ディーゼル排気微粒子はアレルゲンによる好酸球性 気道炎症とサイトカイン発現を修飾する

高野裕久*

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice

Epidemiologic investigations and experimental studies on the nose suggest that diesel exhaust particles (DEP) may be implicated in the increasing severity and prevalence of allergic diseases. However, there is no experimental evidence for the relation of DEP to allergic asthma. The present study investigated the effects of DEP inoculated intratracheally on antigen-induced airway inflammation, hyperresponsiveness, local expression of cytokine proteins and antigen-specific immunoglobulin production in mice. DEP aggravated ovalbumin-induced airway inflammation characterized by infiltration of eosinophils and lymphocytes, airway hyperresponsiveness to acetylcholine, and an increase in goblet cells in bronchial epithelium. DEP with antigen markedly increased interleukin (IL)-5 protein levels in lung tissue and bronchoalveolar lavage supernatants compared to either antigen or DEP alone. The combination of DEP and antigen induced significant increases in local expression of IL-4, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and IL-2. In addition, DEP exhibited adjuvant activity for the antigen-specific production of IgG₁. These results provide experimental evidence that DEP can enhance the manifestations of allergic asthma. The enhancement may be mediated mainly by the increased local expression of IL-5, and also by the modulated expression of IL-4, GM-CSF and IL-2.

Rec. 11/9/1998, pp 9~18

Hirohisa Takano*

key words : diesel exhaust particles (DEP), airway inflammation, allergic asthma, IL-5, eosinophils

研究の背景

近年、アトピー性皮膚炎、鼻アレルギー(花粉症)、気管支喘息などのアレルギーに関連する炎症性疾患が都市部を中心に世界的に増加しつつある^{1~8)}。これらの疾患の増加要因としては、居住環

境の変化(居住空間の密閉化によるアレルゲンの増加、化学物質の使用など)、社会衛生環境の変化(結核や細菌感染症、寄生虫疾患の減少など)、食環境の変化(食生活の欧米化と多様化など)をはじめとする環境因子の変化が重要と考えられている。環境因子のなかでも、大気環境の変化—大気汚染—、特に自動車由来のガス状あるいは浮遊粒子状汚染物質の増加とアレルギー性気道炎症の有病率や重症度の増悪の密接な関連を示唆する疫学調査もいくつか報告されている^{9~14)}。たとえば、スギ花粉症の発生率は花粉の飛散数よりもむしろそ

* Research Team for Health Effects of Air Pollutants, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki (Present address: First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine) 国立環境研究所地域環境研究グループ(現: 京都府立医科大学第一内科学教室)

Offprint requests to: Hirohisa Takano, First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Hirokojiagaru Kawaramachidori, Kamigyo-ku, Kyoto, 602-0841 Japan

の地域の交通量と密接に関連するという。

一方、ディーゼルエンジン車は経済効率の良さゆえに国内保有台数は増加し、ガソリンエンジン車に比較しはるかに大量の二酸化窒素と粒子状物質を排出するため、ディーゼル排気微粒子(DEP)は都市部の浮遊粒子状物質の主たる部分を占めるに至っている。DEPの呼吸器系への健康影響に関しては、発癌を中心に多くの実験的検討が進められてきた^{15~20)}。しかし、DEPの点鼻あるいは腹腔内投与がアレルギー特異的IgE抗体産生を増加することなど、DEPと鼻アレルギーの関連についてはいくつかの実験的検討があるものの^{21~23)}、DEPと気管支喘息の関係を示唆する実験的な裏づけはほとんど存在しなかった。

気管支喘息は好酸球性気道炎症を本態とし、気道過敏性及粘液産生の亢進などにより特徴づけられ、リンパ球とその産生物質であるサイトカインが病態形成に重要な役割を演じている。特に、T helper (Th) 2リンパ球が産生すると考えられているIL-5は好酸球の増殖、遊走、活性化、生存延長などの作用をもち、気管支喘息の発症に関わる中心的なメディエータとして注目を集めている^{24~27)}。

筆者らは、「DEPがアレルギー性気管支喘息の発現を修飾しうるか否かを実験的に検討し、さらに、そのメカニズムを明らかにする」ことを目的とし、DEPがアレルギーに関連する好酸球性気道炎症と局所のサイトカイン発現に及ぼす効果について検討を加えた。本稿では、第4回日本炎症学会奨励賞の受賞論文²⁸⁾の研究内容と、その後の研究の進展について紹介する。

DEP

DEPは排気量2,740 mlのいすゞ社製ディーゼルエンジンより採取した。DEPは、炭素成分をcoreとし、金属成分、イオン成分、芳香族炭化水素など非常に多くの物質を含む(図1)。なかでも、ベンゾピレンやニトロアレーンといった変異原性の強い多環芳香族炭化水素や種々のキノン系物質、フェノールやフタル酸、そしてダイオキシシ

図1 Diesel exhaust particles (DEP)の組成と推定されるフリーラジカル生成機構

トクロームC還元法や電子スピン共鳴法で検討すると、DEPは持続的にスーパーオキシドとヒドロキシルラジカルを生成する²⁹⁾。

スーパーオキシドは不均化により過酸化水素となり、DEP粒子は鉄を含むため、フェントン反応によるヒドロキシルラジカルの生成が推定されている。また、DEP粒子中に含まれる主なスーパーオキシド生成成分は、メタノール画分に含まれるキノン、ポリフェノール類と考えられているが、その含有物質の多様さゆえに特定にはいたっていない。DEPは平均直径が0.4ミクロン前後と小さく、容易に空中を浮遊し、吸気により気道に進入すると肺胞領域にまでも達しうる。

本実験のプロトコール

実験には6週齢のICR系雄性マウスを用いた。マウスを以下の4群にわけ、ハロセン麻酔下に、ポリエチレンチューブを用い0.1 mlの水溶液(懸濁液)を週に一度、6週間気管内投与した(図2)。

① vehicle群：0.05% Tween 80を含むphosphate-buffered saline (PBS)を週1回、計7回、② ovalbumin (OVA群)：vehicleに溶解した1 μ gのOVAを3週に1回、計3回、vehicleを4回、総計7回、③ DEP群：vehicleに懸濁した100 μ gのDEPを週1回、計7回、④ OVA+DEP併用群：100 μ gのDEPとともにvehicleに溶解した1 μ gのOVAを3週に1回、計3回、DEP懸濁液を4回、総計7回。上記の4群に対し、最終気管内投与の24時間後に以下の検討を行った。

図 2 気管内投与のプロトコル

表 1 Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid 中の細胞所見

実験群	動物数 (n)	総細胞数 ($\times 10^4$ /total BAL fluid)	マクロファージ数 ($\times 10^4$ /total BAL fluid)	好酸球数 ($\times 10^4$ /total BAL fluid)	好中球数 ($\times 10^4$ /total BAL fluid)	リンパ球数 ($\times 10^4$ /total BAL fluid)
Vehicle	12	31.6 $\pm$ 3.22	31.2 $\pm$ 3.13	0	0.391 $\pm$ 0.169	0
OVA	13	49.4 $\pm$ 4.16 [†]	48.7 $\pm$ 4.25 [†]	0.167 $\pm$ 0.116	0.385 $\pm$ 0.189	0.157 $\pm$ 0.114
DEP	13	43.9 $\pm$ 4.21	42.4 $\pm$ 3.88	0.185 $\pm$ 0.148	1.297 $\pm$ 0.417	0.057 $\pm$ 0.032
OVA+DEP	13	57.2 $\pm$ 3.85 [§]	48.3 $\pm$ 3.36 [†]	4.23 $\pm$ 1.21 ^{§**§§}	4.04 $\pm$ 0.787 ^{††††}	0.598 $\pm$ 0.163 ^{††††}

Four groups of mice were intratracheally administered vehicle, ovalbumin (OVA), diesel exhaust particles (DEP), or a combination of OVA and DEP for 6 wk. Bronchoalveolar lavage (BAL) was conducted 24h after the last intratracheal instillation. Total cell counts were determined on fresh BAL fluid, and differential cell counts were assessed with Diff-Quik-staining. Results are presented as mean $\pm$ SE.

[†] p<0.05 versus vehicle ^{**} p<0.001 versus OVA
[‡] p<0.01 versus vehicle ^{††} p<0.0001 versus OVA
[§] p<0.001 versus vehicle ^{‡‡} p<0.01 versus DEP
^{||} p<0.0001 versus vehicle ^{§§} p<0.001 versus DEP
[¶] p<0.05 versus OVA

表 2 肺の組織学的所見の定量的検討

実験群	動物数 (n)	好酸球浸潤数 (n/mm)	好中球浸潤数 (n/mm)	リンパ球浸潤数 (n/mm)	粘液産生細胞数 (n/mm)
Vehicle	7	0.016 $\pm$ 0.010	0.038 $\pm$ 0.010	0.060 $\pm$ 0.013	0.309 $\pm$ 0.117
OVA	9	0.744 $\pm$ 0.569	0.348 $\pm$ 0.172	1.30 $\pm$ 0.529	0.957 $\pm$ 0.377
DEP	9	0.150 $\pm$ 0.087	0.428 $\pm$ 0.117	1.32 $\pm$ 0.209	3.92 $\pm$ 1.10
OVA+DEP	9	5.24 $\pm$ 1.74 ^{†§**}	1.85 $\pm$ 0.706 [†]	8.11 $\pm$ 1.76 ^{‡††}	13.0 $\pm$ 2.23 ^{††††}

Animals received intratracheal instillation of vehicle, OVA, DEP, or OVA+DEP for 6 wk. Lungs were removed and fixed 24h after the last intratracheal administration. Sections were stained with Diff-Quik for measurement of inflammatory cells around the airways or with PAS for goblet cells in the bronchial epithelium. Results are expressed as number of cells per length of basement membrane of airways. Values are mean $\pm$ SE.

[†] p<0.05 versus vehicle [¶] p<0.0001 versus OVA
[‡] p<0.0001 versus vehicle ^{**} p<0.01 versus DEP
[§] p<0.05 versus OVA ^{††} p<0.001 versus DEP
^{||} p<0.001 versus OVA

図3 吸入アセチルコリンに対する気道反応性
The animals were randomized into four experimental groups that received intratracheal instillation with vehicle, OVA, DEP, or the combination of OVA and DEP on a weekly basis for 6 wk. Respiratory resistance (Rrs) to inhaled acetylcholine (ACh) was measured 24h after the last instillation by the method of Sorkness et al. with a minor modification. Data are shown as mean $\pm$ SE (n=8 in each group). *: $p < 0.05$ vs each other group

(1) 組織学的検討

摘出肺を中性緩衝ホルマリンで固定したあと Diff-Quik 染色, periodic acid Schiff (PAS) 染色に供した。Diff-Quik 染色を施行したプレパラート上で気道周囲の好酸球, 好中球, リンパ球の浸潤数を算定し, videomicrometer で計測した気管支の基底膜長で除し, 基底膜の単位長さあたりの浸潤数として定量化した。また, PAS 染色を施行したプレパラート上で気道上皮に存在する PAS 陽性細胞数を算定し, 同様に基底膜の単位長さあたりの PAS 陽性細胞数として定量化した。

(2) 気管支肺胞洗浄 (BAL) と洗浄液の検討

BAL fluid 中の総細胞数と細胞分類を算定し, 洗浄液の上清をサイトカイン測定に供した。

(3) サイトカインの測定

BAL fluid 上清と, 摘出肺をホモジナイズし超遠心した上清のサイトカイン濃度 (IL-5, GM-

CSF, IL-2, IL-4, IFN- γ) を ELISA で測定した。各サイトカインは, 得られた BAL fluid および肺組織ホモジネート上清の全体に含まれる総量で表した。

(4) アレルゲン特異的 IgG₁, IgE の測定

血中の OVA 特異的な IgG₁ と IgE の抗体価を ELISA により測定した。

DEP が好酸球性気道炎症に及ぼす効果

まず第一に, 気管支喘息の本態と考えられる好酸球性気道炎症に及ぼす DEP の効果を, BAL (表 1) と組織所見 (表 2) より検討した。

好酸球は vehicle 群の BAL fluid の中には認められなかった。OVA, DEP 単独群では若干の好酸球が BAL fluid 中に存在したが, OVA+DEP 併用群ではそれらの約 20 倍の増加が観察された ($p < 0.001$ vs each other group)。好中球は vehicle 群と OVA 単独群で少数観察され, DEP 単独群ではその 2~3 倍の数が存在したが, OVA+DEP 併用群では OVA 群の約 10 倍の増加が認められた ($p < 0.01$ vs each other group)。リンパ球は, vehicle 群と DEP 単独群ではほとんど観察されなかったが, OVA 単独群で少数の存在が認められた。OVA+DEP 併用群では OVA 群の約 4 倍の数のリンパ球が観察された ($p < 0.05$ vs each other group)。

組織学的検討では, vehicle 群に好酸球浸潤はほとんど認められなかった。OVA, DEP 単独群では若干の好酸球浸潤が存在したが, OVA+DEP 併用群では OVA 群の約 15 倍, DEP 群の約 35 倍の数の好酸球浸潤が観察された ($p < 0.05$ vs each other group)。好中球も vehicle 群ではほとんど浸潤はみられなかった。OVA, DEP 単独群で若干の好中球が存在したが, OVA+DEP 併用群ではその 4~5 倍の数の好中球が観察された。リンパ球も同様の結果で, OVA+DEP 併用群では OVA, DEP 単独群に比較し約 6 倍の数の浸潤が観察された ($p < 0.001$ vs each other group)。以上, DEP は OVA (アレルゲン) に関連する好酸球性気道炎症を顕著に増悪することが明らかになった。

表 3 肺局所における IL-5 と IL-4 の蛋白発現

実験群	動物数 (n)	肺組織ホモジネート上清		BAL fluid 上清	
		IL-5 (pg/total lung tissue supernatants)	IL-4 (pg/total lung tissue supernatants)	IL-5 (pg/total BAL supernatants)	IL-4 (pg/total BAL supernatants)
Vehicle	12	11.3±5.46	123.1±20.5	21.2±7.62	79.4±17.2
OVA	12	12.4±4.52	391.3±88.0 **	48.7±15.9	76.7±18.0
DEP	12	11.1±3.71	112.1±15.3	23.8±5.92	95.3±17.2
OVA+DEP	12	90.7±33.8 †**	308.5±63.5 ††	86.4±18.8 §**	78.9±14.9

Four groups of mice were intratracheally inoculated with vehicle, OVA, DEP, or the combination of OVA and DEP for 6 wk. BAL was conducted 24h after the last intratracheal instillation. In other animals, lungs were removed and frozen 24h after the last intratracheal administration. Protein levels in BAL and lung tissue supernatants were analyzed using ELISA. Results are shown as mean±SE.

† p<0.05 versus vehicle †† p<0.01 versus OVA

‡ p<0.01 versus vehicle ‡‡ p<0.05 versus DEP

§ p<0.001 versus vehicle ** p<0.01 versus DEP

表 4 肺局所における GM-CSF, IL-2, IFN γ の蛋白発現

実験群	動物数 (n)	肺組織ホモジネート上清			BAL fluid 上清		
		GM-CSF (pg/total lung tissue supernatants)	IL-2 (pg/total lung tissue supernatants)	IFN γ (pg/total lung tissue supernatants)	GM-CSF (pg/total BAL supernatants)	IL-2 (pg/total BAL supernatants)	IFN γ (pg/total BAL supernatants)
Vehicle	12	6.13±1.30	7.83±2.90	583±123	8.27±3.67	ND	207±27.6
OVA	12	7.39±0.78	15.3±5.16	683±130	14.5±6.26	ND	235±78.6
DEP	12	10.1±2.60	11.4±5.26	619±142	18.7±5.00	ND	239±65.3
OVA+DEP	12	13.7±1.48 †	48.1±10.7 ‡§	547±142	21.1±10.9	ND	193±25.0

* Four groups of mice received intratracheal administration of vehicle, OVA, DEP, or OVA+DEP for 6 wk. BAL was conducted 24h after the last intratracheal challenge. In separate animals, lungs were removed and frozen 24h after the last intratracheal instillation. Protein levels in BAL and lung tissue supernatants were analyzed using ELISA. Results are shown as mean±SE.

ND : not detected

† p<0.01 versus vehicle

‡ p<0.001 versus vehicle

§ p<0.01 versus OVA

|| p<0.001 versus DEP

表 5 6 週後の抗原特異的 IgG, IgE 抗体価

実験群	動物数 (n)	IgG _{2a} (抗体価)	IgG ₁ (抗体価)	IgE (抗体価)
Vehicle	36	100.4±0.42	111.3±6.0	16.0±0
OVA	36	161.3±61.3	175.7±24.7	16.3±0.17
DEP	36	100.0±0	131.7±20.7	16.0±0
OVA+DEP	48	100.0±0	1,483±454 ‡§	16.0±0

Four groups of mice were intratracheally administered vehicle, OVA, DEP, or the combination of OVA and DEP for 6 wk. Samples were retrieved 24h after the last intratracheal instillation. OVA-specific immunoglobulins were analyzed using ELISA. Results are expressed as mean±SE.

† p<0.01 versus vehicle

‡ p<0.01 versus OVA

§ p<0.01 versus DEP

表 6 9 週後の抗原特異的 IgG, IgE 抗体価

実験群	動物数 (n)	IgG _{2a} (抗体価)	IgG ₁ (抗体価)	IgE (抗体価)
Vehicle	10	100±0	100±0	16.0±0
OVA	10	293.8±158.4	30,300±13,200 **	23.1±7.09
DEP	10	100.0±0	105±5.0	16.0±0
OVA+DEP	10	1,035±269 ^{§¶¶}	57,200±12,700 ^{§¶¶}	41.6±7.80 ^{‡¶¶}

* Four groups of mice were intratracheally administered vehicle, OVA, DEP, or the combination of OVA and DEP for 9 wk. Samples were retrieved 24h after the last intratracheal instillation. OVA-specific immunoglobulins were analyzed using ELISA. Results are expressed as mean±SE.

[†] p<0.05 versus vehicle [¶] p<0.01 versus OVA

[‡] p<0.01 versus vehicle ^{**} p<0.05 versus DEP

[§] p<0.0001 versus vehicle ^{††} p<0.01 versus DEP

[‡] p<0.05 versus OVA ^{‡‡} p<0.0001 versus DEP

また、気管支喘息においては粘液産生細胞と粘液産生の増加がしばしば観察される。粘液産生細胞の増生の程度をPAS染色により組織学的に検討した。PAS陽性細胞はvehicle群にはほとんど存在しなかった。OVA、DEP単独群でPAS陽性細胞の若干の増加がみられたが、OVA+DEP併用群ではOVA群の約13倍、DEP群の約3倍と顕著な増加が観察された(p<0.001 vs each other group)。

さらに、その後の検討で、気管支喘息のもう一つの大きな特徴である気道過敏性もアレルゲンとDEPの併用により有意に亢進することが確認された(図3)³⁰⁾。

DEPのサイトカイン産生に及ぼす効果

気管支喘息や好酸球性気道炎症においてはIL-5, IL-4, GM-CSFなどの主としてTh2リンパ球に由来すると考えられているサイトカインが重要な役割を演じている^{24~27)}。次に、肺局所におけるこれらのサイトカインの発現に及ぼすDEPの効果进行を明らかにするために、BAL fluidと肺組織ホモジネート上清のサイトカインの蛋白濃度を測定した(表3, 4)。

OVA+DEP併用群の肺組織ホモジネート上清のIL-5の蛋白濃度は、他群の約8倍の値を示した(p<0.01 vs each other group)。IL-4の濃度は、OVA単独群とOVA+DEP併用群でvehicle

群とDEP単独群の2~3倍の値を示したが、併用投与の効果は観察されなかった。BAL fluid上清のIL-5の蛋白濃度も肺組織ホモジネート上清とほぼ同様の傾向を認めたが、IL-4濃度には有意な群間差を認めなかった。OVA+DEP併用群の肺組織ホモジネート上清のGM-CSFの蛋白濃度は他群に比較し高く、vehicle群の約2倍の値を示した(p<0.01)。BAL fluid上清のGM-CSFの蛋白濃度も肺組織ホモジネート上清とほぼ同様の傾向を認めたが有意差は認めなかった。

つづいて、Th2以外のサイトカインについても検討を加えた。IL-2濃度は、OVA単独群でもvehicle群、DEP単独群に比較し若干高値を示したが、OVA+DEP併用群ではOVA単独群の約3倍の値を示した(p<0.01 vs each other group)。IFN γ の濃度には各群間で有意差を認めなかった。BAL fluid上清のIFN γ 濃度にも有意な群間差はなく、BAL fluid上清のIL-2濃度は測定感度以下であった。

以上のように、DEPはアレルゲンの存在下にくつかのサイトカインの発現を亢進するが、特にTh2由来のIL-5の発現を亢進することにより好酸球性気道炎症を悪化しているものと考えやすい。その後の筆者らの検討で、DEPによる好酸球浸潤の修飾効果の程度はGM-CSFよりもIL-5の発現の強度と非常に強く相関することが確認されている^{31~34)}。なお、IL-5に対する免疫組織染色

を行うと、陽性所見はリンパ球に強く観察され、特に OVA+DEP 併用群で他群に比較し陽性細胞数が顕著に増加していた。

IFN γ はアレルゲンによる好酸球性気道炎症と Th2 細胞の増殖を軽減あるいは抑制すると報告されているが^{35,36}、今回の検討では各群間で有意な変化は認められなかった。OVA による気道炎症と特異的 IgG 産生を増強すると報告されている IL-2³⁷ に関しても OVA と DEP の併用効果は認められたが、IL-5 に比較するとその効果は軽微で、好酸球性炎症の程度との関連も IL-5 に比較し弱かった。

DEP の抗体産生に及ぼす効果

最後に、アレルギー反応の発現に重要と考えられる抗原特異的 IgE と IgG₁ の産生に対する DEP の効果を検討した。アレルゲン特異的 IgG₁ は、OVA 単独群でも vehicle 群、DEP 単独群に比較し上昇傾向を認めたが、OVA+DEP 併用群で他群に比較し著明な増加が観察された(表 5, $p < 0.01$ vs each other group)。アレルゲン特異的 IgE は全群で上昇を認めなかったが、実験期間を 6 週から 9 週へと延長すると、OVA 単独群でも vehicle 群、DEP 単独群に比較し上昇傾向を認め、OVA+DEP 併用群で他群に比較し有意な増加が観察された(表 6, $p < 0.05$ vs each other group)。

以上のように、DEP はアレルゲン特異的 IgE と IgG₁ 産生に対し、アジュバント効果を発揮した。

まとめとその後の研究の進展

今回の検討より、DEP とアレルゲンの併用気管内投与はおおのこの単独投与に比較して、好酸球とリンパ球の浸

図 4 Diesel exhaust (DE) 長期暴露が BAL fluid 中の細胞所見に及ぼす効果

ICR male mice were exposed 12h/day, 7 days/week for 40 weeks to clean air or DE at a soot concentration of 0.3, 1.0, or 3.0 mg/m³. The animals were sensitized with an intraperitoneal injection of 10 μ g of OVA (Groups E-H) or isotonic saline (Groups A-D) 16 weeks after the initiation of exposures and were challenged with an aerosol of 1% OVA (Groups E-H) or isotonic saline (Groups A-D) for 6 min at 3-week intervals during the last 24 weeks of the exposures. Twenty-four hours after the final challenge, the profiles of cells in BAL fluid were examined. The total cell count was determined on a fresh fluid specimen using a hemocytometer. Differential cell counts were assessed on cytologic preparations stained with Diff-Quik. Data are shown as mean $\pm$ SE ($n=7$ in each group). *, $p < 0.01$ vs Groups A, B, E, F, and G. #, $p < 0.0001$ vs Groups A, B, E, F, and G; $p < 0.05$ vs Group C. +, $p < 0.01$ vs Group E. **, $p < 0.001$ vs Group E; $p < 0.05$ vs Groups A, B, F, and G. ##, $p < 0.0001$ vs Group E; $p < 0.001$ vs Groups F and G; $p < 0.01$ vs Groups A and B. ***, $p < 0.0001$ vs Groups A, B, and E; $p < 0.001$ vs Groups F and G; $p < 0.01$ vs Group C. ###, $p < 0.01$ vs Groups A, B, E, F, and G; $p < 0.05$ vs Group C.

図 5 DE 長期暴露が BAL fluid 中の好酸球数に及ぼす効果

Mice were treated with the same protocol as described in the legends of Fig. 4. BAL procedures were conducted 24h after the final challenge, and the numbers of eosinophils in BAL fluid were examined on cytologic preparations stained with Diff-Quik. Data are expressed as mean $\pm$ SE ($n=7$ in each group). *, Animals without OVA sensitization or challenges showed no eosinophils in BAL fluid in the presence or absence of DE exposure (Groups A-D). **, $p < 0.05$ vs other groups.

図 6 DE 長期暴露が肺局所の IL-5 発現に及ぼす効果

Mice were treated with the same protocol as described in the legends of Fig. 4. BAL procedures were conducted 24h after the final challenge. BAL supernatants and the lungs were stored at -80°C . Later, lung tissue supernatants were prepared from the frozen lungs. The level of interleukin (IL)-5 in lung tissue and BAL supernatants was determined by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SE ($n=7$ in each group). *, Protein levels of IL-5 in lung tissue and BAL supernatants were lower than the detection limit (5 pg/ml) in Groups A-D.

図 7 DE 長期暴露が肺局所の GM-CSF 発現に及ぼす効果

Mice were treated with the same protocol as described in the legends of Fig. 4. BAL procedures were conducted 24h after the final challenge. BAL supernatants and the lungs were stored at -80°C . Later, lung tissue supernatants were prepared from the frozen lungs. The protein levels of GM-CSF in BAL and lung tissue supernatants were determined by ELISA. Data are shown as mean $\pm$ SE ($n=7$ in each group). *, Protein levels of GM-CSF in BAL supernatants were lower than the detection limit (5 pg/ml) in Groups A-D. **, $p<0.01$ vs Groups A and E.

しアジュバント効果を発揮した。さらに、DEP とアレルゲンの併用投与は IL-5 の局所発現を著明に増強した。DEP は、IL-4、GM-CSF、IL-2 の局所発現も修飾したが、いずれの変化も IL-5 のそれに比較すると軽微であった。

これらの事実から、DEP はアレルゲンの存在下で多種のサイトカインの局所発現を増強するが、なかでも Th2 由来の IL-5 の発現を加速することにより好酸球性気道炎症を悪化しているものと考えやすい。最近、Diaz-Sanchez^{23,38} らも、鼻腔内に DEP 懸濁液を単独で投与すると IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IFN γ といった多種多様なサイトカインの mRNA 発現が亢進するが、抗原を併用して投与すると Th2 サイトカインの発現が亢進すると報告している。

筆者らの実験モデルでは、IL-5 により誘導、活性化された好酸球が、IL-4 や IL-2 により産生へと導かれた Ig やその他の炎症性 mediator により脱顆粒し、顆粒酵素により気道の傷害や粘液産生細胞の増生などが引き起こされるという scheme も推測される。

しかし、DEP とアレルゲンを懸濁液として気管内投与する実験系は、実際人類が被っている暴露形態とは異なる^{28,30,39}。よりヒトの吸入様式に近づけるため、大型チャンバーを用いてディーゼル排気ガス (DE) と吸入 OVA を併用暴露する実験系で同様の検討を進めたところ^{31-34,40}、DE の長期暴露 (12 h/day, 40 w, 0.3~3.0 mg soot/m³)³¹ は、アレルゲンの単独吸入に比較し好酸球性気道炎症、IL-5 と

潤を特徴とする気道炎症や粘液産生細胞の増生を顕著に増悪することが明らかになった。また、DEP は、アレルゲン特異的 IgG₁ と IgE 産生に対

GM-CSF の局所発現を増悪する結果が得られた (図 4, 5, 6, 7)。またこれらの検討では、好酸球浸潤と IL-5 の発現は強い正相関を示していた。

おわりに

本研究は国立環境研究所地域環境研究グループ大気影響評価研究チームに主任研究員として在籍した3年間に行った。共同研究者である嵯峨井勝総合研究官、市瀬孝道主任研究員(現大分県立看護科学大学教授)、宮原裕一研究員と、貴重なご指導やご助言を賜った鈴木継美国立環境研究所所長、大井玄現所長をはじめ国立環境研究所の諸先生方にこの場を借りて感謝致します。また、国立環境研究所で研究する機会を与えていただいた、京都府立医科大学第一内科学教室近藤元治教授と吉川敏一助教授に心より深謝いたします。

文 献

- 1) Fleming DM, Crombie DL : Prevalence of asthma and hayfever in England and Wales. *Br. Med. J.* 294 : 279-283, 1987.
- 2) Haahtela T, Lindholm H, Björkstén F, Koskenvuo K, Laitinen LA : Prevalence of asthma in Finnish young men. *Br. Med. J.* 301 : 266-268, 1990.
- 3) Yunginger JW, Reed CE, O'Connell EJ, Melton LJ, O'Fallon WM, Silverstein MD : A community-based study of the epidemiology of asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146 : 888-894, 1992.
- 4) Zimmerman B, Chambers C, Forsyth S : Allergy in asthma. 11. The highly atopic infant and chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81 : 71-77, 1988.
- 5) Aberg N : Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clin. Exp. Allergy* 19 : 59-63, 1989.
- 6) Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E : Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among residents in a densely cultivated area. *Ann. Allergy* 58 : 265-270, 1987.
- 7) Lynch NR, Prisco-Feunmayor MD : High allergic reactivity in a tropical environment. *Clin. Allergy* 14 : 133-140, 1984.
- 8) Waite DA, Eyles EF, Tonkin SL, O'Donnell TV : Asthma prevalence in Tokelauan children in two environments. *Clin. Allergy* 10 : 71-75, 1980.
- 9) Andrae S, Axelson O, Björkstén B, Fredriksson M, Kjellman NIM : Symptoms of bronchial hyper-reactivity and asthma in relation to environmental factors. *Arch. Dis. Child.* 163 : 473-478, 1988.
- 10) Clifford RD, Radford M, Howell JB, Holgate ST : Prevalence of atopy and range of bronchial response to methacholine in 7 and 11 year old schoolchildren. *Arch. Dis. Child.* 64 : 1126-1132, 1989.
- 11) Schwartz J, Slater T, Larson T, Pierson WE, Koenig JO : Particulate air pollution and hospital emergency room visits for asthma in Seattle. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 : 826-831, 1993.
- 12) Roemer W, Hoek G, Brunekreef B : Effects of ambient winter air pollution on respiratory health of children with chronic respiratory symptoms. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 : 118-124, 1993.
- 13) Romieu I, Meneses F, Ruiz S, Sienra JJ, Huerta J, White MC, Etzel RA : Effects of air pollution on the respiratory health of asthmatic children living in Mexico city. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 : 300-307, 1996.
- 14) Kaneko S, Shimada K, Hirouchi H, Endo A, Kodama M, Shinoda N, Imai T, Takiguchi K : Nasal allergy and air pollution. *Oto-Rhino-Laryngology Tokyo.* 23 : 270-279, 1980.
- 15) McClellan RO : Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27 : 279-300, 1987.
- 16) Sagai M, Ichinose T, Furuyama A : Biological effects of diesel exhaust particles. III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 21 : 199-209, 1996.
- 17) Ichinose T, Furuyama A, Sagai M : Biological effects of diesel exhaust particles (DEP) II. Acute toxicity of DEP introduced into lung by intratracheal instillation. *Toxicology* 99 : 153-167, 1995.
- 18) Bice DE, Mauderly JL, Jones RK, McClellan RO : Effects of inhaled diesel exhaust on immune response after lung immunization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5 : 1075-1086, 1985.
- 19) Henderson RF, Pickrell JA, Jones RK, Sun DJ, Benson JM, Mauderly JL, McClellan RO : Response of rodents to inhaled diluted diesel exhaust : biochemical and cytological changes in bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue. *Fundam. Appl. Toxicol.* 11 : 546-567, 1988.
- 20) Mauderly JL, Banas DA, Griffith WC, Hahn FF, Henderson RF, McClellan RO : Diesel exhaust is not a pulmonary carcinogen in CD-1 mice exposed under conditions carcinogenic to F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 30 : 233-242, 1996.
- 21) Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, Muranaka M : Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79 : 639-645, 1987.
- 22) Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikemori R, Tokiwa H : Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77 : 616-623, 1986.
- 23) Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A : Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J. Immunol.* 158 : 2406-2413, 1997.
- 24) Expert Panel Report : Guidelines for the diagnosis and management of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88 : 425-534, 1991.
- 25) Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, Kay AB, Hamid Q : Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine

- responsiveness in atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92 : 397-403, 1993.
- 26) Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG : Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 183 : 195-201, 1996.
 - 27) Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann JH, Pauwels R : Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12 : 254-259, 1995.
 - 28) Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M : Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 : 36-42, 1997.
 - 29) 嵯峨井勝 : ディーゼル排気微粒子(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.
 - 30) Takano H, Ichinose T, Miyabara Y, Yoshikawa T, Sagai M : Diesel exhaust particles enhance airway responsiveness following allergen exposure in mice. *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.* 20 : 329-336, 1998.
 - 31) Takano H, Ichinose T, Miyabara Y, Shibuya T, Lim HB, Yoshikawa T, Sagai M : Inhalation of diesel exhaust enhances allergen-induced eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness in mice. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 150 : 328-337, 1998.
 - 32) Miyabara Y, Takano H, Ichinose T, Lim HB, Sagai M : Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 : 1138-1144, 1998.
 - 33) Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim HB, Sagai M : Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102 : 805-812, 1998.
 - 34) Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Sagai M : Long-term exposure to diesel exhaust enhances antigen-induced eosinophilic inflammation and epithelial damage in the murine airway. *Toxicol. Sciences* 44 : 70-79, 1998.
 - 35) Fernandes-Bortan R, Sanders VM, Mossman TR, Vietta S : Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 168 : 543-558, 1988.
 - 36) Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S : Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 177 : 573-576, 1993.
 - 37) Renzi PM, Sapienza S, Wasserman S, DU T, Olivenstein R, Wang NS, Martin JG : Effect of interleukin-2 on the airway response to antigen in rat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146 : 163-169, 1992.
 - 38) Diaz-Sanches D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A : Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98 : 114-123, 1996.
 - 39) Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Yanagisawa R, Sagai M : Murine strain difference in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. *Toxicology* 122 : 183-192, 1997.
 - 40) Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Sagai M : Diesel exhaust inhalation enhances airway hyperresponsiveness in mice. *Int. Arch. Allergy Immun.* 116 : 124-131, 1998.