

(4) PM_{2.5} 抽出物がマウスの細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響とメカニズム解明に関する研究

要旨

【実験 I】

マウスに PM_{2.5} 抽出物、抽出後 DEP 粒子及び細菌由来毒素を、単独あるいは併用してマウスに気管内投与を施行した。24 時間後の検討では、PM_{2.5} 抽出物あるいは抽出後 DEP 粒子単独では気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中に炎症細胞 (好中球) 浸潤はほとんど認められなかった。細菌毒素投与により BALF 中の炎症細胞 (好中球) は有意に増加したが、PM_{2.5} 抽出物あるいは抽出後 DEP 粒子の併用投与によりその増加は顕著に増悪した。病理組織学的検討では、PM_{2.5} 抽出物及び抽出後 DEP 粒子単独投与では肺の好中球性炎症は顕著でなかったが、細菌毒素の投与では明らかな好中球浸潤が観察された。細菌毒素の単独投与に比較して、PM_{2.5} 抽出物の併用投与では肺組織所見に顕著な変化は見られなかったが、抽出後 DEP 粒子の併用投与では好中球性炎症や肺胞出血は著明に増悪していた。肺組織内の炎症性サイトカイン及びケモカインの発現は、細菌毒素単独投与群で有意に上昇し、抽出後 DEP 粒子の併用でさらに有意な上昇が観察された。PM_{2.5} 抽出物の併用は、細菌毒素単独投与に比較して、炎症性サイトカイン、ケモカインを低下させる傾向を示した。

【実験 II】

DEP 構成成分 (DEP 抽出物及び抽出後 DEP 粒子) が細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響の相違を、遺伝子発現のレベルで検討した。特に、細菌毒素受容体遺伝子の発現に注目した。一方、PM_{2.5} 抽出物も含め、抗炎症性サイトカインと補体の変動についても検討を加えた。炎症性サイトカイン及びケモカインの肺における遺伝子発現は、局所のタンパク発現とほぼ同様の傾向を示した。しかし、今回用いた時間設定では、DEP 抽出物と細菌毒素の併用曝露は、細菌毒素単独曝露に比較し遺伝子レベルでの発現に変化を及ぼさなかった。抽出後 DEP 粒子の併用曝露は、細菌毒素の単独曝露に比較し、Toll-like receptor 2 (TLR 2) と Toll-like receptor 4 (TLR 4) の遺伝子発現を有意に増強した。DEP 抽出物の併用は、細菌毒素の単独曝露に比較し、TLRs 発現に明らかな増強をもたらさなかった。一方、DEP 抽出物と抽出後 DEP 粒子は、vehicle 曝露に比較し、TLR 2 と TLR 4 の発現を増強する傾向を示し、特に、DEP 抽出物で強かった。抗炎症効果を発揮する IL-10 タンパクの局所発現は、細菌毒素の単独曝露に比較し、抽出後 DEP 粒子併用曝露では上昇傾向が観察されたが、DEP 抽出物もしくは PM_{2.5} 抽出物との併用曝露では、逆に、低下が認められた。PM_{2.5} 抽出物、DEP 抽出物、抽出後 DEP 粒子との併用曝露は、細菌毒素の単独曝露と比較して、血中補体価に有意な変化を認めなかった。細菌毒素の経気道曝露後に、毒素の血中移行が確認されたが、移行は抽出後 DEP 粒子の併用曝露により増強された。

(4. 1) 背景・目的

過去の疫学的報告から、PM_{2.5} をはじめとする大気中微小浮遊粒子状物質濃度の上昇が呼吸器疾患や循環器疾患による死亡率や重症化率、有病率あるいは有症率の上昇と関連していること、PM_{2.5} の曝露に対して気管支喘息、気管支炎、慢性肺気腫、肺炎、免疫不全者、糖尿病等の患者及び高齢者等の高感受性群が存在することなどが示唆されている。また、過去に実施した動物実験の研究により、大都市部の PM_{2.5} の多くの部分を占める DEP が気管支喘息を増悪することが示唆されていた。しかし、気管支喘息以外の呼吸器疾患に及ぼす DEP や PM_{2.5} の呼吸器影響のメカニズムは全く明らかにされていなかった。

そこで、本研究では、大気中微小粒子状物質に対する高感受性群の多くのケースに易感染性が共通して存在することに着目し、以下の点を目的とし、PM_{2.5} 抽出物並びに DEP 抽出物及び抽出後 DEP 粒子を用いた気管内投与実験を実施した。

目的 I : DEP と PM_{2.5} の構成成分が、細菌毒素による肺傷害を増悪するか否かを明らかにする。
炎症性サイトカインとケモカインの局所発現に注目し、増悪のメカニズムを明らかにする。(→【実験 I】)

目的Ⅱ: DEP や PM_{2.5} の構成成分が細菌毒素に関連する肺傷害を増悪するメカニズムの相違を遺伝子発現のレベルで検討する。特に、細菌毒素受容体の発現や抗炎症性サイトカインに及ぼす影響に注目する。(→【実験Ⅱ】)

(4. 2) 方法

(4. 2. 1) 実験Ⅰ

1. PM_{2.5} 抽出物による急性肺傷害の増悪に関する検討

ICR 系雄性マウス (6 週齢) に下記の実験群を設定し、ハロセン麻酔下にポリエチレンチューブで気管内投与を施行した。

- i. vehicle (対照溶液: 0.05% Tween 加リン酸緩衝液 100 μ l/body) 投与群
- ii. PM_{2.5} 抽出物 (125 μ g/body) 投与群
- iii. 細菌菌体内毒素 (75~100 μ g/body) 投与群
- iv. PM_{2.5} 抽出物 (125 μ g/body) + 細菌菌体内毒素 (75~100 μ g/body) 併用投与群

すべての群で vehicle 群と同様の緩衝液を使用し、気管内投与量も 100 μ l/body と同量にあわせた。投与 24 時間後にマウスをエーテル麻酔下で脱血・屠殺し、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。BALF 中の総細胞数、マクロファージ数、好中球数をチュルク染色とデイフクイック染色で算定した。また、24 時間後に摘出した肺を、中性緩衝ホルマリンで固定し、包埋、薄切の後、Hematoxylin & Eosin 染色液で染色し、組織学的検討を加えた。さらに、24 時間後に摘出した肺を -80°C で凍結保存し、後日、リン酸緩衝液でホモジナイズし、超遠心後の上清に含まれる炎症性サイトカイン及びケモカインの濃度を ELISA で測定した。測定対象とするサイトカインは interleukin (IL)-1 β 、ケモカインは macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α 、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1、keratinocyte chemoattractant (KC) をそれぞれ選択した。

2. 抽出後 DEP 粒子による急性肺傷害の増悪に関する検討

ICR 系雄性マウス (6 週齢) に下記の実験群を設定し、ハロセン麻酔下にポリエチレンチューブで気管内投与を施行した。

- i. vehicle (0.05% Tween 加リン酸緩衝液: 100 μ l/body) 投与群
- ii. 抽出後 DEP 粒子 (125 μ g/body) 投与群
- iii. 細菌菌体内毒素 (75~100 μ g/body) 投与群
- iv. 抽出後 DEP 粒子 (125 μ g/body) + 細菌菌体内毒素 (75~100 μ g/body) 併用投与群

すべての群で vehicle 群と同様の緩衝液を使用し、気管内投与量も 100 μ l/body と同量にあわせた。投与 24 時間後にマウスをエーテル麻酔下で脱血・屠殺し、BAL を行った。BALF 中の総細胞数、マクロファージ数、好中球数をチュルク染色とデイフクイック染色で算定した。また、24 時間後に摘出した肺を、中性緩衝ホルマリンで固定し、包埋、薄切の後、Hematoxylin & Eosin 染色液で染色し、組織学的検討を加えた。さらに、24 時間後に摘出した肺を -80°C で凍結保存し、後日、リン酸緩衝液でホモジナイズし、超遠心後の上清に含まれる炎症性サイトカイン及びケモカインの濃度を ELISA で測定した。測定対象とするサイトカインは IL-1 β 、ケモカインは MIP-1 α 、MCP-1、KC をそれぞれ選択した。

(4. 2. 2) 実験Ⅱ

1. DEP 構成成分 (DEP 抽出物及び抽出後 DEP 粒子) による細菌毒素関連肺傷害増悪のメカニズムの検討

ICR 系雄性マウス (6 週齢) に下記の実験群を設定し、ハロセン麻酔下にポリエチレンチューブで気管内投与を施行した。

- i .vehicle (対照溶液 : 0.05% Tween 加リン酸緩衝液 100 μ l/body) 投与群
- ii .DEP 抽出物 (DEP-OC : 125 μ g/body) 投与群
- iii.抽出後 DEP 粒子 (washed DEP : 125 μ g/body) 投与群
- iv.細菌菌体内毒素 (LPS : 75 μ g/body) 投与群
- v .DEP 抽出物 (125 μ g/body) + 細菌菌体内毒素(75 μ g/body)併用投与群
- vi.抽出後 DEP 粒子 (125 μ g/body) + 細菌菌体内毒素 (75 μ g/body) 併用投与群

すべての群で vehicle 群と同様の緩衝液を使用し、気管内投与量も 100 μ l/body と同量にあわせた。投与 24 時間後にマウスをエーテル麻酔下に脱血、屠殺し、摘出した肺を-80°Cで凍結保存した。血液中の補体活性 (CH50)を測定した。また、一部動物で、血漿中のエンドトキシン濃度を、改良アルカリ前処理による血中エンドトキシン定量法で測定した。後日、摘出肺をリン酸緩衝液でホモジナイズし、超遠心後の上清に含まれる抗炎症性サイトカイン、IL-10、の濃度を ELISA で測定した。一方、気管内投与 4 時間後に肺を摘出し、mRNA を抽出した。細菌菌体内毒素受容体として TLR 2 と TLR 4、炎症性サイトカインとして IL-1 β 、炎症性ケモカインとして MIP-1 α の遺伝子発現を、半定量的 RT-PCR を用いて検討した。発現量は、 β アクチンをハウスキーピング遺伝子とし、これに対する発現比で評価した。

2. PM_{2.5} 抽出物が抗炎症性サイトカインと補体系に及ぼす影響

ICR 系雌性マウス (6 週齢) に下記の実験群を設定し、ハロセン麻酔下にポリエチレンチューブで気管内投与を施行した。

- i .vehicle (対照溶液 : 0.05% Tween 加リン酸緩衝液 100 μ l/body) 投与群
- ii .PM_{2.5} 抽出物 (PM_{2.5}-OC : 125 μ g/body) 投与群
- iii.細菌菌体内毒素 (LPS : 75 μ g/body) 投与群
- iv.PM_{2.5} 抽出物 (125 μ g/body) + 細菌菌体内毒素 (75 μ g/body) 併用投与群

すべての群で vehicle 群と同様の緩衝液を使用し、気管内投与量も 100 μ l/body と同量にあわせた。投与 24 時間後にマウスをエーテル麻酔下に脱血、屠殺し、摘出した肺を-80°Cで凍結保存した。血液中の CH50 を測定した。また、後日、摘出肺をリン酸緩衝液でホモジナイズし、超遠心後の上清に含まれる IL-10 の濃度を ELISA で測定した。

(4. 3) 結果

(4. 3. 1) 実験 I

1. PM_{2.5} 抽出物による急性肺傷害の増悪について

PM_{2.5} 抽出物を気管内投与した群では、総細胞数 (図 2.4.3-1)、好中球数 (図 2.4.3-2)、マクロファージ数 (図 2.4.3-3) とともに vehicle 投与群と有意な差は認めなかった。細菌菌体内毒素を投与した群では総細胞数 (図 2.4.3-1) と好中球数 (図 2.4.3-2) が vehicle 投与群に比較して有意に増加していた。細菌毒素と PM_{2.5} 抽出物を併せて投与すると、総細胞数 (図 2.4.3-1) も好中球数 (図 2.4.3-2) も細菌毒素の単独投与に比較し有意に増加していた。病理組織学的検討では、PM_{2.5} 抽出物単独投与では好中球性炎症は顕著でなかったが、細菌毒素の投与により明らかな好中球浸潤が認められた。細菌毒素の単独投与に比較し、PM_{2.5} 抽出物の併用投与では組織所見には顕著な変化は見られなかった。肺組織内の炎症性サイトカイン及びケモカインの発現 (図 2.4.3-4) は、PM_{2.5} 抽出物投与群では vehicle 群と比較して有意な変化は観察されなかった。炎症性サイトカイン及びケモカインの局所発現は細菌毒素単独投与群で vehicle 群に比較し有意に上昇したが、PM_{2.5} 抽出物の併用は、細菌毒素単独投与に比較し、炎症性サイトカイン、ケモカインを低下させる傾向を示した。

2. 抽出後 DEP 粒子による急性肺傷害の増悪について

抽出後 DEP 粒子投与群では、総細胞数 (図 2.4.3-5)、好中球数 (図 2.4.3-6)、マクロファージ数 (図 2.4.3-7) とともに vehicle 投与群と有意な差は認めなかった。好中球数とマクロファージ数は、vehicle 群と比較し、上昇傾向にあった。細菌菌体内毒素を投与した群では、総細胞数 (図 2.4.3-5) と好中球数 (図 2.4.3-6) が vehicle 投与群と比較して有意に増加していた。細菌毒素と抽出後 DEP 粒子を併せて投与すると、総細胞数 (図 2.4.3-5) も好中球数 (図 2.4.3-6) も細菌毒素の単独投与と比較しさらに有意な増加を示した。病理組織学的検討では、抽出後 DEP 粒子単独投与では好中球性炎症は顕著でなかったが、細菌毒素の投与により明らかな好中球浸潤が認められた。細菌毒素の単独投与と比較し、抽出後 DEP 粒子の併用投与では、好中球性炎症や肺胞出血は著明に増悪していた。肺組織内の炎症性サイトカイン及びケモカインの発現は、細菌毒素単独投与で有意に上昇し、抽出後 DEP 粒子の併用でさらに有意な上昇が観察された (図 2.4.3-8)。

(4. 3. 2) 実験Ⅱ

1. DEP 構成成分 (DEP 抽出物及び抽出後 DEP 粒子) による細菌毒素関連肺傷害増悪のメカニズムの検討

炎症性サイトカイン (IL-1 β : 図 2.4.3-9) 及びケモカイン (MIP-1 α : 図 2.4.3-10) の肺における遺伝子発現は、細菌毒素により vehicle に比較し有意に増強し、抽出後 DEP 粒子の併用曝露によりさらに増強した。本結果は、局所のタンパク発現と同様の結果であった。しかし、DEP 抽出物の併用曝露は、細菌毒素単独曝露とほぼ同様の結果であり、明らかな発現低下は観察されなかった。DEP 抽出物の単独曝露は、vehicle 曝露と比較し、わずかながら炎症性サイトカインとケモカインの発現を増強していた。

抽出後 DEP 粒子と細菌毒素の併用曝露は、細菌毒素の単独曝露と比較し、TLR 2 (図 2.4.3-11) と TLR 4 (図 2.4.3-12) の遺伝子発現を有意に増強した。DEP 抽出物の併用曝露は、細菌毒素の単独曝露と比較し、TLRs 発現に明らかな増強をもたらさなかった。一方、DEP 抽出物と抽出後 DEP 粒子は、vehicle 曝露と比較し、TLR 2 と TLR 4 の発現を増強する傾向を示し、特に、DEP 抽出物で亢進を示した。

抗炎症効果を持つとされる IL-10 の肺局所のタンパク発現は、細菌毒素の単独曝露と比較し、抽出後 DEP 粒子の併用曝露で上昇傾向が観察されたが (図 2.4.3-13)、DEP 抽出物の併用曝露では有意な低下が認められた (図 2.4.3-14)。

抽出後 DEP 粒子、DEP 抽出物の併用曝露は、細菌毒素の単独曝露と比較し、血中補体価に有意な変化を認めなかった。

細菌毒素の経気道曝露後に、その血中移行が確認された。細菌毒素の血中移行は抽出後 DEP 粒子の併用曝露により増強されたが (図 2.4.3-15)、DEP 抽出物の併用曝露では変化は見られなかった (図 2.4.3-16)。

2. PM_{2.5} 抽出物が抗炎症性サイトカインと補体系に及ぼす影響

抗炎症効果を持つ IL-10 の肺局所のタンパク発現に関しては、細菌毒素の単独曝露と比較し、PM_{2.5} 抽出物の併用曝露で、低下傾向が認められた (図 2.4.3-17)。

PM_{2.5} 抽出物の併用曝露は、細菌毒素の単独曝露と比較し、血中補体価に有意な変化をきたさなかった。

(4. 4) 考察

死亡や入院という重篤な予後としばしば関連する呼吸器疾患として、肺癌とともに炎症性の呼吸器疾患、特に呼吸器感染症が重要である。慢性肺気腫、気管支炎、肺炎、糖尿病、免疫不全、高齢者、気管支喘息等の患者は、浮遊粒子状物質による大気汚染に対して高感受性であることが疫学的に報告されているが、これらの患者の急性増悪に呼吸器感染症が関与することは、臨床的にもしばしば経験される。一方、感染症の傷害形成には、感染性生物から産生あるいは遊離される毒素が重要な役割を演じる。

実験Ⅰの検討では、抽出後 DEP 粒子は、それ単独では肺に明らかな炎症は惹起しなかったが、細菌毒素との併存により、細菌毒素に関連する好中球性炎症や肺胞出血を顕著に増悪した。このメカニズムとしては、好中球活性化をはじめとする多くの催炎症性作用を有する IL-1 β 、MIP-1 α 、MCP-1、KC 等の発現増強が重要と考えられた。

一方、PM_{2.5} 抽出物もそれ自体では炎症細胞の浸潤をほとんど惹起しなかったが、細菌毒素による炎症細胞の浸潤を増強した。しかし、PM_{2.5} 抽出物による増悪効果は、抽出後 DEP に比較すると顕著ではなかった。また、この増悪効果は、炎症性サイトカインやケモカインの発現増強以外のメカニズムを介して発現していることが示唆された。

以上より、PM_{2.5} や DEP は、全体としても各構成成分としても、細菌毒素に関連する肺傷害を増悪しうるが、傷害に及ぼす各構成成分の寄与度や内在する増悪メカニズムは、必ずしも同一ではないことが明らかになった。

実験Ⅱの検討では、PM_{2.5} や DEP 構成成分 (DEP 抽出物及び抽出後 DEP 粒子) が細菌毒素に関連する肺傷害を増悪するメカニズムの相違を遺伝子発現のレベルで検討すること、特に、細菌毒素受容体の発現に及ぼす影響を検討することに主眼をおいた。また、抗炎症性サイトカインや補体系の変化についても検討を加えた。

その結果、炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現は、抽出後 DEP 粒子に関してはタンパク発現とはほぼ同様の傾向を示し、抽出後 DEP 粒子と細菌毒素の併用曝露により発現は顕著に増強され、組織傷害の程度とよく相関していた。一方、今回の設定時間では、DEP 抽出物と細菌毒素の併用曝露は、細菌毒素単独曝露に比較し、遺伝子発現の低下を惹起しなかった。現時点では、DEP 抽出物と抽出後 DEP 粒子を細菌毒素と併用曝露する際に、炎症性分子のタンパクと遺伝子の発現経過に時間的相違があることを否定しきれない。

また、細菌毒素の受容体である TLRs の発現も、抽出後 DEP 粒子と細菌毒素の併用曝露によって最も顕著に増強した。TLRs の発現増強が、細菌毒素とその受容体の結合後に惹起されるシグナル伝達を増幅し、結果として、下流に存在する NF- κ B の活性化と炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現をもたらすというスキームも容易に想定しうる。

さらに、細菌毒素の血中測定により、気道系に存在する細菌毒素が容易に血中に移行することが明らかになった。細菌毒素は様々な細胞種に影響を及ぼすため、細菌毒素の血中移行により、その悪影響は血液細胞や凝固系、あるいは遠隔臓器や系統にも及びうる。また、抽出後 DEP 粒子は細菌毒素の血中移行を増幅することから、肺局所のみならず、細菌毒素の全身影響をも修飾する可能性がある。

一方、PM_{2.5} 抽出物や DEP 抽出物の併用曝露が細菌毒素による好中球性炎症を軽度 to 増強するメカニズムを明らかにするため、血中補体の活性化状況を検討したが、有意な変化は見られなかった。抽出物の併用曝露により、細菌毒素単独曝露に比較し、抗炎症性サイトカインである IL-10 の局所のタンパク発現の低下が観察された。IL-10 の抗炎症作用の減弱が、炎症の増幅に関与している可能性を考慮しうるかもしれない。

(4. 5) 結論

PM_{2.5} 及び DEP 構成成分は、それ単独では肺への炎症を惹起する可能性が低い場合でも、細菌毒素受容体や炎症性サイトカインやケモカインの発現増強あるいは抗炎症性サイトカインの発現減弱等を介し、細菌毒素による炎症を増悪する可能性がある。特に、ジクロロメタンで抽出されない成分を含めた粒子成分の増悪作用に注目する必要がある。さらに、気道に存在する細菌毒素の血中移行を DEP 構成成分は増強し、全身影響を修飾する可能性もある。また、PM_{2.5} 抽出物及び DEP 抽出物による増悪作用はよく類似していた。

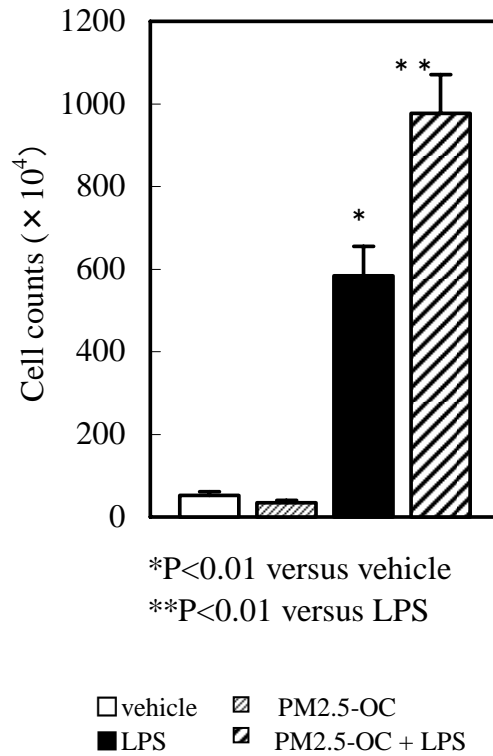


図 2.6.3-1 PM_{2.5}抽出物投与によるBALF中の総細胞数

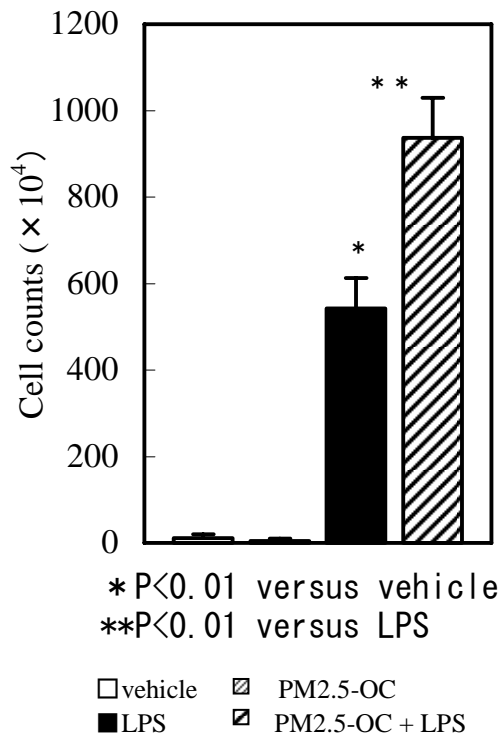


図 2.6.3-2 PM_{2.5}抽出物投与によるBALF中の好中球数

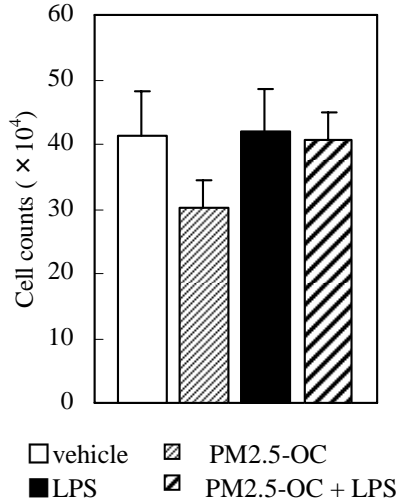


図 2. 6. 3-3 PM_{2.5}抽出物投与による BALF 中のマクロファージ数

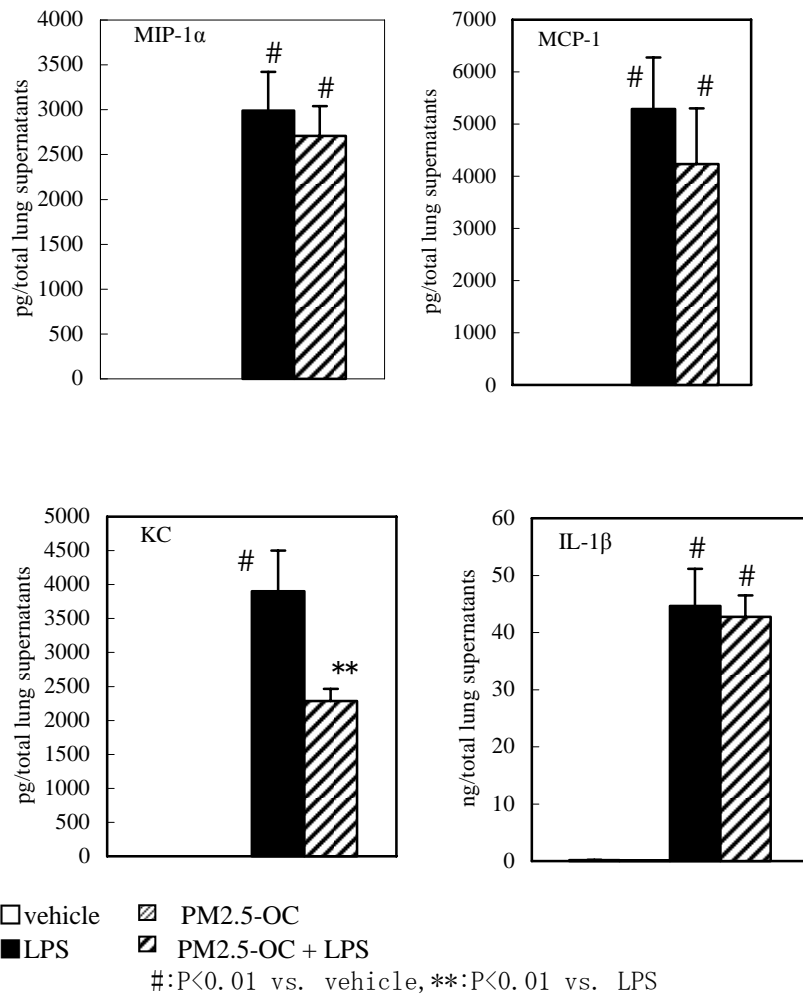
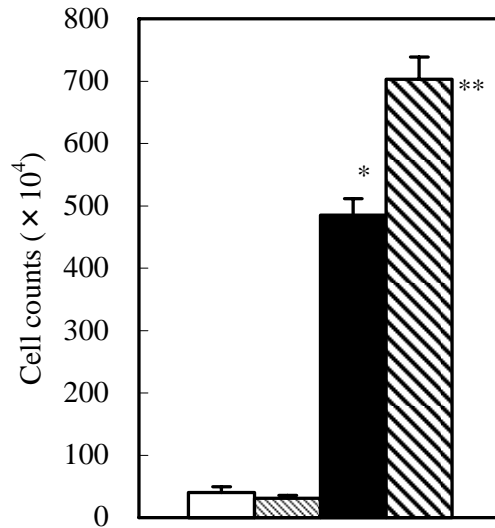


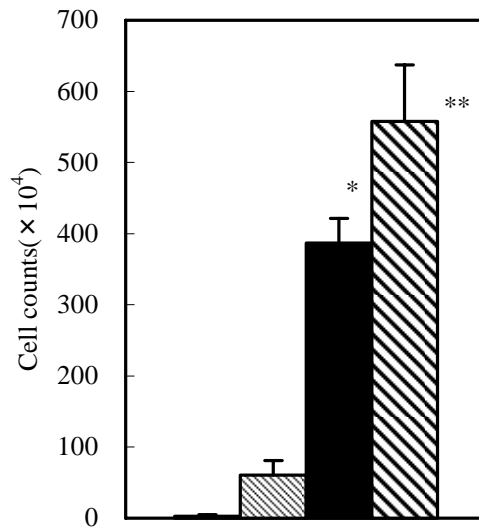
図 2. 6. 3-4 LPS による急性肺障害に対する PM_{2.5}抽出物のサイトカイン及びケモカイン産生に及ぼす影響



*; p<0.01 vs. vehicle, **; p<0.05 vs. LPS

□ vehicle ▨ washed DEP
 ■ LPS ▩ washed DEP+LPS

図 2. 6. 3-5 DEP 粒子投与による BALF 中の総細胞数の変化



*; p<0.01 vs. vehicle, **; p<0.05 vs. LPS

□ vehicle ▨ washed DEP
 ■ LPS ▩ washed DEP+LPS

図 2. 6. 3-6 DEP 粒子投与による BALF 中の好中球数の変化

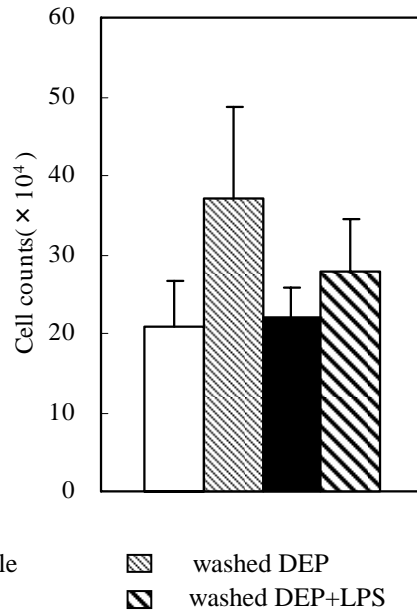


図 2. 6. 3-7 DEP 粒子投与による BALF 中のマクロファージ数の変化

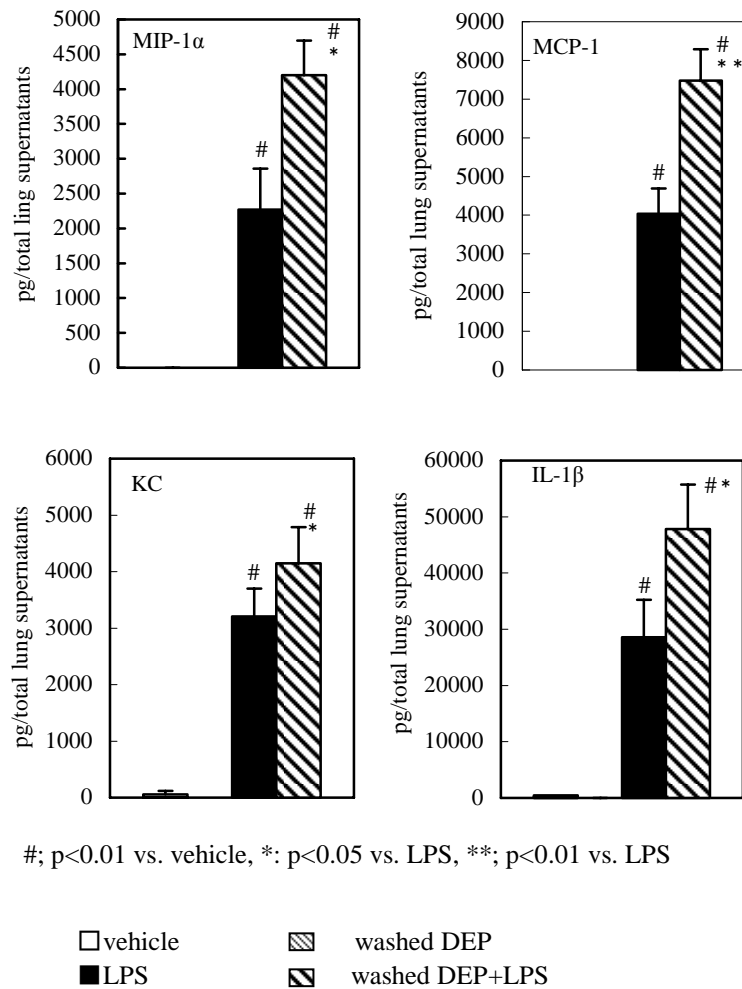


図 2. 6. 3-8 LPS 急性肺障害に対する DEP 粒子のサイトカイン及びケモカイン産生に及ぼす影響

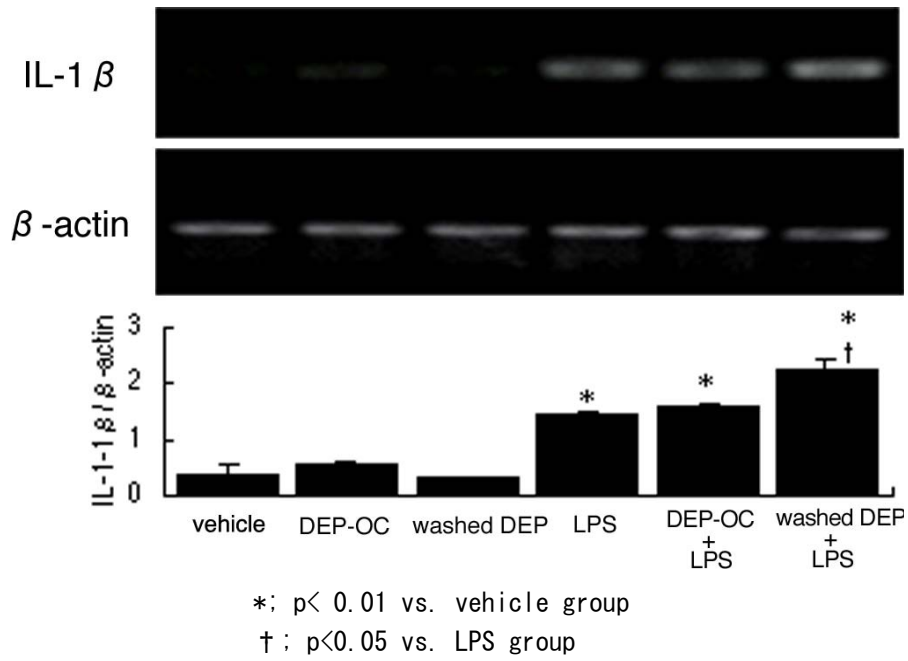


図 2.6.3-9 肺における IL-1 β の遺伝子発現

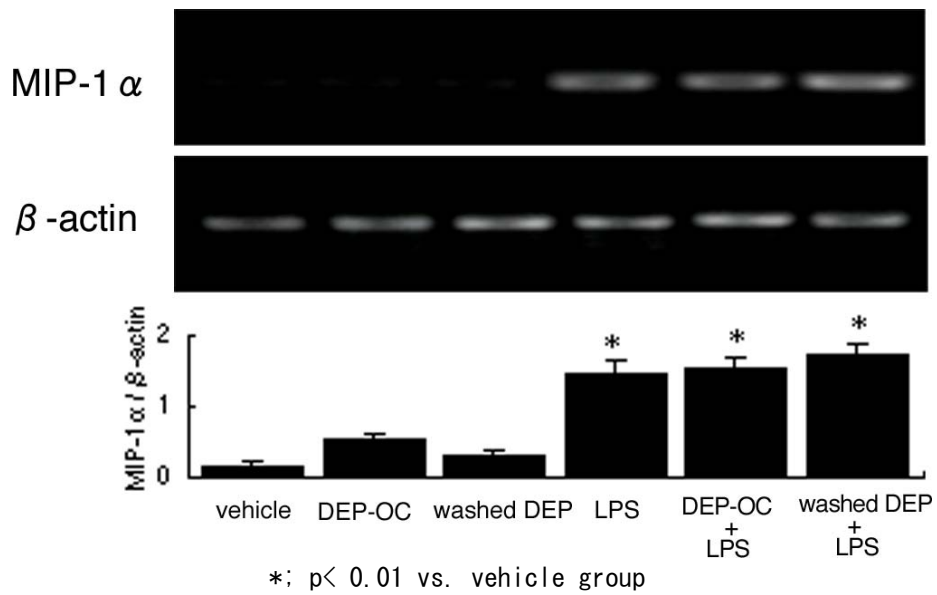


図 2.6.3-10 肺における MIP-1 α の遺伝子発現

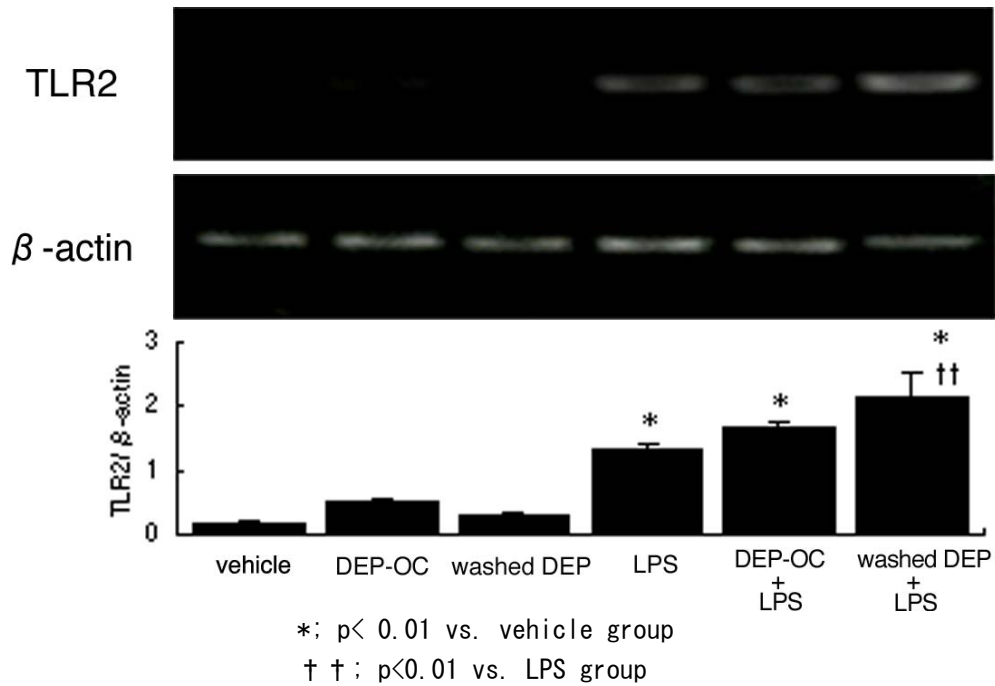


図 2.6.3-11 肺における Toll-like receptor2 の遺伝子発現

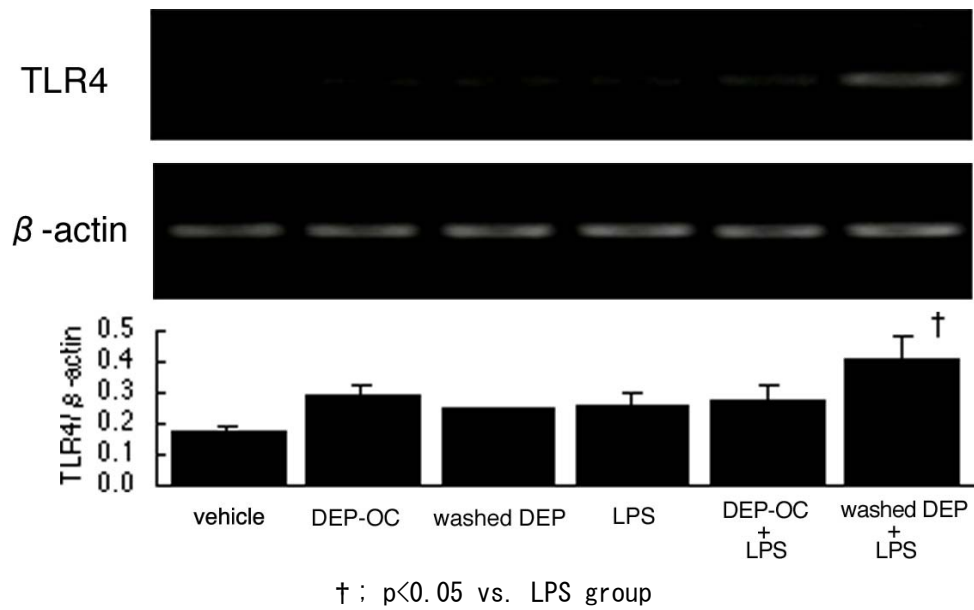
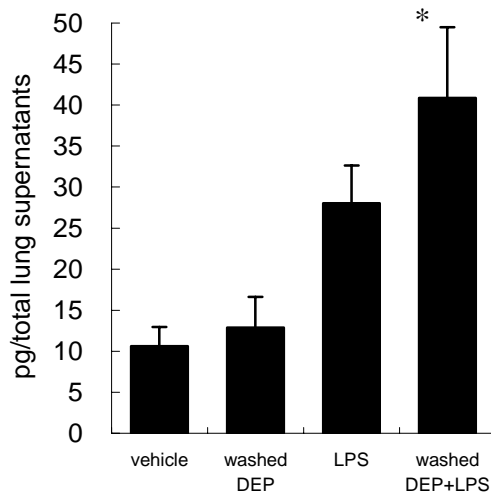
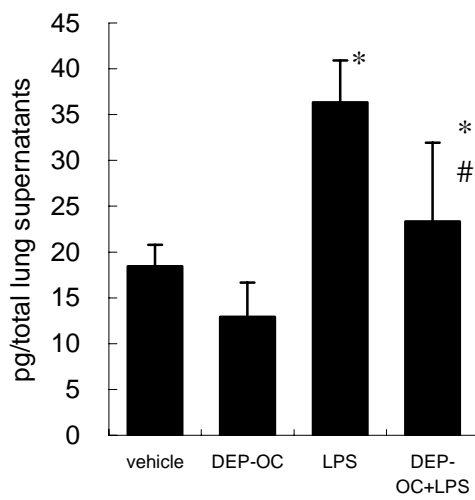


図 2.6.3-12 肺における Toll-like receptor4 の遺伝子発現



*: p<0.01 vs. vehicle

図 2.6.3-13 肺における IL-10 のタンパク発現 (1)



*: p<0.01 vs. vehicle

#: p<0.05 vs. LPS

図 2.6.3-14 肺における IL-10 のタンパク発現 (2)

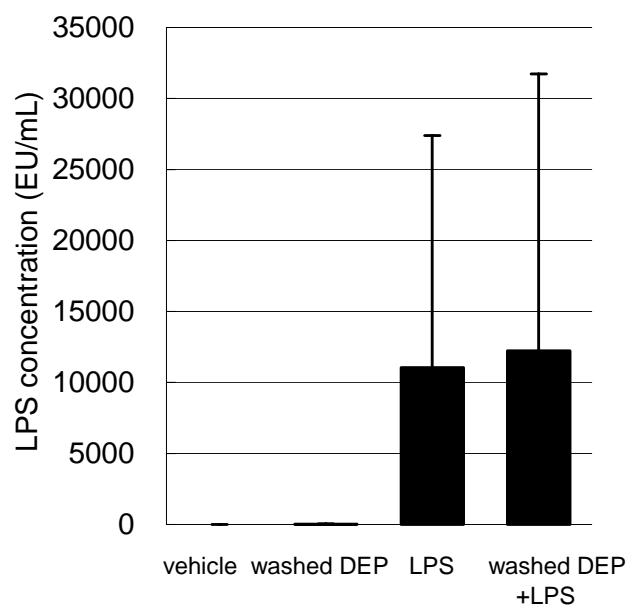
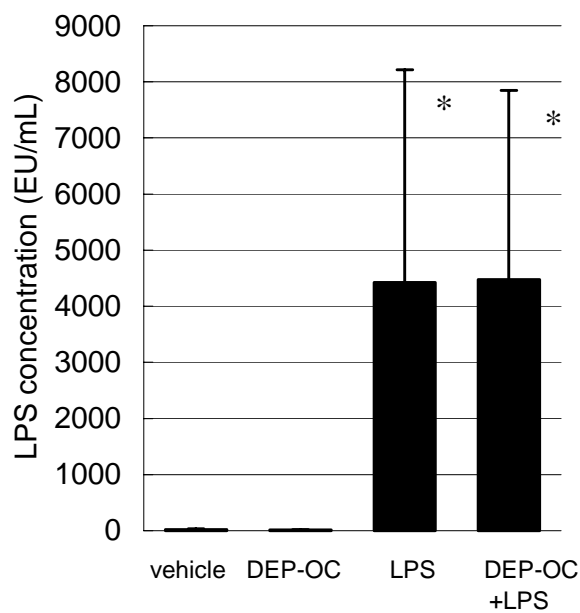
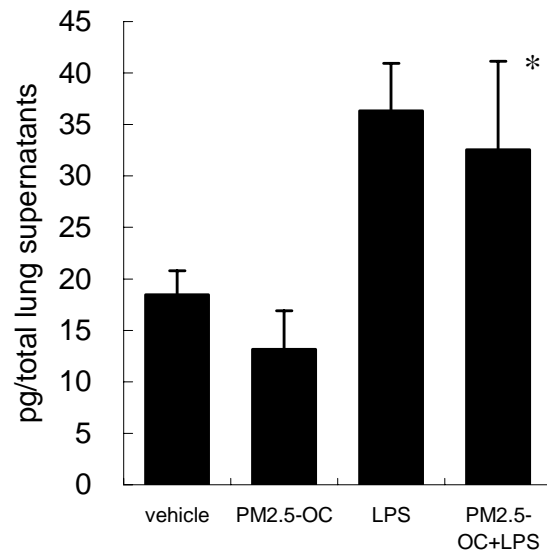


図 2. 6. 3-15 細菌毒素の血中移行 (1)



*: $p < 0.05$ vs. vehicle

図 2. 6. 3-16 細菌毒素の血中移行 (2)



*; $p < 0.01$ vs. vehicle

図 2.6.3-17 肺における IL-10 のタンパク発現 (3)