

最新のディーゼルエンジン排気が喘息様病態 (気道リモデリング^{注1)}) に及ぼす影響^{*1}

Effects of Exposure to the Latest Diesel Engine Exhaust
on Airway Remodeling in Asthma

前島 一仁^{*2}
Kazuhito MAEJIMA

机 直美^{*3}
Naomi TSUKUE

伊藤 剛^{*2}
Tsuyoshi ITO

加藤 温中^{*2}
Atsunaka KATO

奥村 弘樹^{*4}
Hiroki OKUMURA

Abstract

To examine how the latest diesel engine exhaust affects airway remodeling (AR) and to demonstrate the refractory response to inhalant steroids, an AR model mouse and AR guinea pig made by administering ovalbumin were exposed to diluted diesel exhaust, and the biological indicators of asthma and/or AR were measured. For the mouse, no aggravation or AR could be observed in realistic antigen administration, though slight aggravation (thickening of epithelium and sub-epithelial fibrosis) was observed after antigen administration for causing AR in the mouse. For the guinea pig, no effects of diesel exhaust exposure on the development of AR could be detected. These results suggested that exposure to the latest diesel engine exhaust and realistic antigen inhalation produced little aggravation for the development of AR of laboratory animals.

1. はじめに

近年、幼児や学童の喘息有病率の増加が見られているが、大気汚染との間に明らかな関連は示されていない^{1)~4)}。また、以前よりディーゼル排気(DE)等の道路交通由来の大気汚染と、気管支喘息の発症あるいは増悪との関連について注目されているが、まだ疫学研究や基礎研究からは現実の臨床状況を説明しうる明確な因果関係やメカニズムの解明は不十分である。

本研究では、①最新のディーゼルエンジンからの排気を用いた現実的な濃度レベルでの評価、②喘息の難治化で注目されている「気道リモデリング」への影響、に焦点をあて、マウスとモルモットの気道リモデリングモデル動物を用いたDEの吸入曝露実験により、主に以下の2点について調べた。

- ・抗原(卵白アルブミン, OVA)の感作, 吸入で形成されていく気道リモデリングが, DE曝露によりその創出が早まるのか否か, また, 最終的な気道リモデリングの程度をより増悪するの否か。
- ・抗原の感作, 吸入で形成された気道リモデリングは抗原曝露を中止することにより回復していくが, 抗原の曝露中止後も継続して行うDE曝露が気道リモデリングの回復を遅延させるのか否か。

2. 方法

2.1 気道リモデリングモデルマウスを用いた短期DE曝露実験

OVAの全身感作と吸入で作出される気道リモデリングモデルマウス(岐阜薬科大学確立⁵⁾)にDEを約2ヵ月(63日)曝露し, 気道リモデリングの

*1 原稿受理 2008年2月19日

*2 (財)日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部 博士(医学)

*3 (財)日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部 博士(獣医学)

*4 (財)日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部 博士(薬学)

注1 気道リモデリング: 気道の壁が厚くなって気管支の内腔が狭くなり, 呼吸が困難になる病態。吸入ステロイド薬に対して治療抵抗性を示す。

形成過程と回復過程への影響を調べた (Fig. 1). 平成15年規制 (新短期) 適合のコモンレール式ディーゼルエンジン (2,953cc) をダイナモ上で回転数2,415rpm (70%), トルク40Nm (15%) で定常運転して得られた排気を希釈して実験動物に曝露した. 燃料は市販の軽油 (硫黄分10ppm以下) を用い, DE曝露は16時間/日 (17:00~翌9:00), 6日/週の頻度で行った.

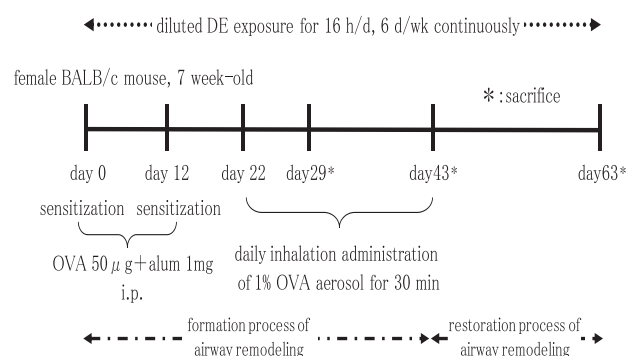


Fig. 1 Schedule of the short-term exposure experiment for mouse

実験動物は, 7週齢の雌性BALB/cマウスを用いた. 実験群は, 直接排気を清浄空気で約20倍に希釈した排気を曝露した高濃度群 (粒子 (PM): $0.5\text{mg}/\text{m}^3$, NO_2 : 0.5ppm), 直接排気を約100倍希釈した排気を曝露した低濃度群 (PM: $0.1\text{mg}/\text{m}^3$, NO_2 : 0.1ppm), 高濃度群の排気から粒子を除去したガス成分のみを曝露した高濃度除粒子群 (PM: $0\text{mg}/\text{m}^3$, NO_2 : 0.5ppm), および清浄空気のみを曝露した対照群の計4群を設定した.

実験開始29日, 43日および63日目にメサコリンを吸入させたマウスの気道抵抗 (Penh) を測定し, PC120 (気道抵抗を20%上昇させるメサコリン濃度, PC120値が小さいほど気道過敏性は亢進) とAUC (曲線下面積, AUC値が大きいほど気道過敏性は亢進) を指標にメサコリンに対する気道過敏性を評価した. また, 同時に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の各種炎症細胞数, IL-4, IL-5, IL-13, $\text{IFN}\gamma$, エオタキシン (以上は気道炎症, 好酸球, アレルギー等に関与する指標), 血清中のOVA特異的抗体 (IgE, IgG1, IgG2a, 抗原に対する特異的な抗体), $\text{TGF}\beta 1$, 肺中ヒドロキシプロリン (以上は肺線維化の指標), および上皮杯細胞の過形成, 気道上皮の肥厚, 基底膜下の膠原線維沈着量 (以上は気道リモデリングに関与する組織変化の

指標) を測定した^{6)~11)}. いずれの実験群とも, 各評価時期に8匹ずつを各種測定に供した.

統計処理は, Dunnettの多重比較検定およびStudent's t-検定で行い, $p < 0.05$ をもって有意とした.

2.2 気道リモデリングモデルモルモットと感作マウスを用いた長期DE曝露実験

気道リモデリングモデルモルモット (獨協医科大学確立¹²⁾) と, 2.1項の短期曝露実験に比べより現実的な条件で抗原を吸入投与したマウスに対する6ヵ月DE曝露の影響を調べた (Fig. 2). 使用したエンジン, 燃料, エンジン運転条件, 実験群および統計処理等は2.1項に準じた.

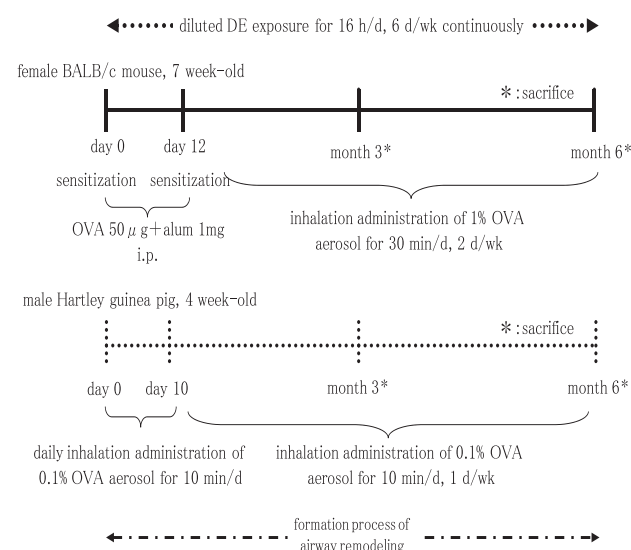


Fig. 2 Schedule of the long-term exposure experiment for guinea pig and mouse

実験動物には, 4週齢の雄性ハートレー系モルモットと7週齢の雌性BALB/cマウスを用いた. モルモットは, 3ヵ月目と6ヵ月目に気道過敏性評価としてPC120とAUC, BALF中の全炎症細胞数, 好酸球数, 肺中好酸球数, 血清中のOVA特異的抗体 (IgG1, IgE), Total IgE, および肺の細気管支平滑筋の厚さ (気道リモデリングに関与する組織変化の指標) を測定した^{13)~14)}. マウスは, 実験開始3ヵ月目と6ヵ月目に2.1項の短期曝露実験と同じ評価を実施した. マウス, モルモットのいずれの実験群とも, 各評価時期に8匹ずつを各種測定に供した.

なお, モルモットには, 致死性のアレルギー発作 (アナフィラキシ ショック) を防ぐため, 実験6日

目からOVAミスト曝露30分前に抗ヒスタミン薬（マレイン酸クロルフェニラミン）を投与した。

3. 結果

3.1 気道リモデリングモデルマウスを用いた短期DE曝露実験

各測定項目の変化をTable 1に整理した。その結果、①気道過敏性、BALF中好酸球数および好酸球に關与する各種サイトカイン、抗原特異的抗体産生に対するDE曝露の増悪作用は認められなかった、②抗原の吸入中止後において、濃度依存的に肺中ヒドロキシプロリンと、基底膜下の膠原線維沈着量の増加がみられ、気道リモデリングの回復過程への影響がみられた、③気道炎症や好酸球に關する指標では、高濃度群に比し高濃度除粒子群のほうが強い影響を示した。

Table 1 Changes of the biological indicators of asthma and/or airway remodeling on mice in the short-term exposure experiment

Mouse	low concentration group			high concentration group			high concentration without particles group		
	day 29	day 43	day 57	day 29	day 43	day 57	day 29	day 43	day 57
PC120	--	--	--	--	--	--	--	--	--
A/C	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total cells	--	--	--	--	--	--	--	○	○
Macrophages	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Lymphocytes	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Neutrophils	--	--	--	--	↑	--	--	○	●
Eosinophils	--	--	--	--	--	--	--	○	○
Eotaxin	--	--	--	--	--	--	--	○	○
IL-5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IL-4	--	--	--	--	--	●	--	○	○
IL-13	--	--	--	--	--	--	--	○	○
IFN-γ	--	--	--	↑	↑	↑	--	--	--
OVA-specific IgE	↓	--	--	↑	↑	↑	--	--	--
OVA-specific IgG1	--	--	--	--	--	--	--	○	○
OVA-specific IgG2a	--	--	--	--	--	--	--	○	○
TCF-β1	--	--	--	--	--	--	--	○	○
Hydroxyproline	--	--	↑	--	↑	↑	--	--	--
Colloid cell hyperplasia	///	///	///	///	///	///	///	///	///
Thickness of epithelium	///	///	///	///	///	///	///	///	///
Subepithelial fibrosis	///	///	///	///	///	///	///	///	●
Body weight	--	--	--	--	--	--	--	--	--

↑, ↓ : significant increase or decrease compared to the control group ($p < .05$)

○, ● : significant increase or decrease compared to the high concentration group ($p < .05$)

3.2 気道リモデリングモデルモルモットと感作マウスを用いた長期DE曝露実験

各測定項目の変化をTable 2に整理した。モルモットではすべての測定項目においてDE曝露の増悪作用は認められなかった。マウスでは、低濃度群と高濃度群の3ヵ月目でエオタキシンの有意な増加、6ヵ月目でIL-4の有意な減少がみられた以外、気道過敏性、気道炎症、好酸球数、抗原特異的抗体産生、組織学的変化に著しい影響は認められなかった。

Table 2 Changes of the biological indicators of asthma and/or airway remodeling on guinea pigs and mice in the long-term exposure experiment

Guinea pig	low concentration group		high concentration group		high concentration without particles group	
	month 3	month 6	month 3	month 6	month 3	month 6
PC120	--	--	↑	--	●	--
A/C	--	--	--	--	--	--
Total cells	--	--	--	--	--	--
Macrophages (BALF)	--	↓	--	↓	--	--
Neutrophils (BALF)	--	--	--	--	--	--
OVA-specific IgE	--	--	--	--	--	--
OVA-specific IgG1	--	--	--	--	--	--
Total IgE	--	--	--	--	--	--
Thickness of smooth muscle	--	--	--	--	--	--
Body weight	--	--	--	--	--	--

Legend are same as Table 1

Mouse	low concentration group		high concentration group		high concentration without particles group	
	month 3	month 6	month 3	month 6	month 3	month 6
PC120	--	--	--	--	--	--
A/C	--	--	--	--	--	--
Total cells	--	--	--	--	--	--
Macrophages	--	--	--	--	--	--
Lymphocytes	--	--	--	--	--	--
Neutrophils	--	--	--	--	--	--
Eosinophils	--	--	--	↓	--	--
Eotaxin	↑	--	↑	--	--	--
IL-5	--	--	--	--	--	--
IL-4	↑	↓	--	↓	--	●
IL-13	--	--	--	--	--	--
IFN-γ	--	--	--	--	--	--
OVA-specific IgE	--	--	--	--	--	--
OVA-specific IgG1	--	--	--	--	--	--
OVA-specific IgG2a	--	--	--	--	--	--
TCF-β1	--	--	--	--	--	--
Hydroxyproline	--	--	--	--	--	--
Colloid cell hyperplasia	--	--	--	--	--	--
Thickness of epithelium	--	--	--	--	--	●
Subepithelial fibrosis	--	--	--	--	--	--
Body weight	--	--	--	--	--	--

Legend are same as Table 1

4. 考察および結論

気道リモデリングモデル動物を用いた短期および長期DE曝露実験の結果は、以下の通りである。

①モルモットに対する気道リモデリング作出のための抗原投与条件（10日間連日0.1% OVAミスト吸入+1回/週/6ヵ月吸入）では、長期DE曝露の気道リモデリング形成に対する影響は認められなかった。

②マウスに対する気道リモデリング作出のための抗原投与条件（全身感作+3週間連日1% OVAミスト吸入）では、短期DE曝露で肺や基底膜下の線維化に増悪作用が認められたが、より現実的な抗原投与条件（全身感作+2回/週/6ヵ月吸入）による長期DE曝露では、気道リモデリング形成に対する著しい増悪作用は認められなかった。

これらの結果は、DE曝露が喘息と関連した病態の発症、増悪に影響を及ぼすというこれまでの多くの報告^{15)~19)}とは異なるものであった。そこで、過去30年近くのDEの成分を調べた結果、最新のデ

ディーゼルエンジンの排気では、規制物質および未規制物質とも大幅に低減されている事が今回の結果の要因の一つではないかと推測された¹⁾。

以上のことから、最新のディーゼルエンジン排気や抗原の現実的な曝露条件では、実験動物の気道リモデリング形成に対する増悪作用は少ないと考えられた。

謝 辞

本研究の実施にあたり、(独)国立病院機構相模原病院 秋山一男先生、岐阜薬科大学 永井博弼先生、田中宏幸先生、獨協医科大学 福田 健先生、相良博典先生に多大なご協力とご指導を賜り、ここに深謝致します。

参考文献

- 1) 前島一仁：大気汚染物質の健康影響に関して日米ではどんな研究が行われているか，自動車研究，Vol.29, No.5, p.195-199 (2007)
- 2) 文部科学省ホームページ：学校保健統計調査
- 3) 環境省ホームページ：大気汚染モニタリング実施結果
- 4) 環境省ホームページ：平成17年度 大気汚染に係る環境保健サーベイランス調査結果について
- 5) Tanaka, H. et al. : Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, p.62-68 (2004)
- 6) Nagai, H. et al. : Effect of anti-IL-5 monoclonal antibody on allergic bronchial eosinophilia and airway hyperresponsiveness in mice. *Life Sci.* 53, p.243-247 (1993)
- 7) Tanaka, H. et al. : The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm. Res.* 50, p.616-624 (2001)
- 8) Komai, M. et al. : Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Br. J. Pharmacol.* 138, p.912-920 (2003)
- 9) Tanaka, H. et al. : Time course study on the development of

allergen-induced airway remodeling in mice: the effect of allergen avoidance on established airway remodeling. *Inflamm. Res.* 51, p.307-316 (2002)

- 10) Tanaka, H. et al. : The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm. Res.* 50, p.616-624 (2001)
- 11) Kivirikko, K.L. et al. : Modification of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Annal. Biochem.* 19, p.249-255 (1967)
- 12) Hiyama, T. et al. : Airway remodeling in a guinea pig model of chronic asthma: Its influence on airway responsiveness and pharmacological properties of airway smooth muscle, and its prevention by corticosteroids. *Dokkyo J. Med. Sci.* 30, p.29-38 (2003)
- 13) Masuda et al. : Antigen Challenge-induced Expression of Amphiregulin by Mast Cells Increases Goblet-Cell Hyperplasia in a Mouse Model of Asthma, *Dokkyo Journal of Medical Sciences*, 33 (1), p.43-53 (2006)
- 14) Ota et al. : Airway Expression of Smad7, a TGF- β -inducible Inhibitory Molecule of TGF- β Signaling, Decrease after Repeated Airway Antigen Challenges, *Dokkyo Journal of Medical Sciences*, 31 (1), p.17-26 (2004)
- 15) Maejima, K. et al. : Effects of the inhalation of diesel exhaust, Kanto loam dust, or diesel exhaust without particles on immune responses in mice exposed to Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Inhal. Toxicol.* 13, p.1047-1063 (2001)
- 16) Takano, H. et al. : Diesel exhaust particles enhance airway responsiveness following allergen exposure in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 20, p.329-336 (1998)
- 17) Bice, D.E. et al. : Effects of inhaled diesel exhaust on immune responses after lung immunization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5, p.1075-1086 (1985)
- 18) Miyabara, Y. et al. : Effect of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, p.805-812 (1998)
- 19) Ichinose, T. et al. : Long-term exposure to diesel exhaust enhances the eosinophilic inflammation and epithelial damage in the airway induced by antigen. *Toxicol. Sci.* 44, p.70-79 (1997)