ディーゼル排気微粒子の Th 1/Th 2 バランスおよび コラーゲン関節炎に及ぼす影響

吉野 伸・嵯峨井 勝*

Influence of diesel exhaust particles on Th1/Th2 balance and collagen-induced arthritis

The effects of diesel exhaust particles (DEP) on Th 1/Th 2 balance and collagen-induced arthritis (CIA) in mice were investigated. Oral administration of neither DEP nor the antigen hen egg lysozyme (HEL) alone produced the Th 1 cytokine IFN- γ and the Th 2 cytokine IL-4. DEP administered orally together with HEL increased the secretion of IFN- γ as well as IL-4 in a dose-related fashion, although IL-4 appeared to be more efficiently secreted in mice given lower doses of DEP. Similar results were obtained when anti-HEL IgG 2 a and IgG 1 antibodies which were Th 1 and Th 2 cell-dependently produced, respectively, were measured. Intraperitoneal injection of HEL alone induced marked Th 2 responses including anti-HEL IgG 1 and IL-4 production, while negligible induction of Th 1 responses including anti-HEL IgG 2 a and IFN- γ were observed in mice injected with the antigen in the same manner. DEP plus HEL administered intraperitoneally further facilitated the Th 2 responses, but the Th 1 responses remained unchanged. HEL emulsified with complete Freund's adjuvant induced both the Th 1 and Th 2 responses. Furthermore, nasal administration of DEP led to the augmentation of CIA that was associated with anti-type II collagen IgG antibody production. Antigen-specific IgG 2 a and IgG 1 antibodies as well as IFN- γ and IL-4 were also markedly produced. Thus, DEP appear to modulate Th 1/Th 2 balance and have ability to influence autoimmune diseases.

Rec. 11/26/1998, Acc. 2/8/1999, pp 145~150

Shin Yoshino・Masaru Sagai*

key words : diesel exhaust particles, Th1/Th2 balance,
collagen-induced arthritis, autoimmune disease

ディーゼル車から排出される微粒子(diesel exhaust particles, DEP)は炭素粒子とそれに吸着している多環芳香族炭化水素などの多種類の有機化合物および鉄、銅などの重金属からなり¹⁾、これらのなかには細胞毒性²⁾および発癌作用³⁾を有するものも多い。また、DEPは呼吸器系アレルギー疾患との関連性も指摘されている^{4,5)}。実際に

DEPはTh2タイプのヘルパーT細胞依存性のIgE抗体産生を増強し⁶⁾、またIL-4などのTh2サイトカイン産生を促進する^{7,8)}。

最近、筆者らはDEPに経口トレランス誘導を阻止する作用があることを見出したが⁹⁾、このとき、経口抗原によるTh1およびTh2サイトカイン産生の抑制は本大気汚染物質によってブロックされた。生体はTh1およびTh2タイプのヘルパーT細胞が互いに制御し合い、バランス(Th1/Th2バランス)をうまくとることによって恒常性の維持に寄与していると思われる。しかし、Th1/Th2バランスは細菌あるいはウイルス感染ならびに化学物質などの環境因子によって強く影響を

* Department of Microbiology, Saga Medical School Research Team for Health Effects of Air Pollutants, National Institute for Environmental Studies 佐賀医科大学微生物学教室
Offprint requests to : Shin Yoshino, Department of Microbiology, Saga Medical School Research Team for Health Effects of Air Pollutant, National Institute for Environmental Studies, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan

受け、そのアンバランスによって健康が損なわれる可能性がある。本研究においては、環境因子として DEP に注目し、本大気汚染物質の Th1/Th2 バランスに与える影響について検討した。また、マウスにおける自己免疫性疾患モデルであるコラーゲン関節炎の発症には、Th1 優位に傾いた免疫応答が少なくとも部分的に関与している可能性がある¹⁰⁾が、本自己免疫性関節炎に対する DEP の効果について調べた。

材料と方法

① 実験動物：8～9 週齢の DBA/1 J マウスを用いた。

② 可溶性蛋白質抗原 hen egg lysozyme (HEL) の投与：HEL は生理食塩水に溶解、あるいは生理食塩水と等量の complete Freund's adjuvant (CFA) に混和して、経口あるいは腹腔内投与した¹¹⁾。対照としては生理食塩水のみあるいは生理食塩水と等量の CFA と混和したものを同様に投与した。

③ ディーゼル排気微粒子 (DEP) の投与：DEP は負荷をかけたディーゼルエンジンからの排出ガスをダイリユウシヨントネル内に導き、ガラスフィルター上に捕集した²⁾。微粒子の平均直径は $0.4 \mu\text{m}$ だった。DEP は 0.01% の Tween 20 を含む PBS に懸濁し、HEL 投与直前に経口あるいは腹腔内投与した⁹⁾。

④ 抗体の測定：HEL および DEP 投与後、経時的に血清を遠心分離し、 56°C 、30 分間加熱した。抗原特異的抗体 IgG、IgG1 および IgG2a を ELISA 法によって測定した¹⁰⁾。

⑤ サイトカインの測定： $5 \times 10^6/\text{ml}$ の脾臓細胞浮遊液を調整し、用いた抗原とともに 48 時間培養した。培養上澄を遠心分離し、上澄中の IFN γ および IL-4 をサンドイッチ ELISA 法によって測定した¹²⁾。

⑥ コラーゲン関節炎 (CIA) の誘導：CIA 誘導のため、0.025 mg の II 型コラーゲン (type II collagen, C II) を 0.05 ml の 0.01 N の酢酸に溶解し、等量の CFA に混和後、動物の尾根部皮下に注射した。21 日後、同様に追加免疫した。CIA の

図 1 Effect of DEP on Th1 and Th2 cytokine secretion

Mice were orally given 1 mg of HEL dissolved in 0.25 ml of 0.9% NaCl every 3 days for 15 days. 0.25 ml of 0.9% NaCl alone was administered as a control. The indicated doses of DEP suspended in 0.25 ml of PBS was also orally given immediately before the administration of HEL. As a control, 0.25 ml of PBS alone was given. Eighteen days after the first administration of HEL plus DEP, secretion of IFN γ and IL-4 from spleen cells was determined by sandwich ELISA. Values are expressed as mean $\pm$ S. E. M. of quadruplicate samples from culture supernatants of cells pooled from five mice.

重症度は臨床的点数法によった¹³⁾。

結 果

(1) DEP の Th1 および Th2 サイトカイン産生に対する効果

DEP の暴露後、その一部は嚥下作用によって消化器系に入ることが知られている。したがって、DEP を HEL とともに免疫時から 3 日ごとに 15 日間マウスに経口投与した。投与終了 3 日後に動物の脾臓細胞を HEL とともに *in vitro* において培養し、その上澄に産生される Th1 サイトカインである IFN γ および Th2 サイトカインである IL-4 を測定した (図 1)。その結果、HEL あるいは DEP のみを経口投与した動物においては IFN γ および IL-4 産生はほとんどみられなかった。一方、HEL および DEP を併用した経口投与によっ

表 1 The effects of oral versus intraperitoneal administration of DEP on Th1 and Th2 responses

Route	Group	Anti-HEL antibody (A 405)		Cytokine (pg/ml)	
		IgG2a	IgG1	IFN γ	IL-4
p. o.	0.9% NaCl/PBS	0.03 $\pm$ 0.002	0.04 $\pm$ 0.001	170 $\pm$ 15.4	38 $\pm$ 4.0
	HEL/PBS	0.04 $\pm$ 0.002	0.02 $\pm$ 0.001	147 $\pm$ 17.3	46 $\pm$ 4.2
	0.9% NaCl/DEP	0.02 $\pm$ 0.001	0.03 $\pm$ 0.002	158 $\pm$ 13.9	40 $\pm$ 3.6
	HEL/DEP	0.38 $\pm$ 0.026*	0.46 $\pm$ 0.063*	1490 $\pm$ 126.4	284 $\pm$ 31.4
i. p.	0.9% NaCl/PBS	0.02 $\pm$ 0.001	0.01 $\pm$ 0.001	132 $\pm$ 10.2	32 $\pm$ 4.6
	HEL/PBS	0.10 $\pm$ 0.014	0.37 $\pm$ 0.029	194 $\pm$ 17.3	440 $\pm$ 28.7
	0.9% NaCl/DEP	0.04 $\pm$ 0.002	0.02 $\pm$ 0.001	155 $\pm$ 18.3	42 $\pm$ 5.6
	HEL/DEP	0.12 $\pm$ 0.009	0.94 $\pm$ 0.083*	182 $\pm$ 17.0	937 $\pm$ 88.6
i. p.	0.9% NaCl/PBS	0.03 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.002	140 $\pm$ 16.1	38 $\pm$ 4.7
	HEL/PBS	0.08 $\pm$ 0.006	0.43 $\pm$ 0.024	205 $\pm$ 22.3	383 $\pm$ 27.4
	0.9% NaCl/CFA	0.04 $\pm$ 0.003	0.05 $\pm$ 0.002	168 $\pm$ 17.9	46 $\pm$ 5.9
	HEL/CFA	1.68 $\pm$ 0.092*	1.09 $\pm$ 0.159*	5977 $\pm$ 304.8	1715 $\pm$ 264.8

One milligram of HEL dissolved in 0.1 ml of 0.9% NaCl was either orally (p.o.) given every three days from days 0 to 15 or intraperitoneally (i. p.) injected once on day 0. 0.1 ml of 0.9% NaCl alone was given as a control. One milligram of DEP suspended in 0.1 ml of PBS was also either p.o. or i.p. given immediately before each administration of HEL. As a control, 0.1 ml of PBS alone was administered. To compare the adjuvant activity of DEP with that of CFA, 1 mg of HEL was emulsified in 0.2 ml of 0.9% NaCl/CFA and injected i.p. once on day 0. On day 18, sera and spleens were collected and assayed for anti-HEL IgG2a and IgG1 antibodies and for IFN γ and IL-4. Values are expressed as mean $\pm$ S. E.M. of either five mice for the measurement of anti-HEL antibodies or quadruplicate samples from culture supernatants of cells pooled from 5 mice for the measurement of cytokines. * $p < 0.5$ versus HEL/PBS (Student's t test).

表 2 Effect of DEP on collagen-induced arthritis in mice

DEP (mg/ml)	Mean joint score	Anti-CII antibody (A 405)			Cytokine (pg/ml)	
		IgG	IgG2a	IgG1	IFN γ	IL-4
0 (PBS)	3.2 $\pm$ 0.6	0.62 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.04	2648 $\pm$ 235	386 $\pm$ 22
0.1	3.8 $\pm$ 0.6	0.75 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.04	3679 $\pm$ 338	484 $\pm$ 30
0.3	5.5 $\pm$ 0.7*	1.15 $\pm$ 0.07*	0.73 $\pm$ 0.08	1.24 $\pm$ 0.08*	4388 $\pm$ 426	537 $\pm$ 56
1	6.7 $\pm$ 0.8*	1.35 $\pm$ 0.09*	0.87 $\pm$ 0.07*	1.63 $\pm$ 0.12*	4920 $\pm$ 438	636 $\pm$ 62

To induce CIA, mice were immunized with CII on day 0 followed by a booster injection of day 21. Fifty microliters of PBS alone or 50 μ l of PBS containing 0.1, 0.3, and 1 mg/ml DEP were intranasally administered every 2 days from day 0 to day 20. The severity of CIA, production of serum anti-CII IgG, IgG2a and IgG1 antibodies, and *in vitro* secretion of IFN γ and IL-4 were determined on day 40. Values are the mean $\pm$ SEM of 8 mice or quadruplicate cultures of cells pooled from 8 mice. * $p < 0.05$ versus PBS alone, Student's t test.

てこれらサイトカイン産生は DEP の用量に依存して増大した。しかし、このとき比較的多量(1 mg)の DEP を投与した動物においては対照に対する IFN γ および IL-4 産生比率は同程度であったが、低い用量(0.01 および 0.1 mg)の DEP においては IFN γ よりも IL-4 の産生比率がより大きかった。

(2) DEP の Th 1 および Th 2 細胞依存性の抗体産生に対する効果

Th 1 細胞依存性の IgG 2 a 抗体産生および Th 2 細胞依存性の IgG 1 抗体産生に対する 1 mg の DEP の効果について検討した。DEP あるいは HEL のみを上述した投与法によって経口投与したが、抗 HEL IgG 2 a および IgG 1 抗体産生はみ

られなかった(表1)。しかし、DEPをHELと併用して投与することによってこれら抗体産生は顕著に増加した。次に、DEPおよびHELを腹腔内投与し、経口投与の場合と比較した。HELのみの腹腔内投与によって抗HEL IgG 1抗体およびIL-4産生は著明に増加した。一方、抗HEL IgG 2a抗体産生およびIFN γ 産生はきわめて弱かった。DEPのみの腹腔内投与によってはこれら抗体およびサイトカイン産生は影響をほとんど受けなかった。DEPをHELと併用して投与すると、抗HEL IgG 1抗体およびIL-4産生はさらに強く促進された。しかし、抗HEL IgG 2a抗体およびIFN γ 産生は全く影響を受けなかった。さらに、DEPのアジュバント効果をCFAの場合と比較した。

HELをCFAに混和し、腹腔内投与すると、抗原特異的IgG 2aおよびIgG 1産生はともに強く増大した。また、このときIFN γ およびIL-4産生も同様に著明に増加した。

(3) DEPのコラーゲン関節炎(CIA)に対する効果

CIAに対するDEPの効果について検討したが、C II免疫時から2日ごとに20日間、DEPを腹腔内に投与することによって、本自己免疫性関節炎の重症度の促進がみられた(表2)。また、このとき抗II IgG, IgG 2aおよびIgG 1抗体産生ならびにFIL γ およびIL-4分泌はすべて増大した。

考 察

本実験結果によって次のことが示唆された。

第一に、HELあるいはDEPのみの経口投与ではIFN γ およびIL-4産生はみられなかったが、DEPをHELと併用して投与することによってこれらサイトカインの産生が誘導されたことから、DEPを経口的に投与することによって抗原特異的なTh 1およびTh 2細胞は活性化されるのではないかと思われる。特に、IFN γ 産生の場合と比較し、IL-4はより低い用量のDEPに対し、より効率的に産生されたことから、Th 2細胞のDEPに対する感受性の高さが推察される。しかし、より多量のDEPに対しては同率のIFN γ および

IL-4産生がみられたことから、両細胞間における高濃度のDEPに対する感受性の違いはないように思われた。最近、筆者らはHELに対する経口トレランスの誘導¹¹⁾はDEPの経口的な投与によって阻止されることを報告した⁹⁾が、またDEPのこの阻止効果は本大気汚染物質の毒性作用による消化器系の組織障害の結果生じるHELの血管内流入によるのではなく、経口抗原によるTh 1およびTh 2サイトカイン産生抑制のDEPによるブロックによることを明らかにした。本実験においても同じ用量のDEPを投与しており、DEPのサイトカイン産生に対する効果は消化管組織に対するDEPの毒性によるのではなく、腸管あるいは末梢におけるリンパ組織におけるT細胞に対する作用の結果であると推察される。

第二に、DEPをHELとともに腹腔内投与した場合、Th 1およびTh 2サイトカイン産生ならびに抗原特異的なTh 1細胞依存性IgG 2a抗体およびTh 2細胞依存性IgG 1抗体産生^{14,15)}が経口投与した場合と異なるということである。腹腔内投与の場合、HELのみの投与によって抗HEL IgG 1抗体およびIL-4が強く産生され、これらTh 2反応はDEPによってさらに促進された。一方、HELのみ投与によっては抗HEL IgG 2a抗体およびIFN γ 産生はきわめて弱く、これらTh 1反応はDEPによって影響をほとんど受けなかった。経口および腹腔内投与間におけるこれらの違いは、抗原特異的Th 1細胞活性における腸管免疫系の重要な役割を示唆していると思われる。また、DEPの代用としてCFAを抗原とともに腹腔内投与した場合、抗HEL IgG 1抗体およびIL-4産生は抗HEL IgG 2a抗体およびIFN γ 産生と同程度であり、このことはCFAのTh 1およびTh 2の両反応に対する強いアジュバント作用を示している。したがって、本実験条件下ではDEPはCFAの場合と異なりTh 2反応に対し特異的なアジュバント作用を有していると思われる。

第三に、DEPの経鼻投与によってCIAの重症度が増加し、このとき抗II IgG抗体産生の促進がみられた。また、Th 1反応である抗II IgG 2aお

よび IFN γ 産生ならびに Th2 反応である抗 II IgG 1 および IL-4 産生はすべて増強され、これは DEP を HEL とともに投与した場合と同様であり、前述したように、DEP の粘膜免疫系に対する役割が示唆された。しかし、CIA は過剰な Th1 反応の結果による疾患ではないかと疑われている¹⁰⁾が、本実験結果で示されているように、抗原特異的抗体およびサイトカイン産生においては、DEP によってさらに Th1 反応に傾いた知見は得られなかった。しかし、Th1 反応は Th2 反応とともに DEP によってさらに促進されており、この Th1 反応の促進によって CIA は増強されたのかもしれない。自己免疫疾患における Th1/Th2 バランスの役割については今後さらなる検討の余地があると思われる。

別のメカニズムとしては、DEP による補体の活性化¹⁶⁾、IL-1¹⁷⁾および活性酸素の産生^{2,18)}が考えられる。CIA の発症には補体の活性化が重要であり¹⁹⁾、また、炎症における IL-1 および活性酸素の重要な役割はよく知られており、これらが CIA の増強に関与したのかもしれない。

最近、自己免疫疾患およびアレルギー疾患をはじめとして、免疫異常が関与した疾患における Th1/Th2 バランスの役割が注目されているが、本研究においては DEP が Th1/Th2 バランスを修飾し、自己免疫疾患に対し影響を及ぼす可能性があることを示唆した。

文 献

- Schuetzle D: Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. *Environ Health Perspect* 47: 65-80, 1983.
- Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Mori Y: Biological effects of diesel exhaust particles. I. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Rad Biol Med* 14: 37-47, 1993.
- Handa T, Yamauchi T, Ohnishi M, Hisamatsu Y, Ishii T: Detection and average content levels of carcinogenic and mutagenic compounds from the particulates on diesel and gasoline engine mufflers. *Environ Int* 9: 335-341, 1983.
- Sagai M, Furuyama A, Ichinose T: Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Rad Biol Med* 21: 199-209, 1996.
- 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.
- Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenada H, Saxon A: Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 94: 1417-1425, 1994.
- 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.
- Diaz-Sanchez D: The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy* 52(suppl.): 52-56, 1997.
- Yoshino S, Ohsawa M, Sagai M: Diesel exhaust particles block induction of oral tolerance in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 287: 679-683, 1998.
- Yoshino S: Effect of a monoclonal antibody against interleukin-4 on collagen-induced arthritis in mice. *Br J Pharmacol* 123: 237-242, 1998.
- Yoshino S, Ohsawa M: Effect of a monoclonal antibody against interleukin-4 on the induction of oral tolerance in mice. *Eur J Pharmacol* 336: 203-209, 1997.
- Yoshino S: Treatment with an anti-IL-4 monoclonal antibody blocks suppression of collagen-induced arthritis in mice by oral administration of type II collagen. *J Immunol* 160: 3067-3071, 1998.
- Yoshino S, Cleland GL: Depletion of $\alpha\beta$ T cells by a monoclonal antibody against the $\alpha\beta$ T cell receptor suppresses established adjuvant arthritis, but not established collagen-induced arthritis in rats. *J Exp Med* 175: 907-915, 1992.
- Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL: IFN- γ regulates the isotype of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 140: 1022-1027, 1988.
- Estes DM, Hirano A, Heussler VT, Dobbelaere DAE, Brown WC: Expression and Biological activities of bovine interleukin-4: Effects of recombinant bovine interleukin-4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol* 163: 268-279, 1995.
- Kanemitsu H, Nagasawa S, Sagai M, Mori Y: Complement activation by diesel exhaust particles. *Biol Pharm Bull* 21: 129-132, 1998.
- Yang HM, Castranova V, Ma JK: Effects of diesel exhaust particles on the release of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α from rat alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 23: 269-289, 1997.
- Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T, Sagai M: Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel

- exhaust particle components with NADPH-cytochrome P 450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Rad Biol Med* 22 : 479-487, 1997.
- 19) Morgan K, Clague RB, Shaw MJ, Firth SA, Twose TM, Holt PJJ : Native type II collagen-induced arthritis in the rat. The effect of complement depletion by cobra venom factor. *Arthritis Rheum* 24 : 1356-1362, 1981.