

### 課題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 環境健康領域)

#### 研究要旨

我々はすでにディーゼル排気 (diesel exhaust: DE) 曝露により、アレルギー性結膜炎が増悪する可能性を見いだしてきた。しかし、これまではアレルギー性結膜炎を誘発する抗原として、実験系が確立している卵白アルブミン (OVA) を用いて検討を行ってきた。一方、我国における花粉症の80%以上は日本スギによるものであるといわれていることから、平成15年度に、日本スギ花粉 (JCP) を抗原として用いたアレルギー性結膜炎モデルを用いて、ディーゼル排気 (DE) の1および3 mg/m<sup>3</sup> (DEP濃度として) について検討を行った。その結果、JCP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群と比較してDEの1 mg/m<sup>3</sup>群および3 mg/m<sup>3</sup>群で色素漏出量の有意差な増強が認められた。そこで、本年度はDEの濃度依存性を確認する目的で、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup> (DEP濃度として) について日本スギ花粉で誘発したアレルギー性結膜炎を増悪させるかどうかをモルモットを用いて検討した。

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1 mg/m<sup>3</sup>のDE曝露群の2群を設定した。アレルギー性結膜炎は、日本スギ花粉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。

Air群、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup>群について曝露実験を行った (1群6匹)。炎症スコアを検討した結果、アレルギー性結膜炎の症状に対するスコアならびに結膜内色素漏出量の検討においても、Air群に比較してDEの0.3 mg/m<sup>3</sup>群で増強傾向がみられたが、統計的に有意な変化ではなかった。以上、スギ花粉感作により誘発したアレルギー性結膜炎に対して、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup>曝露群では有意な影響がみられず、DEの1 mg/m<sup>3</sup>曝露群からアレルギー性結膜炎を増悪させることが考えられる。

#### 背景・目的

今日、花粉症やアトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー性疾患の増加が、大きな社会問題となっている。この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<sup>1)</sup>。

我々はこれまでに、アレルギー性結膜炎に及ぼすディーゼル排気 (DE) の影響を検討してきた。粒子濃度0.05、0.1、0.3および1.0 mg/m<sup>3</sup>のDEの曝露を35日間行いその影響を検討した結果、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、卵白アルブミン (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。

これまでは、実験系が確立している卵白アルブミン (OVA) を抗原として用いたアレルギー性結膜炎モデルを用いて検討を行ってきた。しかし、我国における花粉症の80%以上は、日本スギによるものであるといわれている<sup>2)</sup>。

そこで、平成15年度に、日本スギ花粉 (JCP) を抗原として用いたアレルギー性結膜炎モデルを用いて、ディーゼル排気 (DE) の1および3 mg/m<sup>3</sup> (DEP濃度として) について検討を行った。その結果、JCP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群と比較してDEの1 mg/m<sup>3</sup>群および3 mg/m<sup>3</sup>群で色素漏出量の有意差な増強が認められた。したがって、本年度はDEの濃度依存性を確認する目的で、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup> (DEP濃度として) について日本スギ花粉で誘発したアレルギー性結膜炎を増悪させるかどうかをモルモットを用いて検討した。

## 材料と方法

### 1. 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  $25 \pm 1$ 、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、清浄空気曝露で生理食塩液および JCP 点眼の 2 群、DE の  $0.3 \text{ mg/m}^3$  曝露で生理食塩液および JCP 点眼の 2 群の計 4 群、合計 24 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  $2,740 \text{ cc}$ 、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  $1,500 \text{ rpm}$ 、トルク  $10 \text{ kg/m}$ ）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 を清浄空気希釈（DE 中の DEP 濃度として  $0.3 \text{ mg/m}^3$ ）し、22 時から翌日 10 時までの 12 時間の DE 間欠曝露を 49 日間行った。

第 1 チャンバーには、清浄空気を供給した。第 2 チャンバーには、DEP 濃度として  $0.3 \text{ mg/m}^3$  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、日本スギ花粉（JCP; 神奈川県津久井にて採取）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。

予備実験の結果、JCP 単独の点眼感作のみでは、十分なアレルギー性結膜炎症状が惹起されないため、日本スギ花粉の粗抽出タンパク（Cedar Pollen Extract-Cj, LSL より購入）を 2 回皮下投与感作した。動物 1 匹に対して、スギ花粉粗抽出タンパク  $30 \mu\text{g}$ 、水酸化アルミニウム  $10 \text{ mg}$ 、不活化百日咳菌  $10^{10}$  個を生理食塩液に懸濁して  $0.5 \text{ mL}$  皮下投与した。皮下投与は図 1 に示したように、感作 1 と感作 2 の 2 回行った。

日本スギ花粉は動物の片眼あたり  $3 \text{ mg}$  を生理食塩液に懸濁して  $25 \mu\text{L}$  の容量を点眼した。点眼は感作 2 ~ 感作 8 まで 1 週間間隔で計 7 回、動物の両眼に行った（図 1）。

2 回目（初回感作から 1 週間後）から 7 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 ( $1.6 \text{ g/kg}$ , 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）。

### 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、 $100 \text{ mL}$  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、 $60^\circ\text{C}$  の温浴上で  $0.05 \text{ M}$  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<sup>3)</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、細切り、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℃、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 6 匹とし、統計学的処理は、Dunnett 法による多重検定を行った。

## 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 0.3 mg/m<sup>3</sup> 群について曝露実験を行った (1 群 6 匹)。JCP 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 0.3 mg/m<sup>3</sup> 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。6 週間の観察期間において 3 週目までのスコアはそれぞれ 0 であったが、4 週目から 6 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、JCP で感作した動物におけるスコアは、Air 群、DE の 0.3 mg/m<sup>3</sup> 群の各群とも 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 6 週目においては Air 群で 0.7±0.2 (n=6) ~ 3.8±0.7 (n=6)、DE の 0.3 mg/m<sup>3</sup> 群で 1.2±0.3 (n=6) ~ 4.3±0.9 (n=6) であり、Air 群に比較して DE の 0.3 mg/m<sup>3</sup> 群では増加傾向がみられたが有意な変化ではなかった (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 5.5±1.2 ng/mg tissue (n=6)、DE の 0.3 mg/m<sup>3</sup> 群で 7.2±1.0 ng/mg tissue (n=6) であり、各群の間に有意な差がみられなかった (図 6)。

一方、JCP 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 13.3±2.4 ng/mg tissue (n=6)、DE の 0.3 mg/m<sup>3</sup> 群で 15.8±4.2 ng/mg tissue (n=5) であり、Air 群と比較して DE の 0.3 mg/m<sup>3</sup> 群で色素漏出量の増加傾向がみられたが、有意な差は認めら

れなかった(図7)。

## 考察

これまで我々は卵白アルブミン(OVA)感作動物を用いて、アレルギー性結膜炎がディーゼル排気により増悪されることを示唆してきた。しかし、実際の花粉症症状で抗原となるのは大気中に浮遊する花粉であり、我国における花粉症の80%以上は、日本スギによるものであるといわれている<sup>2)</sup>。したがって、実際に日本スギ花粉を抗原とした実験的アレルギー性結膜炎モデルを用いて、DE曝露が及ぼす影響を検討することは実際の疫学調査との関連を考える上で重要になると考える。そこで、昨年度の研究において、日本スギ花粉(JCP)を抗原として用いたアレルギー性結膜炎モデルの作製を確立し、このモデルを用いて、ディーゼル排気(DE)の1および3 mg/m<sup>3</sup>(DE P濃度として)について検討を行った結果、JCP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群と比較してDEの1 mg/m<sup>3</sup>群および3 mg/m<sup>3</sup>群で色素漏出量の有意な増強が認められた。

したがって、本年度はDEの濃度依存性をさらに確認する目的で、DEのより低濃度である0.3 mg/m<sup>3</sup>(DE P濃度として)について、日本スギ花粉で誘発したアレルギー性結膜炎を増悪させるかどうかを検討した。

DEの曝露は0.3 mg/m<sup>3</sup>の濃度で行い、Air曝露の群を入れて、計4群とした。アレルギー性結膜炎の症状に対するスコアの検討で、JCPの対照である生理食塩液を点眼した動物においては、Air群、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup>群の各群で3週目までのスコアはそれぞれ0であったが、感作の4週目から6週目では0.2から0.5のスコアを推移したが、有意な変化ではなかった(図4)。一方、スギ花粉で感作した動物におけるスコアは、各群とも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6週目においてはAir群に比較してDEの0.3 mg/m<sup>3</sup>群では増加傾向がみられたが有意な変化ではなかった(図5)。したがって、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup>曝露では、昨年実施したDEの1および3 mg/m<sup>3</sup>の曝露とは異なりスギ花粉感作により誘発したアレルギー性結膜炎を悪化させることはなかった。

アレルギー性結膜炎時の血管透過性の亢進を客観的に評価するために、結膜内色素漏出量を指標として検討した結果、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、各群の間で有意な違いがみられなかった。一方、スギ花粉で感作した動物における結膜内色素漏出量は、Air群に比較してDEの0.3 mg/m<sup>3</sup>群で色素漏出量の増強傾向がみられたが、統計的に有意な変化ではなかった。したがって、血管透過性の検討においても結膜炎症状のスコアと同様に、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup>曝露では、昨年実施したDEの1および3 mg/m<sup>3</sup>の曝露とは異なりスギ花粉感作により誘発したアレルギー性結膜炎を悪化させることはなかった。

## 結論

スギ花粉感作により誘発したアレルギー性結膜炎に対して、DEの0.3 mg/m<sup>3</sup>曝露群では有意な影響がみられず、DEの1 mg/m<sup>3</sup>曝露群からアレルギー性結膜炎を増悪させることが示唆された。

## 参考文献

- 1) 小林隆弘：大気汚染とアレルギー．呼吸 14, 342-352 (1995)
- 2) 斉藤洋三：スギ花粉症と大気汚染．治療 74, 73-75 (1992)
- 3) Takada, M., Yamada, Y., Nakahara, H., Sugimoto, Y., Izushi, K. and Kamei, C. : Experimental allergic conjunctivitis in guinea pigs induced by Japanese cedar pollen. Biol. Pharm. Bull. 23, 566-569 (2000)

4 ) 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)



## Determination of EB in conjunctiva

### Conjunctiva

Add 1M KOH 2 ml

37 °C, 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)
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
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

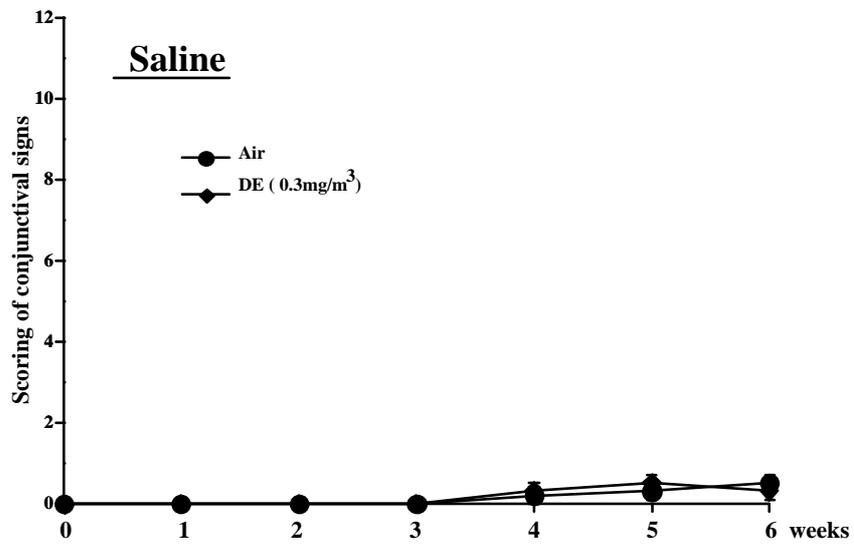


図4 非感作動物における結膜炎症状のスコア

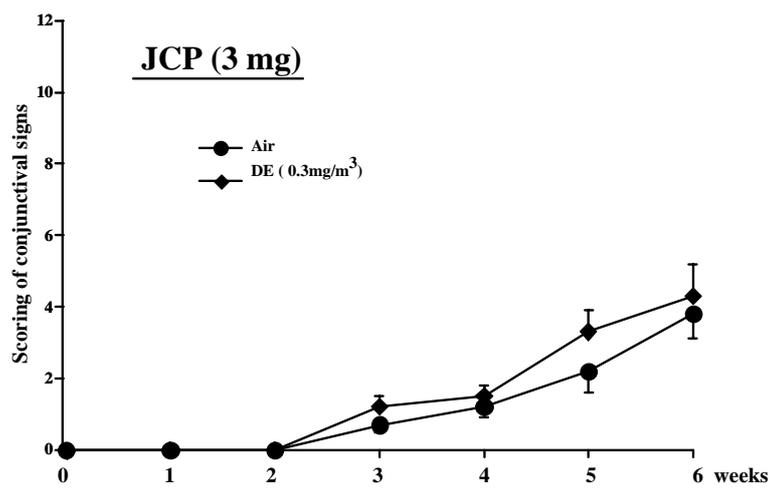


図5 JCP感作動物における結膜炎症状のスコア

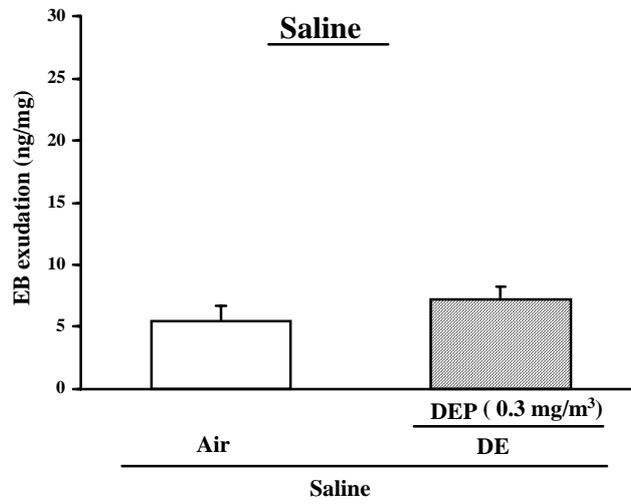


図6 非感作動物の結膜血管透過性に及ぼすDE曝露の影響

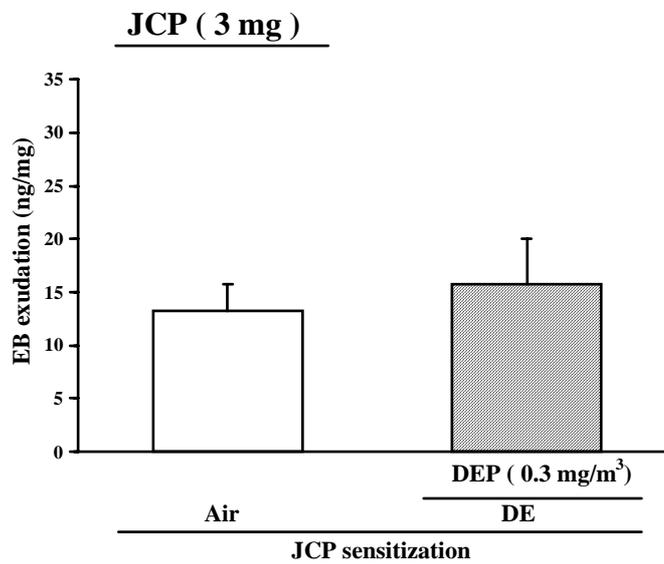


図7 JCP誘発アレルギー性結膜炎の血管透過性に及ぼすDE曝露の影響