

## B. 実験方法

### 1) 実験動物

実験には体重 414~550 g の Hartley 系雄性モルモットを用いた。モルモットは室温  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  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) の暴露

DE の暴露は、国立環境研究所の AC 系暴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  $1.0 \text{ mg/m}^3$ ) し、22 時から翌日 10 時までの 12 時間の DE 間欠暴露を 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、DEP 濃度として  $1.0 \text{ mg/m}^3$  の DE を暴露した。第 3 チャンバー (ACG-2) には、フィルターを用いて粒子を除去した DE (除粒子 DE) を暴露した。

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)、(MI.9841A Monitor Labs Inc, Germany) を用いて測定した。表 1 に空気および暴露排気のガス濃度分析結果を示した。

### 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 回に  $10 \mu\text{l}$  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 2 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。

#### (1) 実験スケジュール

モルモットを urethane ( $1.6 \text{ g/kg}$ , i.p.) 麻酔下で背位固定し、Evans blue 色素 (EB,  $30 \text{ mg/kg}$ , i.v.) の投与後 20 分に heparin 溶液 ( $600 \text{ U/kg}$ , 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)。

#### (2) 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。

### (3) 結膜内色素漏出量の測定

色素漏出量の測定は Katayama ら<sup>11)</sup>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℃で、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 (3000 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)。

### 5) 血清中 IgG<sub>1</sub> 濃度の測定

結膜内色素漏出量の測定前に麻酔下の動物の心臓穿刺により採血した。採取した血液は、3,000 rpm、30 分間で遠心分離し、血清を分取した。

血清中の抗原特異的 IgG<sub>1</sub> 濃度は EIA サンドイッチ法を用いて測定した。測定にはモルモット Total IgG<sub>1</sub> 測定キット (森永生科学研究所) を用いた。

### 6) 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)

### 7) 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、Dunnnett 法による多重検定を行った。

## C. 実験結果

### 1) アレルギー性結膜炎の症状に対するスコア

Air 群、DE の 1.0 mg/m<sup>3</sup> 群、DE の除粒子群について暴露実験を行った (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 1.0 mg/m<sup>3</sup> 群、DE の除粒子群の各群の結膜炎症状スコアは 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 0.5 から 3.2 の間を推移し、DE の 1.0 mg/m<sup>3</sup> 群の 4 週目では有意な変化を示した (図 4)。