる。最後に、4 章と 5 章で人や動物の脳神経系組織障害や疾患の発症あるいは認知機能低下などに関する疫学研究および実験研究の知見を紹介する。

3 章. 酸化ストレスによる脳神経系疾患の発症メカニズム

微小粒子 (PM_{2.5}) の脳神経系組織に及ぼす影響が活性酸素 (ROS) と深く関わっていることを理解するためには脳神経系疾患の発症も ROS と深く関わっていることを理解することは極めて重要である。本章では、超高齢社会で特に大きな社会問題になっている脳血管性認知症、アルツハイマー病およびパーキンソン病の発症に及ぼす活性酸素のかかわりについて述べる。

3.1. 脳血管性認知症の発症メカニズム

脳血管性認知症は認知症の約 20% を占めており、比較的細い脳動脈のあちこちで動脈硬化が起こる多発性脳梗塞である。動脈硬化は、血流中の正常な低密度リポタンパク (LDL) 粒子が血管粘膜下層に入りし炎症部位などで酸化され酸化 LDL になることで始まる。一方、血流中の単球も血管粘膜下層に入りし粘膜下に入るとマクロファージと呼ばれ、細胞表面の酸化 LDL 受容体を介して酸化 LDL を多量に貪食し、コレステロールを血管内皮下のあちこちに多量に溜め込んでプラークを形成し、多発性動脈硬化へと進行する (2)。この多発性動脈硬化による脳動脈での血流不足や血流途絶の結果、まだらな脳血管性認知機能障害が起こるとされている (3, 4)。このように、脳血管性認知症は ROS による酸化ストレスが病態発症に重要な関わりを持っている。

3.2. アルツハイマー病の発症メカニズム

アルツハイマー病は日本人の認知症の 50～70% を占めるとされており、その発症には ROS が深く関わっている (5-7) ことが知られている。その発症仮説には β -アミロイドタンパク (A β) 説と神経原線維変化を招くタウタンパク説が有力であり、その両者に ROS が深く関わっている。

図 4 に示したように、ROS は脳神経細胞膜上のアミロイド前駆体タンパク (APP) が γ -セクレターゼで分解されて生じた A β 42 のオリゴマー (老人斑) の触媒作用およびミクログリアやアストロサイトなどの貪食作用で生じる。この時、炎症性サイトカイン類も多量に産生さ

図 4 酸化ストレス (ROS) によるアルツハイマー病の発症メカニズム

れ脳神経細胞膜やミトコンドリアの機能障害 (ATP 産生障害など) を起こし脳神経細胞が破壊される。その他、侵入してきた細菌や DEP, ナノ粒子などをもミクログリアやアストロサイトが貪食して ROS を産生し、炎症性サイトカイン類も産生し脳神経細胞を破壊することが知られている (6, 8-11)。

もう一つの神経原線維変化も、上記のようにして生じた ROS によって神経細胞の微小管構成成分のタウタンパクをリン酸化する酵素・GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) が活性化されることで起こる (7)。リン酸化されたタウタンパクは微小管から外れてタウタンパク質同士で異常結合する。これにより神経細胞が崩壊し綿クズのような神経原線維変化が生じると考えられている。このように ROS が脳神経細胞の膜傷害やミトコンドリア細胞を破壊し、アルツハイマー病が起こると考えられている。

3.3. パーキンソン病の発症メカニズム

パーキンソン病は中脳の黒色細胞の死滅で起こる病気であり、その発症にも ROS が深く関わっている (12)。3.2 項等で述べたように、強い酸化ストレスにより脳神経細胞のミトコンドリア (Mt) に機能異常が起こり、その結果 Mt のシトクロム C が遊離し、それがカスパーゼを活性化し黒色細胞がアポトーシスを起こして死滅するという (図 5)。

一方、マイルドな酸化ストレスでは核内転写因子の Nrf2 が活性化され、これが核内に移行して DNA 上の抗酸化応答領域 (ARE) の転写を活性化し、HO-1, SOD (スーパーオキシド・ジスムターゼ), GPx (グルタチオンペルオキシダーゼ), CAT (カタラーゼ) などの様々な抗酸化酵素を産生し、それらが Mt での酸化ストレスを抑制し、更なる細胞死を防止する (12) と考えられている。

この考えを支持する事実として、Jazwa ら (13) は、神経変性疾患の神経細胞保護と神経組織の炎症の抑制に抗酸化酵素、とりわけ HO-1 が重要な役割を果たしてい

図5 パーキンソン病の発症メカニズムと Nrf2 の抗酸化防御系発現による発症防御のメカニズム (Tufekci ら (12), 一部改変)

るという。この時、Nrf2 と低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α) も関与しているとし、Nrf2 を活性化する薬物が開発されれば神経変性疾患の治療に役立つと述べている。こうした論文は他にも多数報告されており、ROS との関連が強く示唆されている (14, 15)。

4 章. 大気中微小粒子が脳神経系に及ぼす人に関する疫学研究

4.1. 子供や若齢者の記憶・学習能に及ぼす影響

慢性的な微小粒子吸入は子供や若齢者の上部気道や下部気道に慢性炎症を起こすことが知られている。さらに、鼻部の呼吸上皮には粒子が蓄積し、鼻部の呼吸上皮関門を破壊し全身性の炎症を誘起し、ひいては脳にも炎症を起こし認知機能の低下や器質的異常を起こすことが報告されている。

米国ボストン市での調査では、居住地の自動車由来の黒煙炭素粒子濃度の増加につれて児童の知能が低下していたという (16)。調査は 8 ～ 11 歳の児童 202 人を対象にし、2 種類の認知機能検査を行った。カウフマンの簡単な知能テスト (K-BIT) では IQ 値が 7.7 点ほど低下し、教育的な習得度テストでは 3.4 点低下し、いずれも有意な低下であった。別の広範な記憶能力と学習能力を調べるテスト (WRAML) での視覚性認知能力、言語発声能力・学習能力などを総合した IQ もそれぞれ 5.3 点と 3.8 点と有意に低下していたという。

4.2. 高齢者の認知能に及ぼす影響

最近、ディーゼル排気 (DE) など由来する粒子状大気汚染物質への長期曝露が人の認知機能や脳神経系に影響をおよぼすという報告が増えている。例えばドイツで、自動車由来粒子状物質の汚染地域に居住する高齢者の認知機能を調べたところ、住居が沿道に近いほど、すなわち PM2.5 濃度が高い地域の人ほど認知機能が低く、その程度は汚染レベルに直線的に相関していたという (図 6) (17)。

図6 居住地から幹線道路までの距離と認知機能テストスコア低下度合および PM2.5 の距離減衰 (Ranft ら (17))

この調査はドイツ人女性 399 人を対象とし、54 ～ 55 歳時点で認知機能のベースライン調査を行い、68 ～ 79 歳時点で認知機能の変化を調べている。認知機能検査は、言語の流暢性、精神現在症ミニテスト (MMSE)、単語の思い出しテストなど 10 種類のテストを組み合わせた CERAD-プラスと呼ばれるテストである。調査地域の PM2.5 レベルは 18 ～ 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲で、特別な高汚染地域ではない。なお、右図には調査地域の PM2.5 の距離減衰曲線を示した。PM2.5 は、NO₂ などと異なり、汚染源から離れても濃度の減衰率は少ないという特徴があり、この図でも 450 m 離れても 25% 程度しか減衰せず、PM2.5 汚染は低減しづらいことを示している。

また、米国・ボストンの 65 歳以上、平均年齢 78.1 歳の高齢者 765 人を 16.8 ヶ月間追跡した調査でも道路からの距離が近いほど認知記憶能力が低下しているという上記報告と類似の結果が示された (18)。なお、この調査地域の自動車由来大気汚染物質として測定されたブラックカーボン (BC) 濃度は 0.15 ～ 0.98 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の間にあり、年平均値は 0.36 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であったという。

さらに、自動車由来の BC 濃度と認知機能の関連を調査した Power ら (19) によると、米国の高齢者 680 人の調査で、BC 濃度が 2 倍になるにつれ精神現在症ミニテスト (MMSE) の点数が 25 点以下になる人が 1.3 倍ずつ増えたとしている。このように、ディーゼル排ガス汚染が高齢者の認知機能低下を招くという事実は Weuve ら (20)、Gatto ら (21) も報告している。

4.3. ヒトの脳神経系における生化学的・病理学的変化

近年、高度の大気汚染がヒトの脳神経系にも酸化ストレスや慢性炎症を起こすことが報告されている。

Calderón-Garcidueñas ら (22) は高汚染のメキシコ市と空気のきれいな対照地域において事故等で死亡した子供や青年の大脳皮質中の認知症に関連する生化学指標の測定と 134 種の遺伝子を DNA アレイ分析した。

メキシコ市は 3 方が山に囲まれた盆地状地形のため大気汚染が激しいことで有名な街である。対象者は、メキ

シコ市の 1～32 歳の 35 名 (平均年齢 18.4 歳), 対象地域の 2～40 歳の 8 名 (平均年齢 21.8 歳) で, アルツハイマー病の危険因子であるアポ E4 型保持者はメキシコ市に 8 名いたが, 対象地域には 1 名もいなかった。このような対象者の中で, 神経原線維変化を起こす過剰リン酸化されたタウタンパクと A β オリゴマー (老人斑) 形成を示した人は対照地区ではいずれも 0% であったが, メキシコ市では各々 40% と 51% であった。さらに, APP 分解酵素や β -synuclein も 2～4 倍に増えていたという。

DNA アレイによるメキシコ市在住者の遺伝子発現は, 血管新生や酸化ストレスに関連する DNA の発現が増加し, 逆に GPx, iNOS, Cu, Zn-SOD などの抗酸化酵素の発現は抑制されており, 大気汚染が脳にも強い酸化ストレスを起こしていることが示された。さらに, 自然免疫や獲得免疫に関する面からみると, サイトカインや TLR (Toll Like Receptor) などの炎症に関係する受容体の発現も顕著で, IL-1, IL-1R (IL-1 Receptor) 拮抗剤, IFN- β , などは 22～6 倍も強く発現し, その他のサイトカインや TLR 類も数倍に増加していたという。これらは脳でも慢性炎症が起こっていることを示す結果である。

また, Calderón-Garcidueñas ら (23) は, メキシコ市内および対照地域の 11.9 $\pm$ 4.2 歳の学童 139 人の脳脊髄液中のサイトカインおよびケモカイン量を測定し, 最も顕著な違いが見られたのは炎症性サイトカインの増加で, IL-6 (18 倍), MIP-1 α (5.8 倍), IL-1Ra (4 倍), IL-2 (2 倍) などであった。さらに, 炎症や免疫反応を惹起するマクロファージ遊走阻害因子 (MIF) は高汚染地域で 4.9 倍に増加し, また血清中でも 1.6 倍に増えており, 中枢神経系に炎症を起こしている児童の同定に MIF は優れたバイオマーカーであるとしている。

さらに, アルツハイマー病に関連したヒトの脳の組織標本を調べた報告もある。先の図 4 に簡単な発症メカニズムを紹介したが, アルツハイマー病では微量の鉄や銅とコンプレックスを形成した A β 42 が異常に凝集・蓄積して活性酸素を産生し脳神経細胞を損傷するが, これに関した報告である。

Calderón-Garcidueñas ら (24) は, メキシコ市の高汚染地域と低汚染地域の中産階級の非喫煙者の中から, 精神疾患歴, 認知症家族歴, 肥満, 薬物中毒や職業曝露などが無い死亡者 19 人 (平均年齢 51.2 $\pm$ 4.9 歳) の脳のオートプシー標本から A β 42 量や炎症の指標を調べた。これら高汚染地域の人の脳では, 前頭皮質と海馬の A β 42 量が低汚染地域の人より各々 3～7 倍高く, また炎症の指標であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) の遺伝子発現量は部位により 2～25 倍高かった。さらに, 前頭皮質の COX2 遺伝子の発現量は, 高汚染地域の人では脱塩基部位 (AP sites) 量として測定した酸化的 DNA 損傷と強い相関を示していた。これらの結果は, 高汚染地域ではヒトの脳に炎症や酸化ストレスが起こり, NF κ B などの核内転写因子が活性化され, 炎症に関わる COX2 などの遺伝子が高度に発現したことを示している。

アルツハイマー病は, 上記のように活性酸素が関わる酸化ストレスと強い関連が知られている。そのため, アルツハイマー病患者の食事性抗酸化物質摂取量の調査が行われている。その結果, カロリーの過剰摂取, 野菜の摂取不足, ビタミン C やビタミン E, ポリフェノールなどの摂取不足, 神経ビタミンと言われる B 系ビタミン類の摂取不足, 魚の摂取量が少ないことなどが報告されている (25–27)。

こうした結果から, 抗酸化物質や魚の摂取不足が活性酸素の増加を招き, その結果として A β 42 や炎症指標の増加というアルツハイマー病様病態の促進因子が増加することが示唆されている。

また, アルツハイマー病の主要なリスク因子は加齢と女性とされている。人は加齢につれて酸化ストレスが蓄積するので加齢がリスク因子であることは容易に理解できる。一方, 女性がリスク因子とはなぜか。女性が男性より長寿であるからではないという。若い女性のミトコンドリアは女性ホルモンによって ROS を産生する A β 42 の毒性から防御されているが, 高齢女性にはその作用がないという。このため, ミトコンドリアは酸化ストレスから防御されず, また脳神経細胞がアポトーシスを起こし易いと考えられている (28)。

さらに, アルツハイマー病には遺伝的リスク因子が知られている。アポ E4 と呼ばれるリポタンパク質 (VLDL) の構成タンパク質である。VLDL にはアポ E2 型, アポ E3 型およびアポ E4 型の 3 種があり, アポ E3 型が正常型である。アポ E2 型は脂質代謝異常と関わり, アポ E4 型がアルツハイマー病のリスク因子である。例えば, Calderón-Garcidueñas ら (29) の報告では, 25 歳以下の若者にも関わらず, アポ E3 型の正常者では A β 42 の増加は 59% であったのに対しアポ E4 型では 100% に見られたという。ただ, アポ E4 型の人が全てアルツハイマー病になるわけではない。

また, 軽度認知障害者 (MCI) の割合や MCI からアルツハイマー病になる割合も男性より女性で高く, またアポ E4 型遺伝子保持者ではより高く, これには ROS によるタウタンパクのリン酸化が関与しているという報告もある (30)。

4.4. ヒトのドーパミン濃度, 気分等に及ぼす影響

交通警察官は大気汚染物質に晒される職業であるため, 彼らの神経反応に及ぼす調査も行われている。

Tomei ら (31) は, ローマ市内の男女交通警察官 50 人と内勤警察官 50 人の尿中ドーパミン代謝物 (ホモバニリン酸) 濃度を調べ, 交通警察官の平均値が内勤者より男性で 60%, 女性で 42% と有意に増加していることを見出し, 自動車由来大気汚染がドーパミン代謝を亢進していると述べている。

さらに, Tomei ら (32) は, 同市内の交通警察官 306 人と内勤警察官 301 人の血清中ドーパミン (DA) 濃度を調べ, 交通警察官の平均 DA が内勤者より男性で

14%, 女性で 6% と有意に増加していることを見出し、特に DA 濃度が 39 pg/ml 以上の高濃度者の出現率が交通警察官で高いことを認めている。また統計的有意差はなかったが、男性警察官の気分に関する質問調査では、不安、うつ病およびパニック発作などがあったと答えた割合は内勤者の 4.2% に対し交通警察官では 7.2% で 1.7 倍高かったという。

大気中には CO, O₃, NO₂, SO₂, Pb, Mn, Cd, ベンゼン, PAHs など様々な汚染物質が検出される上に、交通警察官の業務上のストレスも大きいので、気分障害などに何が関与しているかは確定できないが、自動車由来の大気汚染物質が精神的ストレスを増強し、気分障害をも増強していることが示唆されたことの意義は大きい。

4.5. 人の嗅覚に及ぼす影響

最近、アルツハイマー病では記憶障害よりも嗅覚障害が先に現れるとか、臭いをかぐことが認知症の予防になる可能性があるという報告が見られ、嗅覚と認知機能の間に深い関連があることが示唆されている。それと関連して、PM2.5 あるいは DEP などの微小粒子は呼吸器だけでなく、嗅上皮層を介して脳に侵入し臭い識別能力にも影響することが報告されている。

Calderón-Garcidueñas ら (33) は、対照地区在住青年 25 人とメキシコ市在住青年 62 人に臭い識別テスト (UPSIT) を行った結果、嗅覚欠損者は前者で 12% であったのに対し後者では 35.5% であった報告している。このことから、臭い識別能力が低下していたのは、微小粒子やナノ粒子が嗅覚に炎症を起こしたためとしている。また、メキシコ市民のうち、アポ E4 保持者は臭い検査 10 項目のうち 2.4 個を喪失しており、アポ E 2/3 および 3/3 型保持者の 1.36 個より多かったという。このことから、アポ E4 は嗅覚機能の感受性因子でもあったと考えられる。さらに、平均年齢 20.8 歳のメキシコ市民 35 人の嗅球の顕微鏡観察では、嗅球上皮肥厚、Aβ42 の免疫反応性が 35 人中 29 人で増加し、神経中の α-synuclein 反応性亢進 (4 人/35 人) およびグリア細胞の免疫反応性などが亢進していた。また、ナノ粒子の神経系への蓄積も 35 人中

2 人にみられたという。一方、これらの顕微鏡的異常は対照地域住民には全く認められていない。

なお、上記メキシコ市は微小粒子やナノ粒子だけでなく、PM10 (粗大粒子) やオゾンなどの汚染もある地域である。ただ、ここで取り上げる脳への影響を考えると、PM10 は肺や鼻腔からの侵入率が極めて低いことと毒性も低いとされている。また、オゾンは肺や血液中の脂質成分と反応して脂質過酸化物質 (LOP) や H₂O₂ を生成して肺に障害を及ぼすことが知られている。しかしその一方で、それら生成物は血液中に入ると全身を巡るとマイルドな酸化ストレスサーとして働き様々な組織の細胞内核内転写因子 Nrf2 を活性化し抗酸化酵素等関連遺伝子 (ARE) の発現を高め防御的に働くとの知見が多い (34) (図 5 参照)。このような事実から、メキシコ市における大気汚染物質の脳への影響は DEP を中心とする微小粒子やナノ粒子が主要な影響因子であろうと考えられている。

5 章. 大気中微小粒子が脳神経系に及ぼす動物実験研究

本章の主な内容の概要を表 2 にまとめた。

5.1. イヌの痴呆および脳神経系に及ぼす影響

大気汚染物質は動物の認知機能にも影響しているという報告がある。メキシコ市での報告 (35) では、犬の痴呆診断スコアが低下していたという。PM10 と PM2.5 の年間平均濃度が各々 78 μg/m³ と 21.6 μg/m³ 言う大気汚染が高い所で飼育されていた犬の同スコアは加齢につれて著しく悪化し、6～7 歳ころから前認知症レベルの犬が現れ、11～12 歳では世話人を時々忘れ、身振りでのコミュニケーションも忘れるなど認知能の低下が認められている。一方、対象地域の犬にはこのような例はないという。

この低下は、加齢につれて脳の血管内皮細胞やグリア細胞内の NFκB と iNOS の発現量が増し、脳での炎症亢進と連動している。これに続く病理学的検査では、鼻腔・嗅覚関門および脳血管関門 (BBB) の崩壊、大脳皮質神

表 2 大気中微小粒子が脳神経系に及ぼす動物実験研究

対象粒子 (投与形態)	発現した影響	文献
①自動車由来粒子吸入	犬の認知機能低下, 脳内の炎症亢進	35
②同上	犬の嗅上皮・脳で酸化ストレス, 炎症, Aβ 等増加	36
③DE (DEP) 吸入	ラット脳でも酸化ストレス亢進, 炎症亢進, Aβ 増加	37, 38
④DEP (培養細胞系)	ミクログリアに DEP 添加で ROS 産生亢進 DEP のドーパミン神経細胞毒性はミクログリア由来 ROS	8
⑤ナノ粒子 rich-DE の吸入	マウスの学習能, 認知能低下 (細菌感染条件下で強化) この低下は主に海馬でのグルタミン酸の細胞外放出による神経毒性で, 炎症と酸化ストレスも深く関与	40-43
⑥ナノ粒子 rich-DEP 点鼻	危険回避学習能低下, 自発運動能低下	44
⑦DE (DEP) 吸入	胎児期曝露による自発運動能と脳細胞内 DA 低下	45-47

経の崩壊, グリア白質細胞のアポトーシス, 脂肪滴の蓄積や神経原線維変化などが加齢につれて進行していた。これら脳の変化は, 持続性の呼吸器炎症や鼻腔・嗅覚上皮の障害と深い関わりを持ち, アルツハイマー病様の病変がかなり早期に現れていることを示している。

なお, 犬の痴呆の主な症状や異常行動を以下の 10 項目: ①食欲・下痢, ②生活リズム, ③後退行動, ④歩行状態, ⑤排泄状態, ⑥感覚器異常, ⑦姿勢, ⑧鳴き声, ⑨感情表出, ⑩習慣行動, に分類し 100 点満点で判定する診断法が 1997 年に内野富弥博士により考案され, 国際的に犬の痴呆診断法として使用されている。http://www.5a.biglobe.ne.jp/~wantail/rouken/rouken07.html 参照。

5.2. イヌの嗅上皮および脳神経系に及ぼす生化学的变化

上記報告と同じメキシコ市屋外で飼育されていたイヌの嗅覚, 脳神経系における生化学的变化の報告 (36) もある。この地域の PM10 濃度は 1990 年から 2001 年までの間, $70 \mu\text{g}/\text{m}^3$ から $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ へと低下していたが, この地域の犬の脳では酸化ストレスによる DNA 損傷も認められ, その指標としての脱塩基部位 (AP sites) 出現の割合は対照地域犬より 3.2 倍高く, 特に嗅球と海馬で高かったという。

その他, 前頭葉皮質と心臓でも AP sites の割合は高い傾向にあるが, 鼻呼吸上皮では全く違いが無く, 肺と小脳でもあまり大きな違いは無かった。また, 粒子状物質

由来の Ni とバナジウム (V) も検出され, その濃度は嗅覚粘膜上皮 > 気管支周囲のリンパ節嗅球 > 嗅球 > 前頭葉皮質の順であった。

汚染地域犬と対照地域犬の生化学指標を免疫染色でみると, 表 3 に示したように, 汚染地域の犬でのみ NFkB が神経細胞で増え, iNOS が嗅覚上皮細胞, アストロサイトおよび神経細胞で増え, COX2 は嗅覚上皮細胞とアストロサイトで顕著に増え, しかも 1 歳頃から加齢につれて増えている。一方, 対照地域のイヌでは 4~5 歳ころまでそうした変化は認められていない。

また, アルツハイマー病で増えることが知られている細胞骨格タンパク質であり, 脳損傷とも関係が深い原線維酸性タンパク質 (GFAP) もアストロサイトで 1 歳以降に顕著に増加している。その他, アポ E はアストロサイト細胞で, APP と Aβ プラーク (老人斑) はアストロサイトや血管周囲細胞で加齢につれて増加している。さらに組織学的に見ると, 呼吸性鼻上皮では正常な粘液線毛上皮が完全に扁平化成性上皮に置き換わり, 膨大な増殖細胞が存在し基底膜から上皮層に拡大し, 広範な慢性炎症浸潤が粘膜下組織にまで拡大していたという。

これらの結果は, 粒子状物質の慢性吸入は呼吸器での炎症と嗅覚系の障害を経て, 全身性の炎症を引き起こし, 脳にアルツハイマー病様の病態を引き起こしていることを示唆している。次に, これらの病態が酸化ストレスに続いて起こることを紹介する。

表 3 メキシコ市と対照地域で飼育された犬の年齢群ごとの脳の免疫染色の違い

年齢群	NFkB	iNOS	COX Glial & endothelial	GFAP	ApoE glial & vascular	APP	β-amyloid plaques	β-amyloid vascular
1-4 W MC (5)	0	0	+	0	0	0	0	0
1-4 M 対照群 (6) MC (2)	0 +	0 +	0 ++	0 +	0 0	0 0	0 0	0 0
5-11 M 対照群 (1) MC (5)	0 +	0 ++	0 +++	0 ++	0 ++	0 ++	0 +	0 0
1-3 y 対照群 (2) MC (3)	0 ++	0 ++	0 +++	+	0 ++	0 ++	0 +	0 0
4-5 y 対照群 (3) MC (5)	0 ++	0 ++	+	+	0 ++	0 ++	0 ++	0 +
6-8 y 対照群 (2) MC (5)	0 ++	+	+	+	+	0 ++	0 ++	0 ++
10 y MC (1)	++	++	+++	+++	++	++	++	++

免疫染色強度: 0=none; +=minimal; ++=moderate; +++=strong. W=週令, M=月令, y=年齢, MC=メキシコ市 Calderón-Garcidueñas ら (36)

5.3. 動物の脳での酸化ストレスと炎症性変化

DEP の脳に及ぼす影響は主に酸化ストレスと炎症によると考えられている。DEP による酸化ストレスについては、DEP あるいは BC 中 OC の代謝過程で活性酸素が生成すること、および EC がマクロファージなどの食細胞に取り込まれ、そこで活性酸素が産生されるメカニズムを第 1 部の図 2 に示した。また、脳内では食細胞を有するミクログリアやアストロサイトなどが DEP や PM_{2.5}、ナノ粒子を食食し活性酸素を産生し、炎症をも亢進することを図 4 に示した。

Levesque ら (37) はラットに DEP 濃度が 0, 0.5 および 2.0 mg/m³ の DE を 4 時間/日、5 日/週ずつ 1 ケ月間吸わせた実験で、嗅球、大脳皮質および中脳のいずれの臓器でも DEP 濃度に依存して TNF α 、IL-1 β 、IL-6、MIP-1 α が有意に増加していると報告している。また、酸化ストレスの指標である最終糖化産物 (AGE) の受容体 (RAGE) とミクログリア活性化指標の IBA-1 も同様に増加し、特に中脳での増加が顕著であったという。これらの知見は、DE 曝露が脳の広範な部位で酸化ストレスと炎症を起こしていることを示している。なかでも、大脳皮質の酸化ストレスと炎症はアルツハイマー病との関連を示唆し、中脳のそれはパーキンソン病との関連を示唆し、嗅球のそれは両者との関連を示唆している。

さらに、DEP 投与で TNF α が血清でも脳全体でも顕著に増加している。ミクログリアの培養系では 50 μ g の DEP 単独添加では TNF α や NO 産生増加は認められないが、LPS (細菌細胞膜リポ多糖) と DEP の併用投与群では 5 μ g DEP 濃度でも TNF α や NO 産生増加が認められた。このことは、極めて低濃度の DEP 汚染でも感染やアレルギーなどの共存下ではミクログリアは容易に炎症反応を起こすことを示している。一方、DE を 6 ケ月間吸わせたラットの前頭葉、中脳、小脳、側頭葉、嗅球などでは TNF α 、IL-1、IL-6 などが増加し脳に炎症性の障害を起こし、また DEP 濃度に比例してアルツハイマー病の原因物質である A β 42 が増加し、900 μ g/m³ 群では 5～6 倍にも増加している。さらに、神経原線維変化の基になるタウタンパクも DEP 濃度に比例して増えている (38)。

また、神経細胞障害のメカニズムを調べた実験として、神経細胞に対する DEP の特異的毒性は ROS 産生によることを報告を紹介する。Block ら (8) は、ミクログリアの培養系に DEP を添加し細胞内外で多量の O₂⁻ が産生されることを認め、この培養系に NADPH-oxidase 阻害剤のサイトカラシン D を添加すると O₂⁻ 産生は抑制されたことを認めた。また、NADPH-oxidase 欠損マウスのミクログリアでは DEP を添加しても O₂⁻ 産生は認められなかった。さらに、この培養系にドーパミン (DA) 作動性神経細胞を加えて培養すると DA 取り込みが顕著に抑制されたという。この結果から、DA 作動性神経細胞に対する選択的毒性は ROS によると結論付けている。また、Hartz ら (39) も、BBB 機能障害は DEP の酸化ストレスと炎症性サイトカイン産生を介し起こるとしている。

5.4. 記憶学習能への影響

ナノ粒子を多く含む DE (Nanoparticle-rich DE, NRDE) の学習能や記憶能のような脳高次機能に及ぼす影響と関連遺伝子の発現も調べられている。Win-Shwe ら (40) は、マウスに 149 μ g/m³ の NRDE を 5 時間/日、5 日/週ずつ 1 ケ月間曝露し、その間に細菌感染を想定して週 1 回ずつリボタイコ酸 (黄色ブドウ球菌の細胞膜) を腹腔内投与した。その結果、モーリス水迷路試験による空間認知能の低下と海馬における NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 型グルタミン酸受容体サブユニット mRNA の発現が対照群より 3 倍前後増加したことを認めた。このことは、NMDA 受容体の高度発現によりグルタミン酸の細胞外への放出が起こり、それにより認知機能が障害されたことを示唆する。グルタミン酸は細胞内には多量に存在するが、細胞外に放出されると神経細胞に対して危険な毒性を持つためである。なお、この実験では、海馬内の IL-1 β 、TNF- α および抗酸化酵素の HO-1 などの mRNA 発現も上昇しており、NRDE による炎症と酸化ストレスが亢進し、認知機能の低下を招いていることが示唆されている。

なお、上記と同様の曝露後、マウスの嗅球における実際の細胞外グルタミン酸レベルと記憶能力関連遺伝子の発現を調べたところ、グルタミン酸レベルの増加と NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットの mRNA 発現が有意に増加していた (41)。このことは、NRDE とリボタイコ酸の存在下では、実際にグルタミン酸放出が起こり、神経毒性を引き起こしていることを示している。

グルタミン酸は記憶・学習能に重要な役割を果たしている一方、神経系では内因性興奮毒としての性質もあり、細胞死、パーキンソン病、抑うつ等の神経症にも関わっているという。そのため、その細胞外レベルの増加は神経細胞にとって極めて深刻となる。

上記の実験は、高濃度で細菌感染+35 μ g/m³ NRDE 曝露群および 149 μ g/m³ NRDE からフィルターで粒子を除去した群 (5.5 μ g/m³ NRDE) と対照群について、感染因子を併用しない 3 ケ月曝露の海馬に及ぼす影響も調べられた (42)。いずれの群も水泳運動能力に違いは無いが、NRDE 群では水中に隠されたプラットホームに到達するまでの時間が長くなり、NRDE 曝露濃度に依存して空間記憶学習能力が低下していることが示された。

さらに、NRDE が海馬依存性の非空間学習能 (新しいものに興味を示すまでの時間) に影響するかどうか、さらにその神経毒性のメカニズムを調べるために、マウスを対照群、47 μ g/m³-NRDE 群、129 μ g/m³-NRDE (H-NRDE) 群、および H-NRDE 群から粒子を除いた群 (Free-NRDE 群) に 3 ケ月間曝露した (43)。その結果、H-NRDE 群では識別能指数は対照群や F-NRDE 群より優位に低下していた。また、海馬での mRNA 発現と免疫染色実験から、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットの mRNA 発現に有意な違いはなかったが、グルタミン酸輸送体 (EAAT4) の mRNA 発現が低下し、またミクロ

グリアの活性指標 (Iba-1) の染色が強まる結果が得られた。

これらのことから、H-NRDE 群では、海馬でのグルタミン代謝に異常を生じ、かつミクログリアが活性化されたことで神経毒性が発現し非空間認知機能低下に影響した可能性が示唆されている。

また、Yokota ら (44) は、ナノ粒子が豊富な DEP をラットに 1 匹当たり 10 μg か 50 μg を週 1 回ずつ 4 週間点鼻投与し、危険回避学習能、自発運動能および脳の乳頭内側核のドーパミンとその代謝物濃度を調べた。その結果、対照群では危険回避能力が日に日に向上するが DEP 投与群では向上が認められず、その程度は濃度に依存していた。また、自発運動能やドーパミンとその代謝産物量にも変化は認められなかった。この実験では情動に及ぼす影響は明らかでないが、危険回避能力に関わる記憶には影響が及んでいることが示唆されている。仮に、このことを人に敷衍して考えると、危険を避ける判断能力の低下を示唆しているものと思われる。

5.5. 胎児期曝露の自発運動能とドーパミン神経系への影響

一方、胎児期の DEP 曝露でも同様の影響が報告されている。Suzuki ら (45) は胎仔期から 7 週令まで DEP 濃度が 171 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の DE を連続吸入させた実験で自発運動量が有意に低下し、さらに脳内情報伝達物質のドーパミンやセロトニン量の減少を認めている。このことは、多動症候群やうつ病など情動面に影響を及ぼす知見であるとともにアルツハイマー病のような認知機能の低下を招く可能性を示唆している。こうした影響評価は慎重でなければならないが、極めて重要な知見である。

さらに、彼らは妊娠 2～16 週目に DE に曝露された母親から生まれた雄マウスの 4～5 週令時の自発運動能と前頭葉皮質等のモノアミン型神経伝達物質の変化を調べ、胎児期曝露マウスの自発運動能は非曝露マウスより有意に低下し、特に明け方の点灯時での低下が顕著で、また前頭葉皮質のドーパミンやノルアドレナリンとそれらの代謝物の濃度は有意に増加していたという。ドーパミン代謝の異常は成長後パーキンソン病に結びつく可能性が危惧される。

Yokota ら (46) も、妊娠マウスに 1 mg DEP/ m^3 という比較的高濃度のディーゼル排気を 1 日 8 時間、週 5 日間曝露し、生まれた仔の 5 週令時点で自発運動能の有意な低下とドーパミン代謝の低下を認めた。この現象についてはより詳しい報告もある (47)。

ま と め

1. 大気中微小粒子状物質は、非常に小さいため肺や鼻腔の嗅覚上皮から体内に侵入し様々な組織に影響を及ぼす。本稿では、脳神経系に及ぼす影響について紹介した。

2. 肺から取り込まれた微小粒子やナノ粒子は血管を介して全身を巡り、脳にも取り込まれる。一方、嗅覚上皮を介する粒子は嗅球を経て脳に侵入する。いずれの場合も、脳神経系のミクログリア、アストロサイト、マクロファージなどの細胞に貪食され炎症を起こし活性酸素 (ROS) をも産生する。また、DEP やナノ粒子の有機炭素成分 (OC) の解毒代謝過程でも酸化還元サイクル反応で活性酸素が産生され、さらに元素状炭素 (EC) も上記細胞の貪食作用で ROS を産生し、脳神経細胞を損傷すると考えられている。
3. 脳血管性認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病の発症にも炎症や活性酸素が関与するメカニズムを紹介した。
4. 吸入された微小粒子・ナノ粒子の脳神経細胞に及ぼす影響は、炎症によると共に、脳内の上記貪食細胞による活性酸素産生を介して起こるものと思われる。
5. 人に及ぼす影響には、老人や子供の記憶・学習能力の低下に関する報告が多く、さらには脳神経細胞内ドーパミン濃度の低下を介して不安、うつ病、気分障害などを起こす可能性が考えられる。さらに、微小粒子状物質汚染の激しい地域の死亡者の脳の病理標本からは、アミロイド $\beta 42$ (老人斑) の蓄積や過剰にリン酸化されたタウタンパク、あるいは神経細胞のアポトーシス等アルツハイマー病様病態やパーキンソン病様病態が認められている。
6. 動物実験では、人と同様に記憶・学習能力の低下やドーパミン、セロトニンの低下による運動能力の低下などが報告されている。さらには、認知機能低下や危険回避学習能の低下などの報告もある。また、脳神経組織の病理学的、生化学的变化に関する報告があり、主に炎症性サイトカイン産生、核内転写因子・NF κ B を介した COX2, iNOS の過剰発現など炎症や活性酸素生成に関する報告が多い。

また、人の場合と同様に、アルツハイマー病様病態やパーキンソン病様病態の発現の報告もある。さらに重要なことは、胎児期に曝露を受けるとその中の微小粒子・ナノ粒子は胎盤と脳血管関門 (BBB) をも通過し胎児の脳内にも侵入し、自発運動能力などの低下を招くことである。なお、本稿では触れなかったが、胎児では生殖系にも影響が及ぶことが知られており、微小粒子やナノ粒子の健康影響は広範である。

こうした微小粒子・ナノ粒子の広範な健康影響を考えると、国内での主な発生源である自動車、船舶、建設機械、航空機、大型固定発生源などの内燃機関等の更なる改良、排ガス規制とともに越境汚染の低減に努める対策の必要性を強調したい。さらに、今後利用が拡大することが予測される様々なナノ粒子素材への対策も求められている。

謝 辞

本総説は、一部文部科学省の科学研究費（研究課題番号：25340066）により実施された。

利益相反なし

文 献

- (1) 嵯峨井勝, ウィンシェイ ティンティン. 大気中微小粒子状物質 (PM2.5) から生じる酸化ストレスと脳神経障害: 第 1 部. 日本衛生学雑誌 2015;70:127–133.
- (2) Steinberg D, Pathasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915–924.
- (3) Faraci FM. Protecting against vascular disease in brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H1566–1582.
- (4) Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanism to therapeutic opportunities. *Antioxid Red Signal* 2010;12: 125–169.
- (5) Delfino RJ, Staimer N, Vaziri ND. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. *Air Qual Atmos Health* 2011;4:37–52.
- (6) Moulton PV, Yang W. Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *J Environ Public Health* 2012;2012: 472751.
- (7) Lloret A, Badia MC, Giraldo E, Ermak G, Alonso MD, Pallardó FV, et al. Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011;27:701–709.
- (8) Block ML, Wu X, Pei Z, Li G, Wang T, Qin L, et al. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J* 2004;18:1618–1620.
- (9) Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 1999;93:182–193.
- (10) Milton RH, Abeti R, Averaimo S, DeBiasi S, Vitellaro L, Jiang L, et al. CLIC1 function is required for beta-amyloid-induced generation of reactive oxygen species by microglia. *J Neurosci* 2008;28:11488–11499.
- (11) Lloret A, Badia MC, Mora NJ, Ortega A, Pallardó FV, Alonso MD, et al. Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2008;44:2019–2025.
- (12) Tufekci KU, CiviBayin E, Genc S, Genc K. The Nrf2/ARE pathway: A promising target to counteract mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease* 2011;2011:314082.
- (13) Jazwa A, Cuadrado A. Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuro-inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets* 2010;11:1517–1531.
- (14) Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, et al. Induction of the Nrf2-derived antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem* 2005;280:22925–22936.
- (15) Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, et al. The Nrf2-ARE pathway: An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci* 2008;1147:61–69.
- (16) Suglia SF, Gryparis A, Wright RO, Schwartz J, Wright RJ. Association of black carbon with cognition among children in prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol* 2008; 167:280–286.
- (17) Ranft U, Schikowski T, Sugiri D, Krutmann J, Krämer U. Long-term exposure to traffic-related particulate matter impairs cognitive function in the elderly. *Environ Res* 2009;109:1004–1011.
- (18) Wellenius GA, Boyle LD, Coull BA, Milberg WP, Gryparis A, Schwartz J, et al. Residential proximity to major roadway and cognitive function in community-dwelling seniors: results from the MOBILIZE Boston study. *J Am Geriatr Soc* 2012;60:2075–2080.
- (19) Power MC, Weisskopf MG, Alexeeff SE, Coull BA, Spiro A 3rd, Schwartz J. Traffic-related air pollution and cognitive function in a cohort of older man. *Environ Health Perspect* 2011;119:682–687.
- (20) Weuve J, Puett RC, Schwartz J, Yanosky JD, Laden F, Grodstein F. Exposure to particulate air pollution and cognitive decline in older women. *Arch Intern Med* 2012; 172:219–227.
- (21) Gatto NM, Henderson VW, Hodis HN, St John JA, Lurmann F, Chen JC, et al. Components of air pollution and cognitive function in middle-aged and older adults in Los Angeles. *Neurotoxicology* 2014;40:1–7.
- (22) Calderón-Garcidueñas L, Kavanaugh M, Block M, D'Angiulli A, Delgado-Chávez R, Torres-Jardón R, et al. Neuroinflammation, hyperphosphorylated tau, diffuse amyloid plaques, and down-regulation of the cellular prion protein in air pollution exposed children and young adults. *J Alzheimers Dis* 2012;28:93–107.
- (23) Calderón-Garcidueñas L, Cross JV, Franco-Lira M, Aragón-Flores M, Kavanaugh M, Torres-Jardón R, et al. Brain immune interactions and air pollution: macrophage inhibitory factor (MIF), prion cellular protein (PrP^C), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), and interleukin-2 (IL-2), in cerebrospinal fluid and MIF in serum differentiate urban children exposed to severe vs. low air pollution. *Front Neurosci* 2013;7:183. eCollection 2013.
- (24) Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot RR, Henríquez-Roldán C, Delgado-Chavez R, Calderón-Garcidueñas A, et al. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol* 2004;32:650–658.
- (25) Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, et al. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer's disease. *JAMA* 2002;287: 3223–3239.
- (26) Friedland RP. Fish consumption and risk of Alzheimer disease: is it time to make dietary recommendations? *Arch*

- Neurol 2003;60:923–924.
- (27) Huang TL, Zandi PP, Tucker KL, Fitzpatrick AL, Kuller LH, Fried LP, et al. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon 4. *Neurology* 2005;65:1409–1414.
- (28) Vina J, Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 2010;20:S527–533.
- (29) Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán C, Torres-Jardón R, Nuse B, Herritt L, et al. Long term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol* 2008;36:289–310.
- (30) Altmann A, Tian L, Henderson VW, Greicius MD, ADNI investigators. Sex modifies the apoE-related risk of developing Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2014;75:563–573.
- (31) Tomei F, Rosati MV, Carrocca M, Cherubini E, Baccolo TP, Anzelmo V, et al. Work exposure to urban pollutants and urinary homovanillic acid. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2003;38:2909–2918.
- (32) Tomei G, Capozzella A, Ciarrocca M, Fiore P, Rosati MV, Fiaschetti M, et al. Plasma dopamine in workers exposed to urban stressor. *Toxicol Ind Health* 2007;23:421–427.
- (33) Calderón-Garcidueñas L, Franco-Lira M, Henríquez-Roldán C, Osnaya N, González-Macié A, Reynoso-Robles R, et al. Urban air pollution: Influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults. *Exp Toxicol Pathol* 2010;62:91–102.
- (34) Sagai M, Bocci V. Mechanism of action involved in ozone therapy: Is healing induced via mild oxidative stress? *Med Gas Res* 2011;1:29.
- (35) Calderón-Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling TM, Osnaya N, et al. Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol* 2002;30:373–389.
- (36) Calderón-Garcidueñas L, Maronpot RR, Torres-Jardón R, Henríquez-Roldán C, Schoonhoven R, Acuña-Ayala H, et al. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol Pathol* 2003;31:524–538.
- (37) Levesque S, Taetzsch T, Lull ME, Kodavanti U, Stadler K, Wagner A, et al. Diesel exhaust activates and primes microglia: Air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity. *Environ Health Perspect* 2011;119:1149–1155.
- (38) Levesque S, Surace MJ, McDonald J, Block ML. Air pollution & the brain: Subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 2011;8:105.
- (39) Hartz AM, Bauer B, Block ML, Hong JS, Miller DS. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *FASEB J* 2008;22:2723–2733.
- (40) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, Fujimaki H. Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust. *Neurotoxicology* 2008;29:940–947.
- (41) Win-Shwe TT, Mitsushima D, Yamamoto S, Fujitani Y, Funabashi T, Hirano S, et al. Extracellular glutamate level and NMDA receptor subunit expression in mouse olfactory bulb following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure. *Inhal Toxicol* 2009;21:828–836.
- (42) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, Fujimaki H. Nanoparticle-rich diesel exhaust affect hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice. *Nanotoxicology* 2012;6:543–553.
- (43) Win-Shwe TT, Fujimaki H, Fujitani Y, Hirano S. Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;262:355–362.
- (44) Yokota S, Takashima H, Ohta R, Hirano S, Fujimaki H. Nasal instillation of nanoparticle-rich diesel exhaust particles slightly affects emotional behavior and learning capability in rats. *J Toxicol Sci* 2011;36:267–276.
- (45) Suzuki T, Oshio S, Iwata M, Saburi H, Odagiri T, Udagawa T, et al. In utero exposure to low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:7.
- (46) Yokota S, Mizuo K, Moriya N, Oshio S, Sugawara I, Takeda K. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci Lett* 2009;449:38–41.
- (47) Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, Takeda K. Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. *J Toxicol Sci* 2013;38:13–23.