大気汚染による好中球機能障害

— ディーゼル排気ガス吸入ラットの好中球遊走能と貪食能の低下 —

加藤雅子・高田雅史・中山道弘・梅田正法^{*1)}、森 憲二^{*2)}

Disturbance of neutrophil functions by air pollution : Impairment of chemotaxis and phagocytosis of neutrophils from the diesel engine exhaust inhaled rats

We attempted to investigate the effect of air pollution on functions of neutrophils collected from Fisher rats exposed to diesel engine exhaust. Rats were exposed either to a high concentration of diesel exhaust (H-group) or to the diesel exhaust from which particles deprived through filters (non-dust ; ND-group) for six months. The concentration of NO₂ gas and diesel exhaust particles was 2.6 ppm and 7.8 mg/m³ in H-group, and 2.1 ppm and 0.02 mg/m³ in ND-group, respectively. Phagocytic activity of the neutrophils from H-group was depressed. In addition, phagocytic activity of the neutrophils was further depressed in the ND-group. Neutrophil chemotaxis under agarose toward FMLP was decreased in either H-group or in ND-group, as compared with that of the control group.

These findings suggest that the inhalation of NO₂ may impair the peripheral blood neutrophil functions such as phagocytosis and chemotaxis. The preservation of the neutrophil phagocytic activity in H-group as compared with ND-group seems to be partly due to the modulation of the stimulated alveolar macrophage function by diesel particles ingestion, which may finally potentiate the neutrophil function. And the toxic gas elements of the inhaled exhaust may be easily absorbed into blood by reaching the higher concentration of gas to pulmonary alveolar regions, which leads to the deterioration of neutrophil phagocytic activity in ND-group.

Rec. 8/28/1995, Acc. 9/27/1995, pp 451~454

Masako Katoh・Masafumi Takada・Michihiro Nakayama・
Masanori Umeda^{*1)}, Kenji Mori^{*2)}

**key words : air pollution, diesel engine exhaust,
neutrophils, phagocytosis, chemotaxis**

近年、ディーゼル車から排出されるディーゼル排気ガスが増加しており、都市や幹線道路沿いの地域での大気汚染の重要な原因となっている。大気汚染地域で気管支喘息の発症頻度が高い¹⁾ことはよく知られているが、最近では呼吸器系の発癌との関連も取りざたされている²⁾。大気汚染が肺胞マクロファージの貪食活性や酸素消費量を低下させる³⁾などの報告はあっても、末梢血好中球の

機能に与える影響を検討したものは、コークス工場労働者群の好中球 NBT 還元能が低下していたとの報告⁴⁾が 1 件あるのみで少ない。

大気汚染が生体の易感染性にどう影響するかを知る目的で、ディーゼル排気ガスを 6 カ月間吸入暴露させたラット群で末梢血好中球の遊走能と貪食能を対照群と比較検討したので報告する。

材料と方法

東京都立衛生研究所にて 15 匹の 5 週齢のフィッシャー系ラット (F 344/DuCrj) を 3 群にわけ、ディーゼルエンジンから直接排出される排気ガス (H 群)、または、このなかから塵、ディーゼ

^{*1)} Department of First and ^{*2)} Fourth Internal Medicine, Toho University ^{*1)} 東邦大学医学部第一内科学教室, ^{*2)} 同 第四内科学教室
Offprint requests to : Masako Katoh, Department of First Internal Medicine, Toho University, 6-11-1, Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo 143, Japan TEL : 03-3762-4151, FAX : 03-3763-8298

表 1 暴露条件

1. 各群の吸入排気成分の濃度		
	粒子濃度(mg/m ³)	NO ₂ 濃度(ppm)
高濃度群(H)	7.81±1.5	2.6±0.6
除塵群(ND)	0.02±0.02	2.1±0.7
対照群(C)	0.01±0.01	0.02±0.01
2. 発生源		
ヤンマーディーゼルエンジン NS40C-G(E) 型 (特殊渦流形予熱燃焼室式, 換気量 269 cc, 回転速度 2,400 rpm)		
3. 暴露期間		
6 カ月(7hr/day, 5 days/w)		

表 2 Chemotactic activity of neutrophils from diesel exhaust inhalation rats

Neutrophils	Migration distance(mm)	
	Chemotaxis to FMLP	Random mobility
Control group rats	0.37±0.17(8)	0.16±0.05(8)
H-, and ND-groups	0.19±0.07(19)**	0.13±0.04(19)
H-group rats	0.14±0.03(5)**	0.13±0.05(5)
ND-group rats	0.22±0.07(14)*	0.14±0.04(14)

Neutrophil motility was measured by the agarose plate method.

The number in parentheses expressed the number of determinations.

Statistical significance between neutrophils from control rats and from each diesel exhaust inhaled group rats was determined by Student's *t* test.

**P<0.01. *P<0.02

The positive control of human neutrophils was as the following: Chemotaxis to FMLP: 1.78±0.07(6) and random mobility: 0.58±0.04(18).

Neutrophils from control and diesel exhaust inhaled rats did not express chemotactic responses toward either ZAS or BCF.

ル粒子をフィルターで除いた排気ガス(除塵・ND群)を6カ月間(5日間/週, 7時間/日)吸入暴露させ, 室内気を吸入させた対照群(C群)との間で, 末梢血好中球機能を比較した。代表的な大気汚染物質である NO₂ とディーゼル粒子の各吸入気中の濃度を表1に示した。

1匹当たり5~6mlの静脈血をヘパリン加採血し, 比重遠沈法で好中球を分離した⁵⁾。好中球貪食能はイースト粒子法⁶⁾を用い, イースト対好中球比率は8:1とし, 10%ラット血清をオプソニンとして使用した。遊走能はアガロース法⁷⁾を用い, 遊

走因子は活性化補体であるザイモザン活性化血清(ZAS), 大腸菌培養濾液(BCF), および 10⁻⁷M, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)を使用した。

成績

ラットの好中球は, 同時期に行ったヒトの好中球とくらべると ZAS, BCF に対しては遊走反応を示さず, well 内に好中球集団がとどまり, chemotaxis と random mobility との間に差がなかった。また, FMLP に対しては対照群ラットの好中球ではヒトとくらべ, ごく弱い chemotaxis: 0.37±0.17 mm(mean±SD)が観察されたが, 排気ガス吸入群であるH群と ND 群を合わせると, chemotaxis は 0.19±0.07 mm と減弱していた(P<0.01)(表2)。

つぎに, 好中球貪食活性であるが, 1回毎の各実験で対照群ラットの示した貪食率を100%とすると, H群, ND 群の両群を合わせると対照の 73.0±9.9%(P<0.001)の貪食活性を示しており, 排気ガス吸入群では貪食活性は明らかに低下していた。また, 各排気ガス暴露ラット間での比較では, H群ラットでは対照の 79.0±11%(P<0.01)を, また, ND 群ラットでは対照の 68.6±5.6%(P<0.001)の貪食活性を示していた。

除塵された排気ガスを吸入した ND 群での貪食能は, 除塵されないガスを吸入したH群よりも強く障害されており, 各実験でのH群の貪食率を100%とすると ND 群では 87.8±9.1%(P<0.05)に低下していた(図1)。

考察

今回の吸入排気ガスの NO₂ 濃度は, 排気ガス汚染地域での大気中の NO₂ 濃度である 20 から 40 ppb¹⁾ よりは 50~100 倍ほど高濃度であったが, その6カ月間の吸入によって, ラットの肺泡マクロファージ^{2,3)}だけでなく, 末梢血好中球の貪食活性と FMLP に対する遊走活性がいずれも低下しており, これらの好中球機能が排気ガス, 特に NO₂ の吸入によって障害されることが今回はじめて明らかとなった。

図1 Phagocytosis of neutrophils from diesel inhalation rats

The phagocytic activity was expressed as the percent of control rat neutrophils in 図1a, and the percent of H-group rat neutrophils in 図1b. Values are expressed as mean $\pm$ SD of five experiments.

C: Control rat group. ND: Non-dust high-concentration diesel exhaust inhaled rat group. H: High-concentration diesel exhaust with dust inhaled rat group.

Phagocytic activity of neutrophils from control rats in five experiments was 306 ± 47 yeast particles/100 neutrophils.

Statistical significance was determined by Student's *t* test.

P*<0.05. *P*<0.01. ****P*<0.001

また、ラットに対してもっとも強力な遊走因子活性を示した FMLP に対して対照ラット好中球は、ヒト好中球の random mobility の約6割程度の弱い chemotaxis しか示さず、また、ZAS や BCF に対する chemotaxis はラットでは観察されなかったことより、種による遊走反応性の違い

が推測された。

長期間の NO_2 吸入が好中球機能を障害することは、コークス工場の労働者たちの末梢血好中球でラテックス刺激 NBT 還元能が低下していたと1992年に報告⁴⁾されたものが1件あるが、今回の成績は、ディーゼルエンジンの排気ガス中の NO_2 を長期吸入することにより、末梢血好中球の貪食能や遊走能などの機能を障害し、ひいては生体の易感染性に関して悪影響を及ぼす可能性を支持する結果となった。

また、同じディーゼル排気ガス吸入ラット群でも、はじめの予想に反して、除塵された群のほうが除塵されなかった群よりも好中球貪食能がより強く障害されていたことに関しては、除塵された排気を吸入したラットでは、高濃度のガス状成分が肺泡毛細管レベルにまで到達し、血液中により多く吸収されて、toxic な作用で白血球の機能をより強く障害することが考えられる。

一方、除塵されなかった排気を吸入したラットでは、ディーゼル粉塵粒子が気道に捕捉され高濃度のガス状成分が肺泡レベルにまで到達しにくいことのほかに、おもに肺泡マクロファージが粉塵粒子を多量に貪食する^{2,3,8)}ため、肺泡マクロファージの種々の機能を修飾して^{2,3,8)}、最終的には NO_2 による好中球機能障害を緩和する方向へ働く可能性もうかがえる。

対象は異なるが、マウスで墨粒子投与により網内系マクロファージの機能をブロックしておく、異系骨髄移植の際に必発である拒絶反応が抑えられること⁹⁾が知られている。この場合は宿主の網内系食細胞による tumor necrosis factor- α (TNF) の産生や NK 細胞の活性化が、網内系ブロックにより抑制されるため⁹⁾と考えられているが、 NO_2 による好中球機能障害の際にも網内系ブロックが、何らかの機序を介して障害を抑える方向に働いている可能性も否定できない。

ディーゼル排気ガス吸入が好中球にさまざまな影響を与える可能性がいままでに示されている。たとえば、好中球に対して強力な遊走因子活性をもつロイコトリエン $\text{B}_4^{10)}$ (LTB_4) が NO_2 刺激により肺泡マクロファージから産生、放出され

ること^{2,11)}や、また、肺胞マクロファージがディーゼル粒子を貪食すると、マクロファージからLTB₄やTNFなどの炎症起因为物質や炎症性サイトカインが放出されること²⁾などから、好中球が肺胞内に集積し、そこでTNFなどにより粘着能が亢進し¹²⁾、その場にとどまり、異物粒子を排除する一方、炎症反応を増幅させうることが考えられる。

吸入されたディーゼル粉塵粒子は、肺胞マクロファージの能力を超えて取り込まれるとマクロファージが崩壊し肺胞内で再放出され、別のマクロファージによる再貪食が繰り返される^{2,8)}。こうした粒子の肺胞内での蓄積のほかに、粒子貪食マクロファージが所属リンパ節へ遊走したり、気道纖毛上皮運動により消化管内へ落下し吸収されるなど、ディーゼル粒子はリンパ流や血流内に侵入、移動する^{2,8)}。微粒子は血清と反応すると補体が活性化され、好中球遊走因子活性が生ずる²⁾ことは古くから知られている。血流中で遊走因子と好中球が接触すれば粘着能が亢進し遊走能はdeactivationがかかり抑えられる⁷⁾。

NO₂の直接的でtoxicな作用のほかに、このようなさまざまな機序を介してディーゼル排気ガス吸入により末梢血好中球の貪食能や遊走能が修飾されることが考えられる。ほかにも炭坑由来の塵肺症例で、肺胞マクロファージのTNFの増加だけでなく、末梢血中の単球でも同様にTNFの産生が亢進している^{2,13)}ことが報告されており、排気ガス吸入が肺局所だけではなく、末梢血液中の遊離細胞にも影響を及ぼしうることが示されている。

フィッシャー系ラットはディーゼル排気ガス吸入を約2年間続行する間に、発癌率が高くなり対照群ラットとくらべて死亡しやすくなるが、これらラットが自然に感染を起こして死亡するということは確認されていない。ここでディーゼル排気ガス負荷ラット群に、さらに菌を負荷して感染実験を行えば、易感染性の程度を対照群と比較することができるものと思われる。さらに暴露期間を

延長しての検討が必要と思われる。

なお、本研究の一部は東京都の委託研究(平成5年度)の一部によるものである。

文 献

- 1) 嵯峨井 勝：ディーゼル排気粒子(DEP)による喘息様病態の発症に関する実験的研究。大気汚染学会誌 30 : 81-93, 1995.
- 2) Hext, P.M. : Current perspectives on particulate induced pulmonary tumours. Hum. Exp. Toxicol. 13 : 700-715, 1994.
- 3) Romert, L., Bernson, V., Pettersson, B. : Effects of air pollutants on the oxidative metabolism and phagocytic capacity of pulmonary alveolar macrophages. J. Toxicol. Environm. Health 12 : 417-427, 1983.
- 4) Misiewicz, A., Trzcionka-Bera, D., Stoch, K. : Granulocyte metabolism in workers at a coke-processing plant. Polski Tygodnik Lekarski 47 : 129-130, 1992.
- 5) 津田道雄, 大久保朋一, 田村まり子：ラット血液中多形核白血球の分離。生体防御 7 : 150-152, 1990.
- 6) Katoh, M., Shirai, T., Shikoshi, K., Ishii, M., Saito, M., Kitagawa, S. : Neutrophil kinetics shortly after initial administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor : Neutrophil alkaline phosphatase activity as an endogenous marker. Eur. J. Hematol. 49 : 19-24, 1992.
- 7) 加藤雅子：ヒト好中球遊走能の deactivation. 東邦医会誌 28 : 106-117, 1981.
- 8) 加藤温中, 京野洋子, 桑原紀之：ディーゼル排気長期吸入後のラット肺の電顕観察：非腫瘍性病変について。日胸疾会誌 30 : 238-247, 1992.
- 9) 森 和博, 門脇信悦, 弦巻葉子, 杉本健吉：宿主細網内皮系ブロックによる新しい異系骨髓移植法。最新医学 49 : 475-483, 1994.
- 10) 加藤雅子, 白井達男, 梅田正法, 山口了三, 金子晴生, 木谷信行：ヒト末梢血単球遊走能に及ぼすロイコトリエン B₄ の作用。臨床血液 26 : 349-356, 1985.
- 11) Robison, T.W., Duncan, D.P., Forman, H.J. : Chemoattractant and leukotriene B₄ production from rat alveolar macrophages exposed to nitrogen dioxide. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3 : 21-26, 1990.
- 12) Salyer, J.L., Bohnsack, J.F., Knape, W.A., Shigeoka, A.O., Ashwood, E.R., Hill, H.R. : Mechanisms of tumor necrosis factor- α : Alteration of PMN adhesion and migration. Am. J. Pathol. 136 : 831-841, 1990.
- 13) Borm, P.J.A., Meijers, J.M.M., Swaen, G.M.H. : Molecular epidemiology of coal worker's pneumoconiosis : Application to risk assessment of monokine generation by mineral dusts. Exp. Lung Res. 16 : 57-71, 1990.