

### (3) ディーゼル排気中ガス状物質曝露がアレルギー性結膜炎に及ぼす影響の解析

細川友和 (星薬科大学 薬学教育研究センター) 小林隆弘 (国立環境研究所 環境健康研究領域)

#### 要旨

ディーゼル排気中の粒子 (DEP) の影響を検討するために、粒子の存在するディーゼル排気とフィルターで粒子を除去したディーゼル排気中ガス状成分 (除粒子) の比較検討を計画した。まず、平成 12、14 年度の課題として、これまでにデータの蓄積があるディーゼル排気濃度の 0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> (DEP 濃度として) について検討した結果、DE の 0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> において認められたアレルギー性結膜炎の増悪は粒子を除去することにより減少することが示唆された。

今年度は、除粒子によるアレルギー性結膜炎増悪の減少に濃度依存性が成り立つかを厳密に確認する目的で、単独では炎症スコアおよび結膜血管透過性にほとんど影響を及ぼさない濃度である 0.1 mg/m<sup>3</sup> (DEP 濃度として) の DE 濃度について確認のためにさらに検討を加えた。実験には、Hartley 系雄性モルモットを用いた。ディーゼル排気 (DE) の曝露は、国立環境研究所の AC 系曝露チャンバーを用いて行った。清浄空気群、DEP 濃度として 0.1 mg/m<sup>3</sup> の DE 曝露群および DEP 濃度として 0.1 mg/m<sup>3</sup> の DE から粒子状成分を取り除いたガス状成分の 3 群 (1 群 6 匹) を設定した。アレルギー性結膜炎は、卵アルブミン (OVA) の点眼による能動感作および点眼チャレンジにより誘発した。その結果、アレルギー性結膜炎における結膜炎症状スコアおよび結膜内色素漏出量において、Air 群と比較して DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群および DE の除粒子群ともに色素漏出量の有意差な差はみられなかった。これまでに、アレルギー性結膜炎に及ぼす 0.05、0.1、0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> の粒子濃度のディーゼル排気 (DE) 曝露を 35 日間行いその影響を検討した。その結果、DE 単独では炎症スコアおよび結膜血管透過性に影響を与えないが、0.1、0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> の濃度において、OVA 感作動物におけるアレルギー性結膜炎スコアおよび結膜炎時の血管透過性亢進に対する増強が濃度依存的に認められ、DE 曝露がアレルギー性結膜炎を増悪する可能性を示唆した。したがって、用量 (濃度) 反応性を確認する基本である 3 濃度について検討した結果、DE 曝露による結膜血管透過性の増強にはディーゼル排気中のガス状成分よりも粒子状成分の方がより関与していることが示唆される。

#### 研究目的

近年、花粉症、アトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー性疾患が増加しており、大きな社会問題となっている。我国における花粉症はその 80% 以上が日本スギによるものであるといわれている<sup>1)</sup>。これらアレルギー性疾患の増加の要

因として、大気汚染物質との関連が指摘されている 2)。

我々はこれまでに、アレルギー性結膜炎に及ぼす 0.05、0.1、0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> の粒子濃度のディーゼル排気 (DE) 曝露を 35 日間行いその影響を検討した。その結果、DE 単独では炎症スコアおよび結膜血管透過性に影響を与えないが、0.1、0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> の濃度において、OVA 感作動物におけるアレルギー性結膜炎スコアおよび結膜炎時の血管透過性亢進に対する増強が濃度依存的に認められ、DE 曝露がアレルギー性結膜炎を増悪する可能性を示唆した。そこで、ディーゼル排気中の粒子 (DEP) の影響を検討するために、粒子の存在するディーゼル排気とフィルターで粒子を除去したディーゼル排気中ガス状成分 (除粒子) の比較検討を計画した。まず、平成 12、14 年度の課題として、これまでにデータの蓄積があるディーゼル排気濃度の 0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> (DEP 濃度として) について検討した結果、DE の 0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> において認められたアレルギー性結膜炎の増悪は粒子を除去することにより減少することが示唆された。

今年度は、除粒子によるアレルギー性結膜炎増悪の減少に濃度依存性が成り立つかを厳密に確認する目的で、単独では炎症スコアおよび結膜血管透過性にほとんど影響を及ぼさない濃度である 0.1 mg/m<sup>3</sup> (DEP 濃度として) の DE 濃度について確認のためにさらに検討を加えた。

## 研究方法

### 1) 実験動物

実験には、4 週齢で日本 SLC 株式会社 (浜松、日本) より購入した Hartley 系雄性モルモットを用いた。モルモットは室温 25±1、湿度 55±5% の恒温恒湿室で 12 時間サイクルの明暗条件下で、また標準的なモルモット餌 (ORC4, Oriental Yeast Co. LTD, 東京) および滅菌水を与えて飼育した。モルモットは 1 群 6 匹とし、合計 36 匹を用いた。

### 2) ディーゼル排気 (DE) の曝露

DE の曝露は、国立環境研究所の AC 系曝露チャンバーを用いて行った。ディーゼル排気ガスは、総排気量 2,740 cc、4 気筒直噴式ディーゼルエンジンを用い、エンジンを動力計上で定常運転 (回転数 1,500 rpm、トルク 10 kg/m) して供給した。燃料は硫黄分 0.2% の市販軽油を使用した。

排出する DE を清浄空気で希釈 (DE 中の DEP 濃度として 0.3 mg/m<sup>3</sup>) し、22 時から翌日 10 時までの 12 時間の DE 間欠曝露を 35 日間行った。

第 1 チャンバー (ACC) には、清浄空気を供給した。第 2 チャンバー (ACG-1) には、フィルターを用いて粒子を除去した DE (除粒子 DE) を曝露した。第 3 チャンバー (ACG-2) には、DEP 濃度として 0.1 mg/m<sup>3</sup> の DE を曝露した。

ガス状成分の濃度は、それぞれ化学発光を利用した分析計 (Model 8850 Monitor Labs Inc, Germany) (ML9841A Monitor Labs Inc, Germany) を用いて測定した。

### 3) アレルギー性結膜炎の誘発

アレルギー性結膜炎は ovalbumin (OVA) の点眼による能動感作および点眼チャレンジにより誘発した。OVA 抗原溶液 (0.75%) は、1 回点眼量 10  $\mu$ l とし、動物の両眼に 7 日間隔で計 6 回点眼した (図 1)。

2 回目 (初回感作から 1 週間後) から 5 回目まで、充血、浮腫等の結膜炎症状を点眼後 30 分間観察し、表 1 に示した結膜炎の症状に対するスコアにより評価した。

### 4) 結膜内血管透過性の測定

アレルギー性結膜炎の指標として、結膜内への Evans blue 色素の漏出を測定した。

動物を urethane (1.6 g/kg, i.p.) 麻酔下で背位固定し、Evans blue 色素 (EB, 30 mg/kg, i.v.) の投与後 20 分に heparin 溶液 (600 U/kg, i.v.) を投与してから瀉血のために灌流液を用いて頭部の灌流を行った (図 2)。

### 5) 灌流および結膜組織の摘出

動物を開胸後、18 ゲージ針を左心室に刺入し、100 ml の灌流液を灌流ポンプ (東京理科器械、TYPE1011) を用いて灌流した。この際、灌流した液が体外に排出されるようにするために右心耳を切開した。また、灌流液が上半身のみには流れるように胸部下行大動脈を鉗子を用いて閉塞した。

灌流液の調製は次のように行った。すなわち、60 の温浴上で 0.05 M sodium citrate 水溶液を約 100 ml 採り、paraformaldehyde の 5 g を溶解した。次に、これに 0.05 M citric acid monohydrate 水溶液および 0.05 M sodium citrate 水溶液を徐々に加えて pH 3.5 に調整し、全量を 500 ml とした。

灌流終了後、眼瞼の周囲の毛を刈り落とし、眼瞼周囲を幅約 5 mm に切断してから眼瞼の先を約 2 mm 残して眼瞼周囲を切り落とした。摘出した結膜組織はプラスチックの容器に入れて直ちに湿重量を測定した。

### 6) 結膜内色素漏出量の測定

色素漏出量の測定は Katayama ら 3) の方法に準じて行った。摘出した組織は湿重量を測定後、細切し、試験管内に入れた後、1 M KOH 溶液 2 ml を加え、パラフィルムで蓋をしてから 37  $^{\circ}$ C、24 時間インキュベートして溶解させた。その後、Evans blue 色素を抽出するために 0.2 M リン酸・アセトン混液 (5:13) 3 ml を加え、2 時間室温で放置し、遠心分離 (3,000 rpm、15 分) 後、波長 620 nm で上清の吸光度を測定した。濃度はあらかじめ Evans blue 色素の標準溶液により作製した検量線を用いて求めた (図 3)。

### 7) 使用薬物

実験には次の薬物を使用した: urethane (Sigma)、Evans blue (Merck)、heparin sodium (ノボインダストリー)、citric acid (和光純薬)、sodium citrate (和光純薬)、paraformaldehyde (和光純薬)、potassium hydroxide (和

光純薬) phosphoric acid (和光純薬) acetone (和光純薬)

## 8) 統計処理

実験結果は平均 ± 標準誤差 (S.E.) で表した。1群はすべて6匹とした。統計学的処理は、Dunnett 法による多重検定を行った。

## 研究結果

### 1) アレルギー性結膜炎の症状に対するスコア

Air 群、DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群、DE の除粒子群について曝露実験を行った (1群6匹)。OVA の対照である生理食塩液を点眼した動物において Air 群、DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群、DE の除粒子群の各群の結膜炎症状スコア (表1) は5項目の合計で表した。4週間の観察期間において2週目までのスコアはそれぞれ0であったが、3週目から4週目においては0.2 から0.5 の間を推移したが有意な変化ではなかった (図4)。

一方、OVA で感作した動物におけるスコアは、Air 群、DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群、DE の除粒子群の各群とも1週目から4週目においては Air 群で  $0.5 \pm 0.2$  (n=6) ~  $5.7 \pm 1.3$  (n=6)、DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群で  $0.3 \pm 0.2$  (n=6) ~  $6.3 \pm 0.7$  (n=6)、DE の除粒子群で  $0.5 \pm 0.2$  (n=6) ~  $5.7 \pm 0.7$  (n=6) であり、Air 群と比較して DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群および DE の除粒子群ともにスコア値に有意な差はみられなかった。(図5)。

### 2) 結膜内色素漏出量

結膜内色素漏出量を検討した結果を図6および図7に示した。

生理食塩液を点眼した動物における結膜内色素漏出量は、Air 群で  $5.1 \pm 0.8$  ng/mg tissue (n=6)、DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群で  $5.9 \pm 2.0$  ng/mg tissue (n=5)、DE の除粒子群で  $6.2 \pm 1.6$  ng/mg tissue (n=6) であり、各群の間に有意な差はみられなかった (図6)。

一方、OVA 感作動物のアレルギー性結膜炎における結膜内色素漏出量は、Air 群で  $10.8 \pm 2.8$  ng/mg tissue (n=6)、DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群で  $11.3 \pm 3.6$  ng/mg tissue (n=5)、DE の除粒子群で  $12.4 \pm 2.9$  ng/mg tissue (n=6) であり、Air 群と比較して DE の 0.1 mg/m<sup>3</sup> 群および DE の除粒子群ともに色素漏出量の有意な差はみられなかった (図7)。

## 考察

これまでの我々の検討で、ディーゼル排気がアレルギー性結膜炎を増悪することが示唆されるが、この増悪に関与する因子としてディーゼル排気中の粒子状成分とガス状成分が挙げられる。そこで、ディーゼルエンジンからの排気ガスを2つにわけ、一方は粒子が存在する状態とし、他方はフィルターを通して粒子を除去した排気ガスのみとして曝露実験を行った。

これまでに検討した DE の 0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> 群においては、OVA 感作動

物のアレルギー性結膜炎における結膜炎症状スコアおよび結膜内色素漏出量で、DEの0.3 および 1.0 mg/m<sup>3</sup> 曝露群で濃度に応じた増強が認められた。しかし、DEの除粒子群ではそれぞれ対応する濃度によるアレルギー性結膜炎に対する増悪が減少した。

このDEの除粒子によるアレルギー性結膜炎に対する増悪が減少に濃度依存性が成り立つかをさらに厳密に確認する目的で、今回は0.1 mg/m<sup>3</sup>（DEP濃度として）のDE濃度について確認のためにさらに検討を加えた。その結果、アレルギー性結膜炎における結膜炎症状スコアおよび結膜内色素漏出量において、Air群と比較してDEの0.1 mg/m<sup>3</sup>群およびDEの除粒子群ともに色素漏出量の有意差な差はみられなかった。

したがって、用量（濃度）反応性を確認する基本である3濃度について検討した結果、DE曝露による結膜血管透過性の増強にはディーゼル排気中のガス状成分よりも粒子状成分の方がより関与していることが示唆される。

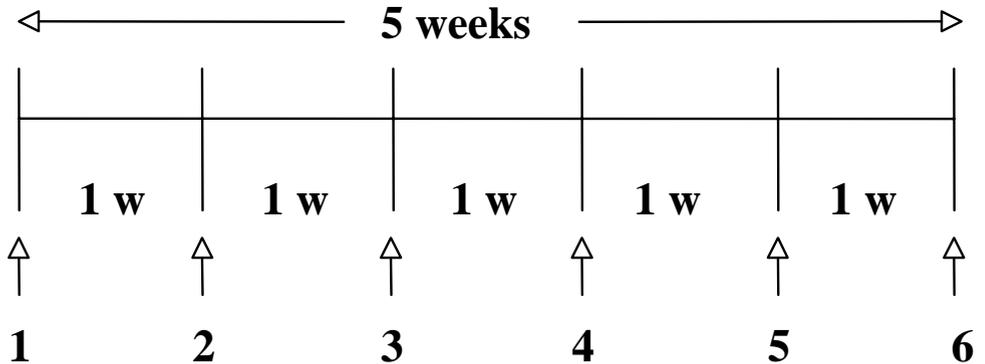
### 参考文献

- 1) 齊藤洋三：スギ花粉症と大気汚染．治療 74, 73-75 (1992)
- 2) 小林隆弘：大気汚染とアレルギー．呼吸 14, 342-352 (1995)
- 3) Katayama, S., Shioyama, H. and Ohtake, S. : A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rat. Microbiol. Immunol. 22, 89-101 (1978)

Exposure to filtered air or DE( 0.1 mg/m<sup>3</sup>)

Instillations of antigen  
0.75% OVA (10  $\mu$  l )

MEASUREMENTS



1. Scoring of conjunctival signs
2. Conjunctival vascular permeability
3. OVA-Specific IgG<sub>1</sub> antibodies

図1 Ovalbumin (OVA) による能動感作およびDE曝露の実験スケジュール

## Schedule of the experiment

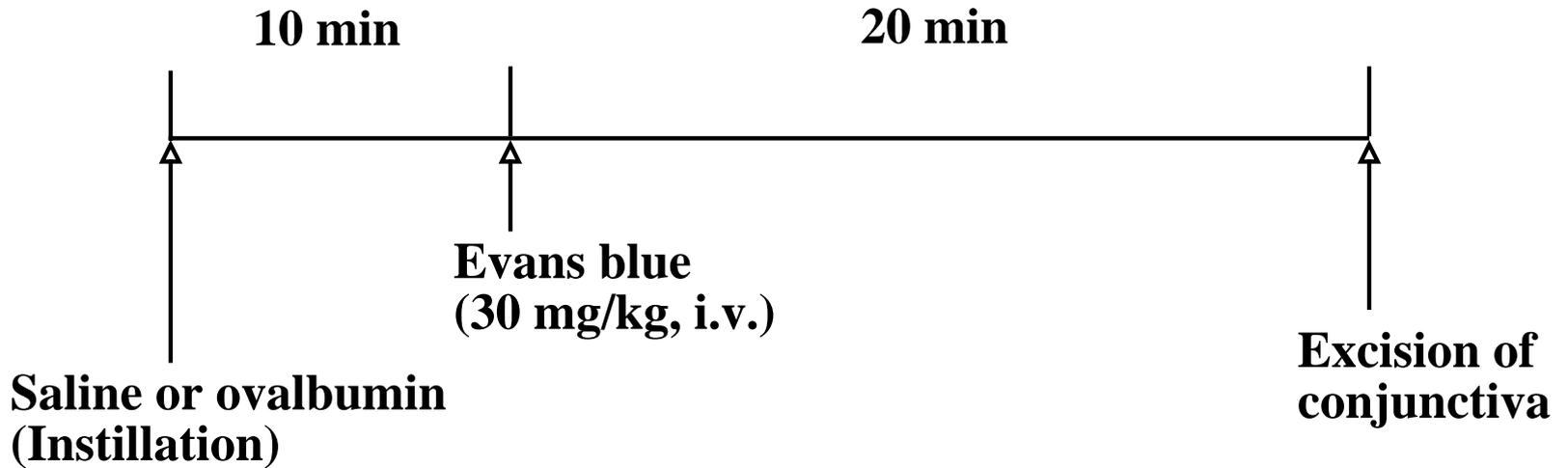


図2 実験スケジュール

## Determination of EB in conjunctiva

**Conjunctiva**

|

**Add 1M KOH 2 ml**

|

**37 , 24 hr**

**Add 0.2 M phosphoric acid : acetone  
(5:13) 3 ml**

|

**R.T. 2 hr**

**Centrifuge (3,000 rpm, 15 min)**

|

**Sup.**

**Absorbance at 620 nm**

図 3 結膜色素漏出量の測定

表 1 結膜炎症状のスコア表

結膜炎症状	正常 (0)	軽微 (+1)	軽度 (+2)	中等度 (+3)	重度 (+4)
眼球結膜充血	なし	わずかな 充血	容易に判別で きる充血	明確な 充血	拡散する 充血
眼球結膜浮腫	なし	わずかな 浮腫	容易に判別で きる浮腫	明確な 結膜浮腫	ひどい 結膜浮腫
眼瞼結膜充血	なし	わずかな 充血	容易に判別で きる充血	明確な 充血	ひどい 充血
眼瞼結膜浮腫	なし	わずかな 浮腫	容易に判別で きる浮腫	明確な 眼瞼浮腫	ひどい 眼瞼浮腫
粘液分泌	なし	糸状の 粘液分泌	粘液濃縮	明確な 粘液分泌	ひどい 粘液分泌

# Saline

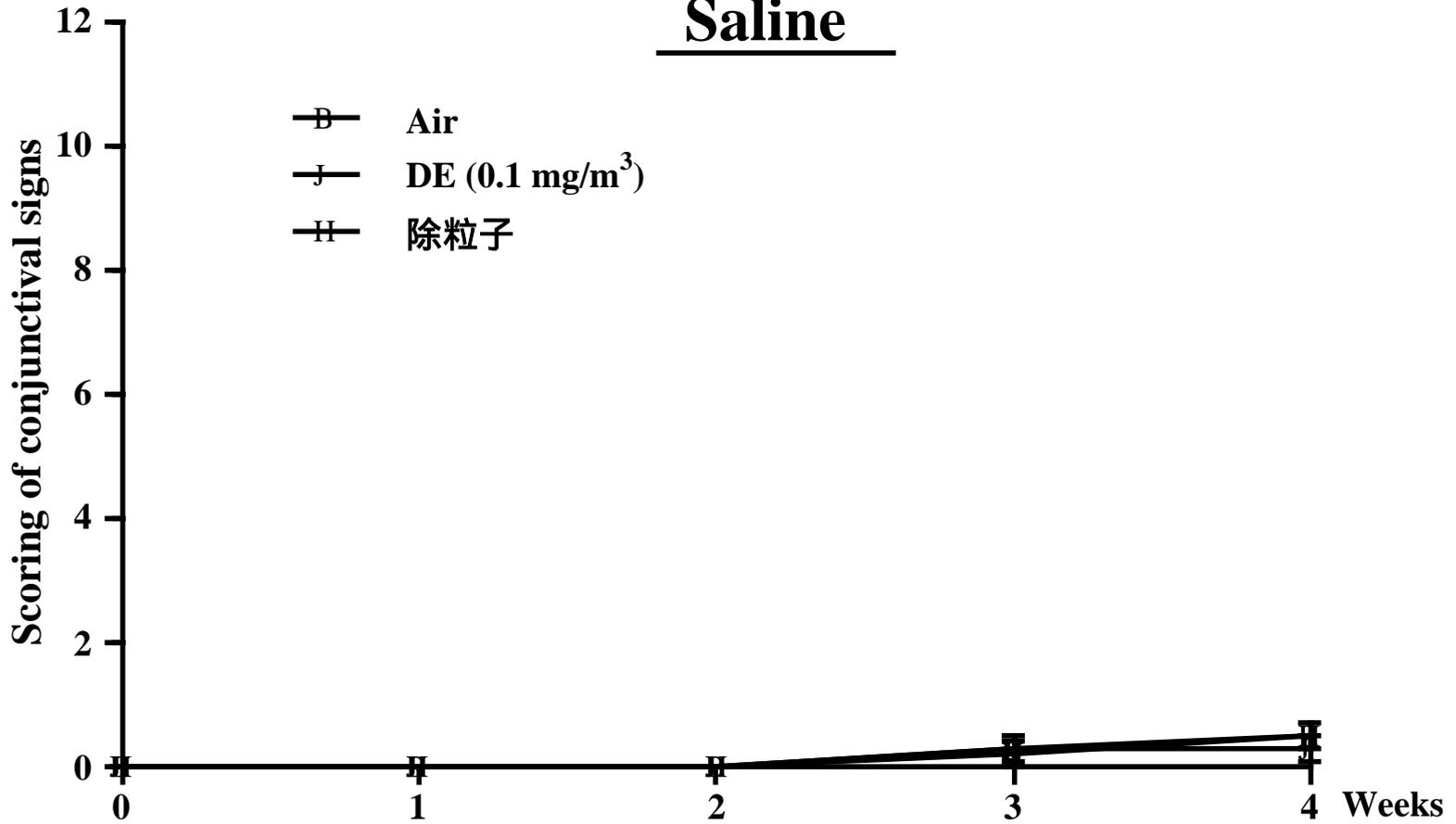


図 4 非感作動物における結膜炎症状のスコア

# OVA (0.75%)

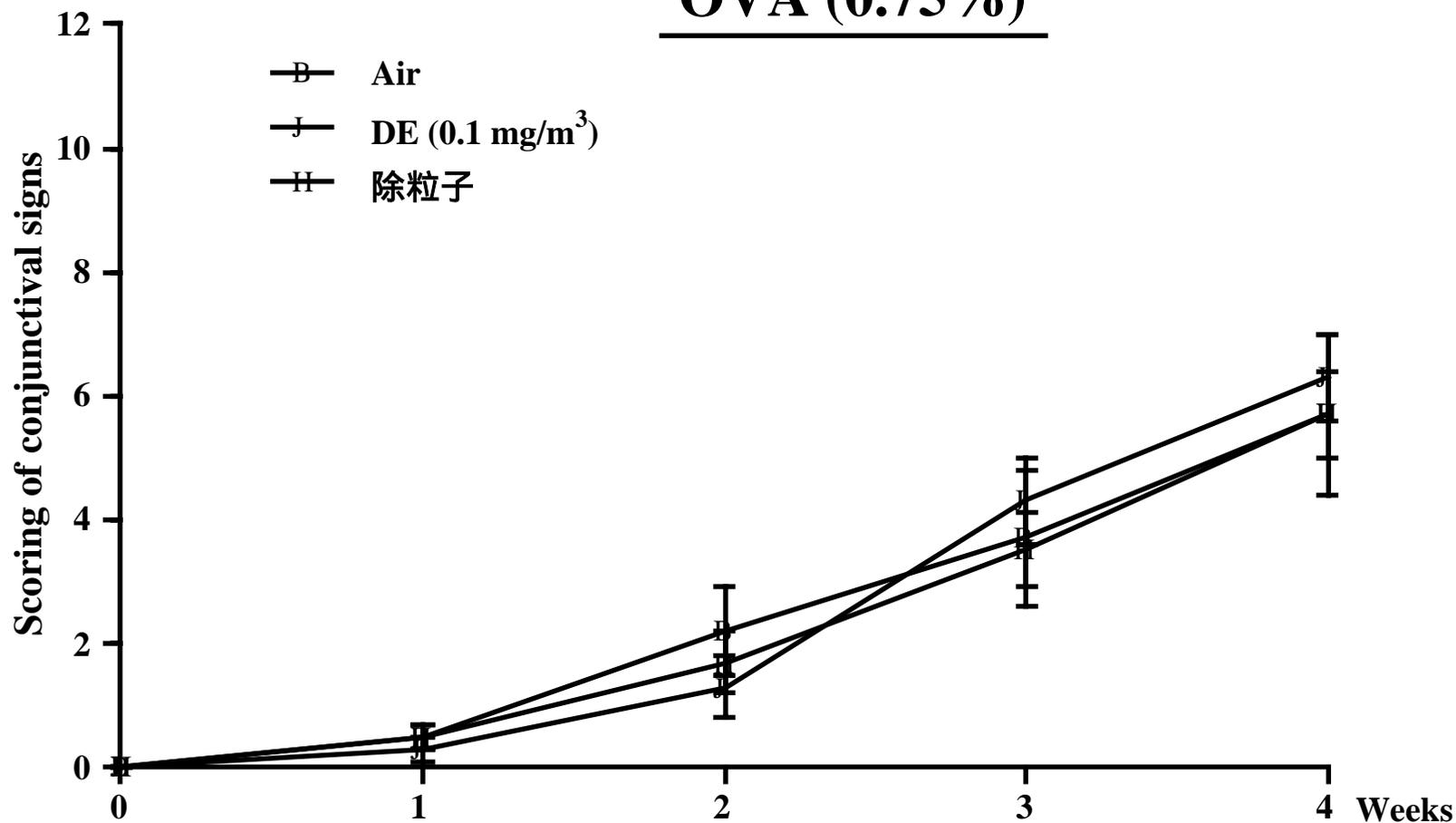


図5 感作動物における結膜炎症状のスコア

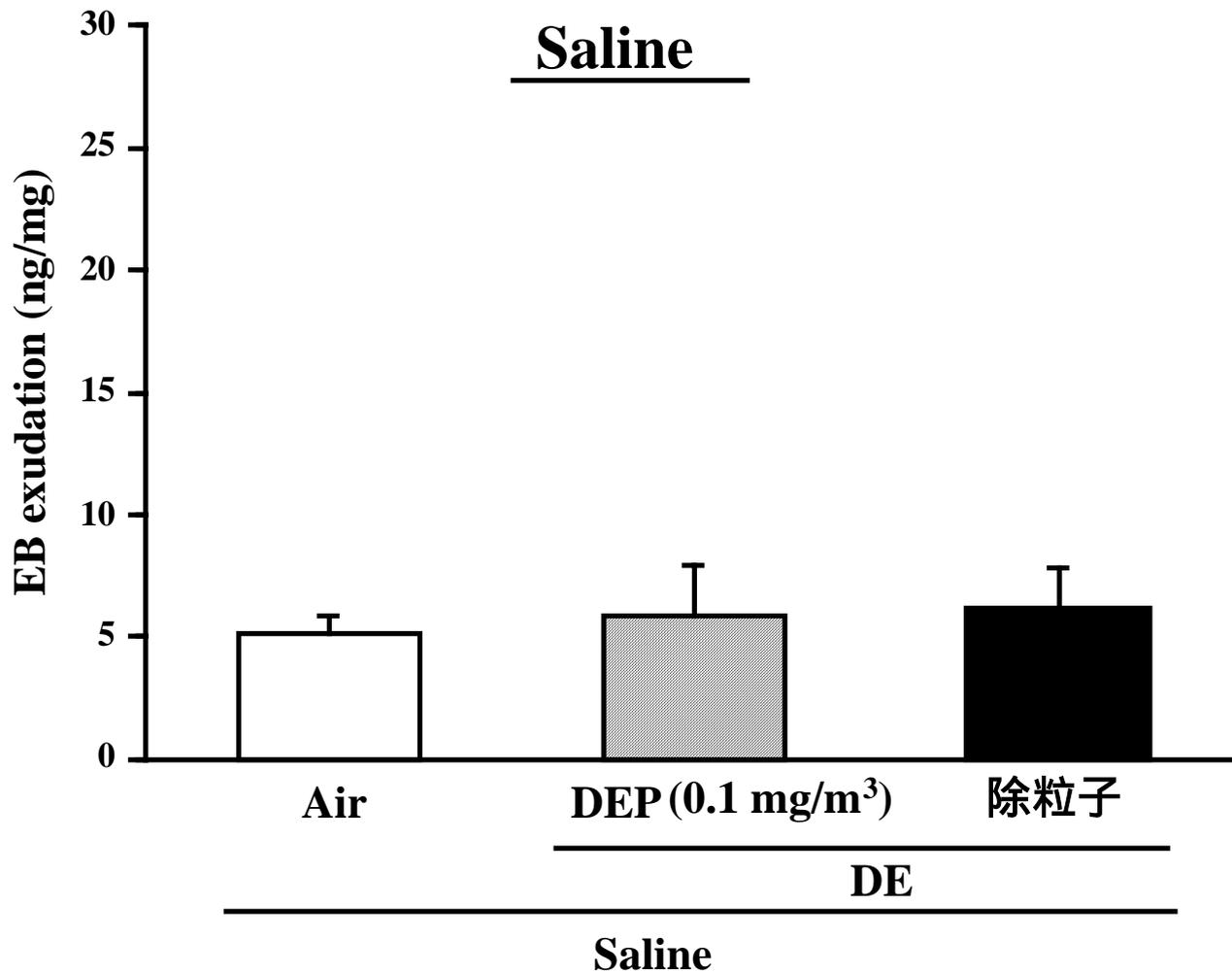


図6 非感作動物の結膜血管透過性に及ぼすDE曝露の影響

## OVA (0.75 %)

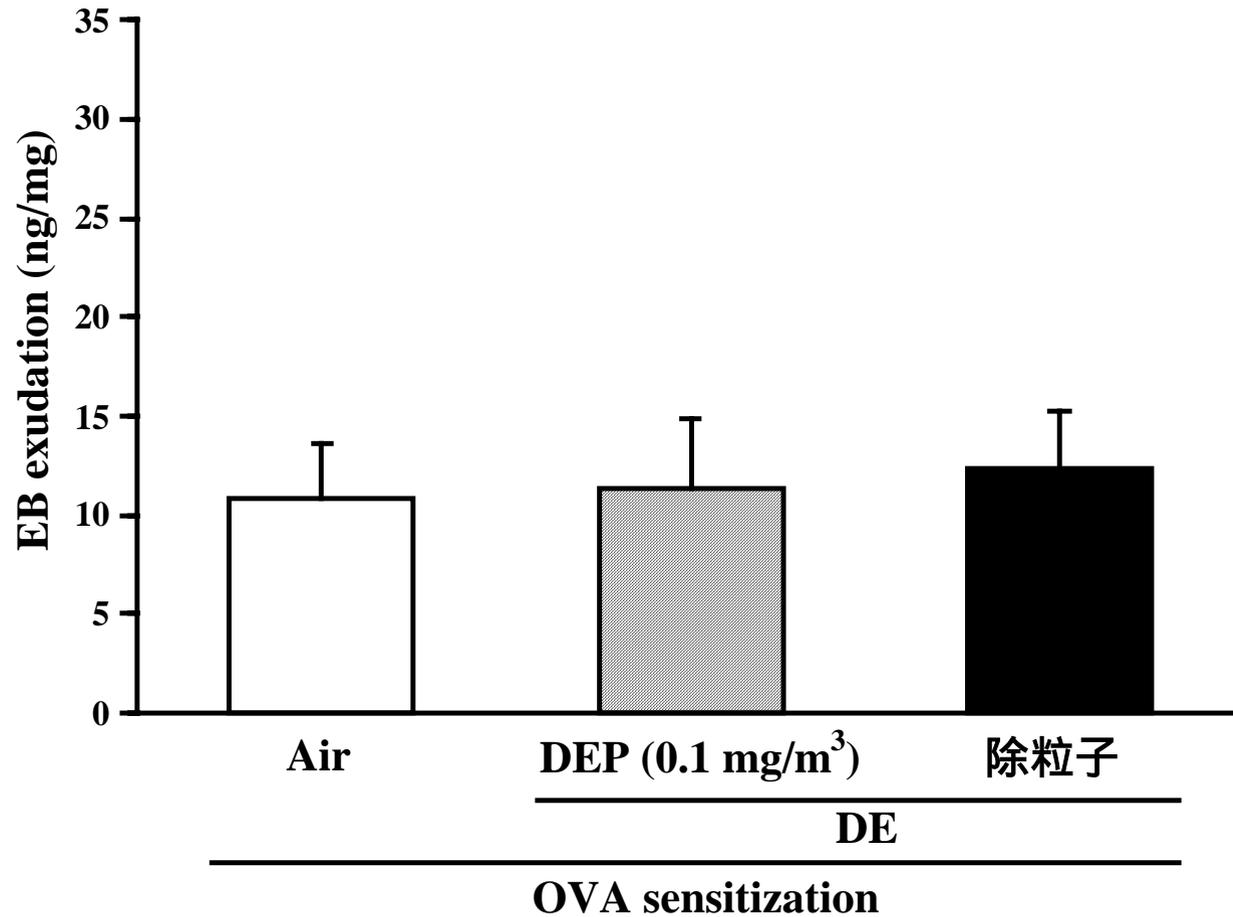


図7 感作動物のアレルギー性結膜炎の血管透過性に及ぼすDE曝露の影響