

て調べた。JCP のみの点鼻投与では効率の良い JCP 特異的免疫応答の誘導は困難であった。上気道でのリンパ節への影響としては、 1.0 mg/m^3 の濃度で CD4 陽性細胞の比率の低下がみられたが、CD4 陽性細胞数では差はみられなかった。昨年度は、ディーゼル排気ガスに含まれるガス状物質としての NO_2 の低濃度での上気道免疫系への影響について検討した。鼻部リンパ叢や頸部リンパ節(CLN)での T、B リンパ球重集団への影響はみられなかった。本年度は、ディーゼル粒子濃度として 1.0 mg/m^3 の濃度で5週間暴露し、スギ花粉抽出抗原(SBP)を点鼻投与したマウスの肺胞洗浄液と CLN でのサイトカイン、ケモカイン産生について検討した。また、DE 暴露から粒子状物質を除いたガス状物質 (Gas) 暴露の影響についても比較検討した。

B. 研究方法

1) 実験動物

3週令の BALB/c と C57BL/6J マウスを SLC より購入し、一群 8 匹で 4 週令より実験に用いた。今回の実験計画は、国立環境研究所の動物実験倫理安全委員会の承認を得ている。

2) DE 暴露と抗原投与

DE 暴露は、総排気量 2,740cc、4気筒直噴式ディーゼルエンジンを 1,500 回転/min、トルク 10Kg/m の条件で運転し、12 時間/日の間欠暴露での 5 週間暴露を行った。清浄空気暴露群、DE 暴露群、DE 暴露ガスからフィルターを通して除粒子(Gas)暴露群のそれぞれの汚染物質濃度は、表 1 のようであった。抗原としては、SBP (慈恵会医科大学遠藤朝彦先生供与) を暴露開始前に $100 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の濃度で腹腔内投与し、以後 2 週後、5 週後に $50 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の点鼻投与を行った。最終投与の翌日 (DE 暴露終了 1 日後)、エーテル麻酔下で採血、肺胞洗浄液、CLN の採取を行った。

3) サイトカイン・ケモカイン産生

肺胞洗浄液中の炎症性細胞の浸潤については、細胞数を算定後サイトスピン標本を作成し、ディフクイック (国際試薬) で染色して調べた。洗浄液中のケモカイン量は、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1、macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α 、MIP-2 (いずれも R&D Systems) について ELISA キットで測定した。Eotaxin は、murine eotaxin (Pepro Tech EC LTD.)、anti-mouse eotaxin、biotinylated anti-mouse eotaxin antibody (R&D Systems) を用いてのサンドイッチ ELISA で測定した。リンパ節細胞は、細胞数を算定後脾臓細胞より調整した抗原提示細胞を加えて SBP と共に培養し、24、48 時間後の培養上清中サイトカイン・ケモカイン量を ELISA キットを用いて測定した。IL-4、IL-5、IFN- γ は Endogen 社のものを使用した。また、72 時間培養後 MTT アッセイにより細胞増殖を測定した。

4) フローサイトメトリー分析

CLN 中のリンパ球の表面抗原の分析は、PE 標識 anti-mouse CD3e hamster IgG、PE 標識 anti-mouse CD4 rat IgG2b、FITC 標識 anti-mouse CD45R/B220 rat IgG2a、FITC 標識 anti-mouse CD8a rat IgG2a と対照抗体を用いて Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer で行った。

5) 統計処理

データは平均値±SE (n=8) で表示し、対照群と暴露群との平均値の差の検定は、F 検定と Student の t-test で行った。

C. 研究結果

1) 低濃度 DE 暴露、あるいは Gas 暴露による炎症性細胞の肺への浸潤

BALB/c マウスの肺胞洗浄液中における炎症性細胞の変動が表 2 a に C57BL/6J マウスでの変動が表 2 b に示してある。BALB/c マウスにおける洗浄液中の総細胞数は、DE 暴露群と Gas 暴露群で有意に増加していた(**P<0.01)。DE 暴露群では、マクロファージ(Mφ)、好中球(Ne)、好酸球(Eo)の増加がみられ、Gas 暴露群では、マクロファージ、好中球、リンパ球(Ly)の増加がみられた(*P<0.05; **P<0.01)。C57BL/6J マウスにおける洗浄液中の総細胞数も、DE 暴露群と Gas 暴露群で有意に増加した(**P<0.01)。DE 暴露群では、マクロファージ、好中球、好酸球の増加がみられ、Gas 暴露群では、マクロファージのみの増加であった。C57BL/6J マウスでは Gas 暴露した BALB/c マウスでみられた好中球とリンパ球の増加は認められなかった。

肺胞洗浄液中のケモカイン産生では、両系統のマウスにおいて MCP-1 と MIP-1αの産生はみられなかった。MIP-2 産生においては、C57BL/6J マウスの DE 暴露群で増加傾向がみられたが、BALB/c マウスではほとんど変動がみられなかった (図 1 a)。Eotaxin 産生では、両系統のマウスの DE 暴露群で増加傾向が示されたが、統計学的に有意な増加ではなかった (図 1 b)。

2) 低濃度 DE 暴露、あるいは Gas 暴露のリンパ節への影響

リンパ節細胞の数においては、BALB/c マウスと C57BL/6J マウスとで対照群と比べ暴露による差はみられなかった (表 3)。BALB/c マウスでは、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比率に差はみられなかった。また、CD3 陽性で T 細胞レセプターが α、β の細胞と γ、δ の細胞の比率においても有意な差はみられなかった。やや後者の比率が Gas 暴露群で低下の傾向がみられた。一方、C57BL/6J マウスでは Gas 暴露群における CD4 陽性細胞の有意な低下がみられ(*P<0.05)、CD3 陽性で T 細胞レセプターが α、β の細胞においても有意な低下が認められた。CD3 陽性で γ、δ のレセプターを保持する細胞の比率においては低下傾向がみられたが有意ではなかった。