

ぜん息様病態モデルラットを用いたDPF装着・非装着における ディーゼル排出ガス30日間ばく露実験 —ディーゼル排出ガスの成分分析—

研究要旨

ディーゼル排出ガスばく露チャンバーにおいて、ラットのばく露濃度を確認するため、30日間ばく露実験の前後にチャンバー内ガスを採取し、揮発性有機化合物(VOC)、アルデヒド類、有機酸類、 $C_{17}\sim C_{20}$ アルカン及び多環芳香族炭化水素(PAH)、合計105物質を測定した。測定は粒子状物質減少装置(DPF)装着時及び非装着時に行い、DPFの有無による比較を行った。チャンバー内の二酸化炭素濃度より、排出ガスの希釈率を求めたところ、DPF装着時16倍、非装着19倍と求められた。測定の結果、DPF装着時に濃度の高かった物質は酢酸、ギ酸、アセトアルデヒドで、非装着時にはホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの濃度が高かった。検出されたガス状物質の濃度合計を比較すると、DPF装着時(ばく露群:1.7 mg/m³)は、非装着時(ばく露群:1.9 mg/m³)に比べて約10%濃度が低く、物質群別の比較では、DPF装着時は非装着時に比べて、有機酸類及びケトン類の濃度が高く、アルデヒド類の濃度が低かった。PAHでは、3環物質を除き、DPF装着時には非装着時に比べて濃度が低かったが、3環物質については、DPF装着時は非装着時の約2倍高濃度であった。PAH濃度合計を比較すると、DPF装着時(ばく露群:406 ng/m³)は非装着時(ばく露群:640 ng/m³)の2/3程度であった。

I 研究目的

ぜん息様病態モデルラットを用いた30日間ばく露実験におけるディーゼル排出ガスの濃度を確認するため、当センターのばく露チャンバーにおいて、揮発性有機化合物(VOC)、アルデヒド類、有機酸類、 $C_{17}\sim C_{20}$ アルカン及び多環芳香族炭化水素(PAH)を測定し、DPF(Diesel Particulate Filter)の有無による濃度比較を行った。

II 研究方法

1 ばく露チャンバー内ガスの採取

ばく露チャンバーは、コントロール群及びばく露に分かれており、これら2カ所の空気を採取した。DPF装着時は2011年9月～10月、DPF非装着時は2011年10月～11月に30日間ばく露実験を行い、それらの開始前及び終了後にガス採取を行って、各2回の結果を平均して測定値とした。なお、ガス採取は、チャンバー内にはラットがいない状態で行った。

また、採取に用いる捕集管は、物質群ごとに分

かれており、VOC、硫酸ジメチル及び硫酸ジエチル、アルデヒド類、有機酸類、 $C_{17}\sim C_{20}$ アルカン及びPAHについて、90日間ばく露と同様の方法で実施し、ばく露チャンバー内濃度を算出した。測定方法の詳細については、「ディーゼル排出ガス90日ばく露における排出ガスの成分分析」報告書を参照。

なお、ばく露チャンバー内の二酸化窒素(NO_2)及び粉塵濃度は、自動計測器により常時モニターされており、二酸化炭素(CO_2)濃度については、検知管(ガステック製)を用いて測定した。

III 結果

1 二酸化窒素、粉塵及び二酸化炭素の濃度

ばく露チャンバーにおいてガス採取を行った際のばく露群の NO_2 濃度は、DPF装着時:3.1ppm、非装着時:2.7ppmであり、DPFを装着した方が NO_2 濃度が高かった。また、粉塵濃度については、DPF装着時:0.79mg/m³、非装着時:2.0mg/m³で、DPF非装着の方が粉塵濃度は高く、これらの傾向

は90日間ばく露実験の時と共通であった。CO₂濃度については、DPF装着時:3,600ppm、非装着時:3,300 ppm であり、ばく露チャンバーへの排出ガスの導入量に若干差があったと考えられた。このCO₂濃度の結果より、大気中の二酸化炭素濃度を370ppmとして排出ガスの希釈率を計算すると、DPF装着時:16倍、非装着時:19倍と求められた。

2 VOC、アルデヒド類及び有機酸類の濃度

表1に DPF 装着時、表2に DPF 非装着時のVOC、アルデヒド類及び有機酸類の分析結果を示す。測定の結果、DPF 装着時に主に検出された物質は、酢酸(317 μg/m³)、ぎ酸(240 μg/m³)及びアセトアルデヒド(271 μg/m³)であった。一方、DPF 非装着時に濃度が高かった物質は、ホルムアルデヒド(616 μg/m³)、アセトアルデヒド(263 μg/m³)及び酢酸(177 μg/m³)であった。検出された物質の濃度合計値を比較すると、DPF 装着時では 1,660 μg/m³であったのに対し、DPF 非装着時では 1,850 μg/m³と、DPF 装着時の方が合計濃度が約 10%低かった。次に、検出された物質を構造別に、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、ハロゲン類、エステル類、アルコール類、有機酸類、アルデヒド類及びケトン類に分類し、構造別の合計濃度を算出した。DPF 装着の有無により比較した結果を図1に示す。なお、検出下限値未満の物質については濃度を「0」として計算した。DPF 装着の有無により濃度に差のみられた主な物質群は、アルデヒド類及び有機酸類であり、DPF 装着時には非装着時に比べて、アルデヒド類濃度は約 1/2、有機酸類濃度は約 2 倍と、DPF の装着によりアルデヒド類が減少し、有機酸が増加する傾向がみられた。

3 C₁₇~C₂₀アルカンの濃度

表3に DPF 装着時、表4に DPF 非装着時の C₁₇~C₂₀アルカンの分析結果を示す。これらのアルカンは、主にエンジンオイル由来と考えられるが、4物質の合計濃度は、DPF 装着時:87 μg/m³、非装着時:129 μg/m³であった。また、炭素数で比較すると、炭素数の大きい物質の方が、DPF 装着によ

る減少率が大きかった。

4 PAH 濃度

表5に DPF 装着時、表6に DPF 非装着時の PAH 分析結果を示す。DPF 装着時に濃度が高かった物質は、1,8-ナフタル酸無水物(113 ng/m³)及びアセナフテン(103 ng/m³)、一方、DPF 非装着時には、1,8-ナフタル酸無水物(276 ng/m³)及びピレン(47.4 ng/m³)の濃度が高かった。また、5環及び6環の PAH については、DPF 非装着時には検出されたが、DPF 装着時には検出されなかった。次に検出された物質を構造別に、3環、4環、5環、6環及び含酸素化合物に分類し、構造別の合計濃度を算出した。DPF 装着の有無により比較した結果を図2に示す。DPF 装着時では、3環の物質を除き、いずれの物質群も、非装着時に比べ濃度が低かった。しかし、3環の物質については、DPF 装着時の方が、非装着時に比べて約 2 倍高濃度であった。検出された PAH の濃度合計を用いた比較では、DPF 装着時(410 ng/m³)の方が、非装着時(640 ng/m³)の 2/3 の濃度であった。

IV 考察

30日間ばく露実験の測定結果では、90日間の測定結果と同様に、DPF 装着により、排出ガス中のアルデヒド類が減少して有機酸類が増加する傾向がみられた。また、有機酸以外に DPF 装着により増加した物質群はケトン類であり、90日ばく露実験においても同様の変化がみられたことから、酸化触媒の作用により、有機酸類・ケトン類といった、分子内に酸素を有する物質が増加することが明らかとなった。

また、PAH については、DPF 装着により 3環の物質濃度が増加していたが、この傾向は90日ばく露実験ではみられなかった。したがって、今後確認が必要と考えられるが、DPF 装着により、5環、6環の物質濃度が減少することを考え合わせると、酸化触媒により大きな環の物質が分解し、3環の物質濃度が増加した可能性も示唆された。

C₁₇～C₂₀ アルカンについては、30 日ばく露実験と90 日ばく露実験の濃度に差がみられ、DPF 装着時で約 7 倍、非装着時で約 10 倍、30 日ばく露実験における濃度の方が高かった。この理由としては、今回の 30 日間ばく露実験の開始前に、ディーゼルエンジンを新しいものに交換したことが考えられた。

ばく露期間中に DPF の再生は行われなかったため、実験期間中には DPF に徐々に有機物が蓄積したと考えられたが、今回の実験期間が 30 日間と比較的短期間であったことから、DPF の能力低下は 90 日ばく露実験に比べてそれほど顕著ではないと考えられた。DPF 装着時の測定において、ばく露実験前後の結果を比較すると、VOC 等の濃度合計値及びPAH 合計値は、いずれも 1.7 倍、粉塵濃度は 2.2 倍、実験開始前に比べて、実験終了後の測定値の方が高かった。なお、DPF 非装着時の測定では、ばく露実験前後の濃度に大きな差は見られず、VOC 等の濃度合計値、PAH 合計値、粉塵濃度の差は 0.8～1.3 倍の範囲であった。

DPF 装着により、排出ガス中での濃度増加が観察されたギ酸、酢酸は、粘膜への刺激性を有する物質である^{1,2)}が、作業環境における許容濃度は、ギ酸:9mg/m³、酢酸 25mg/m³と、ばく露チャンバーの濃度に比べると高濃度に設定されている。また、DPF 非装着時に濃度が高い、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドについても、同様に粘膜刺激作用を有するが^{3,4)}、作業環境における許容濃度は、ホルムアルデヒド:2.5 mg/m³、アセトアルデヒド:270 mg/m³と高濃度である。近年、ぜん息にかかわるメカニズムについて、TRP(Transient receptor potential)チャンネルと呼ばれる陽イオンチャンネルタ

ンパクについての研究が活発に行われている⁵⁾。TRP チャンネルのうち、TRPA1 と呼ばれるサブファミリーは、気管支ぜん息における気道の炎症及び過敏反応に関与し、その活性化により、咳嗽反射や気道炎症を起こすことが明らかになってきた⁶⁾。この活性化剤として、これまでに酸、ホルムアルデヒド、一酸化窒素等が報告されており⁵⁾、これらはいずれもディーゼル排出ガス中に含まれる物質であることから、DPF 装着の有無にかかわらず、ディーゼル排出ガスの吸入により、気道の炎症に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

V 文献

- 1) 東京消防庁警防研究会:危険物データブック 第2版、丸善、p168-p169、平成5年
- 2) 東京消防庁警防研究会:危険物データブック 第2版、丸善、p228-p229、平成5年
- 3) 東京消防庁警防研究会:危険物データブック 第2版、丸善、p518-p519、平成5年
- 4) 東京消防庁警防研究会:危険物データブック 第2版、丸善、p22-p23、平成5年
- 5) 沼田朋大、香西大輔、高橋重成、加藤賢太、瓜生幸嗣、山本伸一郎、金子雄、眞本達生、森泰生:TRP チャンネルの構造と多様な機能、生化学、81(11)、p962-983、2009
- 6) 塩谷隆信、佐藤一洋、佐野正明、渡邊博之:Transient receptor potential (TRP) チャンネルと咳嗽、日薬理誌、131、p417-422、2008

表1-1 DPF 装着ばく露チャンバーの VOC 及びアルデヒド類等分析結果 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 | |
|--------------------|-----------------|---------|-------|------|
| 脂肪族 炭化水素 | ヘキサン | 2.6 | 6.7 | |
| | ヘプタン | <0.50 | 4.1 | |
| | オクタン | 0.54 | 9.0 | |
| | ノン | 3.9 | 32.0 | |
| | デカン | 5.8 | 25.5 | |
| | ウンデカン | 3.6 | 10.5 | |
| | ドデカン | 2.3 | 6.7 | |
| | トリデカン | 2.3 | 5.1 | |
| | テトラデカン | 2.5 | 2.7 | |
| | ペンタデカン | <0.50 | 2.0 | |
| | ヘキサデカン | <0.50 | 2.0 | |
| | 2,4-ジメチルペンタン | <0.50 | <0.50 | |
| | 2,2,4-トリメチルペンタン | <0.50 | 2.3 | |
| | シクロヘキサン | <0.50 | 2.9 | |
| | メチルシクロヘキサン | <0.50 | 5.1 | |
| | ヘキセン | <0.50 | 29.8 | |
| | ヘプテン | <0.50 | 10.8 | |
| | オクテン | 0.52 | 5.8 | |
| | 芳香族 炭化水素 | ベンゼン | 1.0 | 51.8 |
| トルエン | | 11.2 | 32.8 | |
| キシレン | | 3.8 | 17.2 | |
| エチルベンゼン | | 5.7 | 11.2 | |
| スチレン | | <0.50 | 2.8 | |
| エチルトルエン | | 2.2 | 10.6 | |
| 1,3,5-トリメチルベンゼン | | 0.82 | 3.5 | |
| 1,2,4-トリメチルベンゼン | | 3.1 | 10.8 | |
| 1,2,3-トリメチルベンゼン | | 0.71 | 3.3 | |
| 1,2,4,5-テトラメチルベンゼン | | <0.50 | 0.56 | |
| p-シメン | | <0.50 | <0.50 | |
| 4-エチル-1,2-ジメチルベンゼン | | <0.50 | 0.97 | |
| ナフタレン | | <0.50 | 1.1 | |
| ハロゲン類 | | ジクロロメタン | 3.1 | 3.9 |
| | クロロホルム | 0.58 | 1.1 | |
| | 1,2-ジクロロエタン | <0.50 | <0.50 | |
| | 1,1,1-トリクロロエタン | <0.50 | <0.50 | |
| | 四塩化炭素 | <0.50 | 0.63 | |
| | 1,2-ジクロロプロパン | <0.50 | <0.50 | |
| | ブロモジクロロメタン | <0.50 | <0.50 | |
| | トリクロロエチレン | <0.50 | 0.91 | |
| | ジブromokロロメタン | <0.50 | <0.50 | |
| | テトラクロロエチレン | <0.50 | <0.50 | |
| | p-ジクロロベンゼン | 1.1 | 1.5 | |
| | ケトン類 | 2-ブタンオン | 1.9 | 39.0 |
| | | アセトン | 1.4 | 95.7 |
| 4-メチル 2-ペンタンオン | | <0.50 | 1.6 | |

表1-2 DPF 装着ばく露チャンバーのVOC及びアルデヒド類等分析結果 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 |
|---------|----------------|---------|-------|
| エステル類 | 酢酸エチル | 6.1 | 15.6 |
| | 酢酸ブチル | 0.79 | 1.6 |
| | 硫酸ジエチル | <0.50 | <0.50 |
| | 硫酸ジメチル | <0.50 | <0.50 |
| アルコール類 | エタノール | 3.3 | 4.5 |
| | 2-プロパノール | 0.56 | 3.4 |
| | 1-プロパノール | <0.50 | 0.50 |
| | ブタノール | 0.69 | 1.3 |
| | 2-エチル-1-ヘキサノール | <0.50 | 0.67 |
| 有機酸類 | ギ酸 | 8.0 | 240 |
| | 酢酸 | 7.8 | 317 |
| | プロピオン酸 | 1.0 | 28.2 |
| | ブタン酸 | <1.0 | 16.9 |
| | ペンタン酸 | <1.0 | 9.3 |
| | ヘキサン酸 | 1.6 | 4.8 |
| | ヘプタン酸 | <1.0 | 1.3 |
| | オクタン酸 | <1.0 | <1.0 |
| | ノナン酸 | <1.0 | <1.0 |
| | デカン酸 | <1.0 | <1.0 |
| | ウンデカン酸 | <1.0 | <1.0 |
| | ドデカン酸 | <1.0 | <1.0 |
| | 安息香酸 | <1.0 | 1.0 |
| | トリデカン酸 | <1.0 | <1.0 |
| | テトラデカン酸 | 1.2 | <1.0 |
| ペンタデカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| ヘキサデカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| アルデヒド類 | ホルムアルデヒド | 3.0 | 178 |
| | アセトアルデヒド | 3.9 | 271 |
| | プロピオンアルデヒド | <0.50 | 30.8 |
| | クロトンアルデヒド | <0.50 | 15.6 |
| | ブチルアルデヒド | <0.50 | 14.6 |
| | ベンズアルデヒド | <0.50 | <0.50 |
| | バレラルデヒド | <0.50 | <0.50 |
| | ヘキサアルデヒド | <0.50 | 13.5 |
| | ノナール | <0.50 | 0.82 |
| | デカール | <0.50 | <0.50 |
| | アクロレイン | <0.50 | 38.9 |
| | メタクロレイン | <0.50 | <0.50 |
| | 濃度合計値* | 99.1 | 1,660 |

*: 検出された物質の濃度合計値を表す。定量下限値未満の物質は「0」として数値を算出した。

表2-1 DPF 非装着ばく露チャンバーの VOC 及びアルデヒド類等分析結果 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 | |
|------|--------------------|---------|-------|-----|
| 脂肪族 | ヘキサン | 3.1 | 9.2 | |
| | 炭化水素 | | | |
| | ヘプタン | <0.50 | 4.1 | |
| | オクタン | 0.55 | 5.9 | |
| | ノン | 2.7 | 23.5 | |
| | デカン | 4.3 | 16.4 | |
| | ウンデカン | 2.2 | 8.9 | |
| | ドデカン | 2.4 | 3.3 | |
| | トリデカン | 2.0 | 2.3 | |
| | テトラデカン | 0.71 | 1.1 | |
| | ペンタデカン | <0.50 | 0.76 | |
| | ヘキサデカン | <0.50 | 0.84 | |
| | 2,4-ジメチルペンタン | <0.50 | 3.8 | |
| | 2,2,4-トリメチルペンタン | <0.50 | 2.8 | |
| | シクロヘキサン | <0.50 | 7.7 | |
| | メチルシクロヘキサン | 0.62 | 10.4 | |
| | ヘキセン | <0.50 | 46.4 | |
| | ヘプテン | <0.50 | 15.0 | |
| | オクテン | 0.65 | 6.2 | |
| 芳香族 | ベンゼン | 0.85 | 64.2 | |
| 炭化水素 | トルエン | 6.2 | 22.9 | |
| | キシレン | 2.8 | 10.1 | |
| | エチルベンゼン | 3.1 | 6.0 | |
| | スチレン | 1.0 | 2.5 | |
| | エチルトルエン | 2.8 | 10.4 | |
| | 1,3,5-トリメチルベンゼン | 1.1 | 3.5 | |
| | 1,2,4-トリメチルベンゼン | 3.8 | 11.7 | |
| | 1,2,3-トリメチルベンゼン | 0.80 | 2.8 | |
| | 1,2,4,5-テトラメチルベンゼン | <0.50 | <0.50 | |
| | p-シメン | <0.50 | <0.50 | |
| | 4-エチル-1,2-ジメチルベンゼン | <0.50 | 0.53 | |
| | ナフタレン | <0.50 | 0.76 | |
| | ハロゲン類 | ジクロロメタン | 2.2 | 2.3 |
| | | クロホルム | 0.92 | 1.1 |
| | 1,2-ジクロロエタン | <0.50 | <0.50 | |
| | 1,1,1-トリクロロエタン | <0.50 | <0.50 | |
| | 四塩化炭素 | <0.50 | 0.69 | |
| | 1,2-ジクロロプロパン | <0.50 | <0.50 | |
| | ブromoジクロロメタン | <0.50 | <0.50 | |
| | トリクロロエチレン | <0.50 | 0.86 | |
| | ジブromoクロロメタン | <0.50 | <0.50 | |
| | テトラクロロエチレン | <0.50 | <0.50 | |
| | p-ジクロロベンゼン | 1.1 | 1.4 | |
| ケトン類 | 2-ブタンオン | 1.9 | 20.9 | |
| | アセトン | 2.7 | 74.1 | |
| | 4-メチル 2-ペンタンオン | <0.50 | 0.76 | |

表2-2 DPF 非装着ばく露チャンバーの VOC 及びアルデヒド類等分析結果 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 | |
|---------|----------------|---------|-------|-------|
| エステル類 | 酢酸エチル | 4.0 | 13.3 | |
| | 酢酸ブチル | 0.90 | 1.4 | |
| | 硫酸ジエチル | <0.50 | <0.50 | |
| | 硫酸ジメチル | <0.50 | <0.50 | |
| アルコール類 | エタノール | 2.8 | 7.3 | |
| | 2-プロパノール | 0.67 | 1.6 | |
| | 1-プロパノール | <0.50 | 0.58 | |
| | ブタノール | 1.4 | 3.9 | |
| | 2-エチル-1-ヘキサノール | <0.50 | <0.50 | |
| 有機酸類 | ギ酸 | <5.0 | 160 | |
| | 酢酸 | 3.8 | 177 | |
| | プロピオン酸 | <1.0 | 13.1 | |
| | ブタン酸 | <1.0 | 5.1 | |
| | ペンタン酸 | <1.0 | 3.3 | |
| | ヘキサン酸 | <1.0 | 1.3 | |
| | ヘプタン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | オクタン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | ノナン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | デカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | ウンデカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | ドデカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | 安息香酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | トリデカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | テトラデカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| | ペンタデカン酸 | <1.0 | <1.0 | |
| ヘキサデカン酸 | <1.0 | <1.0 | | |
| アルデヒド類 | ホルムアルデヒド | 5.4 | 616 | |
| | アセトアルデヒド | 3.0 | 263 | |
| | プロピオンアルデヒド | <0.50 | 40.8 | |
| | クロトンアルデヒド | <0.50 | 14.8 | |
| | ブチルアルデヒド | <0.50 | 39.7 | |
| | ベンズアルデヒド | <0.50 | <0.50 | |
| | バレールアルデヒド | <0.50 | <0.50 | |
| | ヘキサアルデヒド | <0.50 | 1.7 | |
| | ノナール | <0.50 | 0.82 | |
| | デカール | <0.50 | <0.50 | |
| | アクロレイン | <0.50 | 74.7 | |
| | メタクロレイン | <0.50 | <0.50 | |
| | 濃度合計値* | | 72.5 | 1,850 |

*: 検出された物質の濃度合計値を表す。定量下限値未満の物質は「0」として数値を算出した。

表3 DPF 装着ばく露チャンバーの C₁₇~C₂₀ アルカン分析結果 μg/m³

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 |
|---------------------------------------|--------|---------|------|
| C ₁₇ ~C ₂₀ アルカン | ヘプタデカン | 0.31 | 21.6 |
| | オクタデカン | 0.30 | 26.3 |
| | ノナデカン | <0.10 | 27.1 |
| | エイコサン | <0.10 | 12.0 |
| | 濃度合計値* | 0.61 | 87.1 |

*: 検出された物質の濃度合計値を表す。定量下限値未満の物質は「0」として数値を算出した。

表4 DPF 非装着ばく露チャンバーの C₁₇~C₂₀ アルカン分析結果 μg/m³

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 |
|---------------------------------------|--------|---------|------|
| C ₁₇ ~C ₂₀ アルカン | ヘプタデカン | 0.22 | 20.1 |
| | オクタデカン | 0.19 | 33.8 |
| | ノナデカン | <0.10 | 48.9 |
| | エイコサン | <0.10 | 26.4 |
| | 濃度合計値* | 0.41 | 129 |

*: 検出された物質の濃度合計値を表す。定量下限値未満の物質は「0」として数値を算出した。

表5 DPF 装着ばく露チャンバーの PAH 分析結果 ng/m³

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 |
|---------------|-----------------|---------|-------|
| 多環芳香族 炭化水素 | アセナフレン | <0.50 | 5.3 |
| | アセナフテン | 5.8 | 103 |
| 3 環 | フルオレン | 3.3 | 38.4 |
| | フェナンスレン | 4.9 | 66.6 |
| | アントラセン | <0.50 | 2.2 |
| | フルオランテン | <0.50 | 12.3 |
| | ピレン | <0.50 | 24.7 |
| 4 環 | ベンゾ(a)アントラセン | <0.50 | <0.50 |
| | クリセン | <0.50 | 5.8 |
| | ベンゾ(b)フルオランテン | <0.50 | <0.50 |
| 5 環 | ベンゾ(k)フルオランテン | <0.50 | <0.50 |
| | ベンゾ(a)ピレン | <0.50 | <0.50 |
| | ジベンゾ(ah)アントラセン | <0.50 | <0.50 |
| 6 環 | インデノ(123-cd)ピレン | <0.50 | <0.50 |
| | ベンゾ(ghi)ペリレン | <0.50 | <0.50 |
| 含酸素 | アントラキノン | <0.50 | 34.0 |
| | フェナンチレン | <0.50 | <0.50 |
| | 1,8-ナフタル酸無水物 | <0.50 | 113 |
| | 濃度合計値* | 13.9 | 406 |

*: 検出された物質の濃度合計値を表す。定量下限値未満の物質は「0」として数値を算出した。

表6 DPF 非装着ばく露チャンバーの PAH 分析結果 ng/m³

| | 物質名 | コントロール群 | ばく露群 |
|---------------|-------------------|---------|------|
| 多環芳香族 炭化水素 | アセナフレン | <0.50 | 3.9 |
| | アセナフテン | 2.93 | 39.9 |
| 3環 | フルオレン | 2.15 | 24.8 |
| | フェナンスレン | 3.57 | 43.4 |
| | アントラセン | <0.50 | 1.6 |
| | フルオランテン | <0.50 | 18.3 |
| | ビ°レン | <0.50 | 47.4 |
| 4環 | ベンゾ°(a)アントラセン | <0.50 | 19.1 |
| | クリセン | <0.50 | 26.6 |
| | ベンゾ°(b)フルオランテン | <0.50 | 19.1 |
| | ベンゾ°(k)フルオランテン | <0.50 | 19.0 |
| 5環 | ベンゾ°(a)ビ°レン | <0.50 | 16.7 |
| | ジ°ベンゾ°(ah)アントラセン | <0.50 | 7.5 |
| | インデ°ノ(123-cd)ビ°レン | <0.50 | 5.8 |
| 6環 | ベンゾ°(ghi)ペ°リレン | <0.50 | 9.3 |
| 含酸素 | アントラキノ | <0.50 | 34.8 |
| | フェナントラキノ | <0.50 | 26.9 |
| | 1,8-ナフタル酸無水物 | <0.50 | 276 |
| | 濃度合計値* | 8.6 | 640 |

*：検出された物質の濃度合計値を表す。定量下限値未満の物質は「0」として数値を算出した。

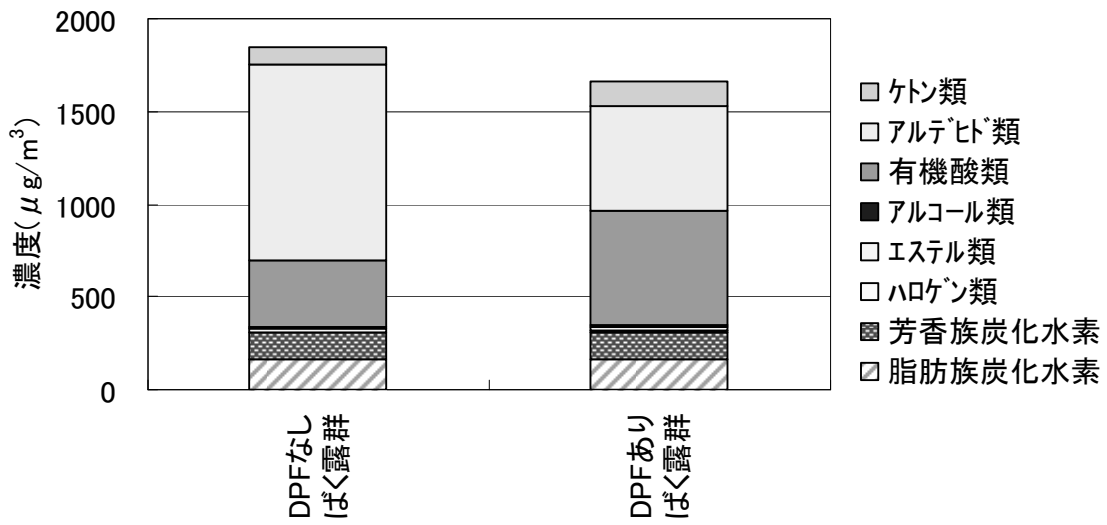


図1 DPF 装着の有無によるディーゼルばく露チャンバー内 VOC 及びアルデヒド濃度の比較

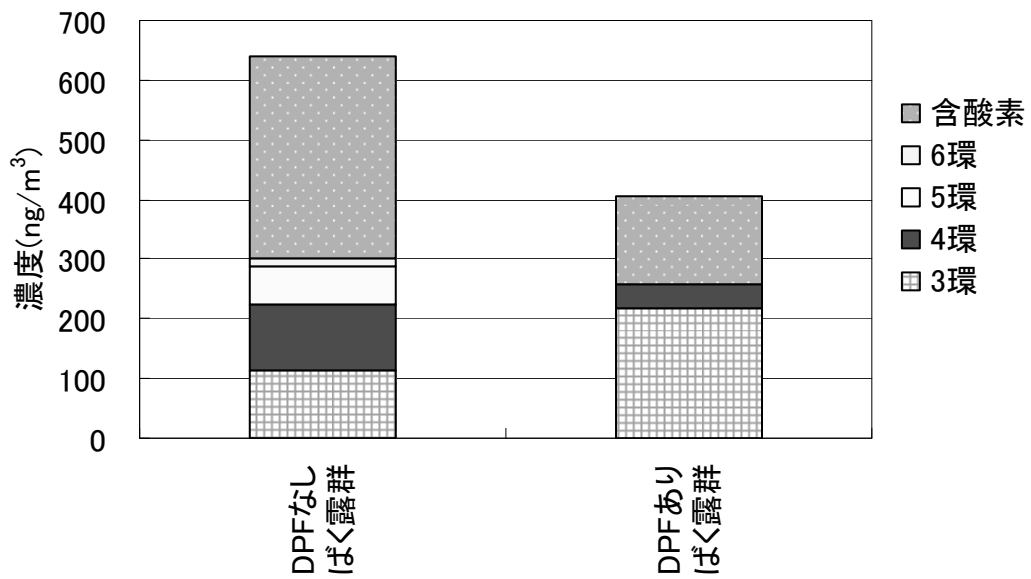


図2 DPF 装着の有無によるディーゼルばく露チャンバー内 PAH 濃度の比較

ぜん息様病態モデルラットを用いた DPF 装着・非装着時における
ディーゼル排出ガス30日間ばく露実験
—動物実験—

はじめに

DPF装着時及び非装着時のディーゼル排出ガスがぜん息患者の症状を増悪させるか否かについて、動物実験により比較検討した。この実験では、ラットに抗原を感作させることでぜん息様病態モデル動物を作製し、DPF装着・非装着時のディーゼル排出ガスを吸入ばく露させた際の主として呼吸器系への影響を、病理組織学的、血清生化学、血液学、免疫学的試験及び生化学的試験により検討した。

ア 病理組織学的検討

実験方法

1. ぜん息様病態モデルラットの作製

感作動物は、8週齢の F344 ラットに卵白アルブミン(OVA)1mg を生理食塩水 1ml に溶解し、ラット当たり1mlを毎日1回腹腔内に2日間連続投与した。アジュバントには硫酸アルミニウム(alum)を用い、OVA 投与初回時のみ1回投与した。その後、3週間空けて、再度 OVA2%溶液をネブライザーにて1回15分間、3日間ばく露させ、ぜん息様病態モデル動物とした。

実験群は、DPF 装着 (DPF あり) 及び非装着 (DPF なし) のいずれの実験においても感作 (ぜん息様病態モデル) 動物と無感作 (非モデル) 動物にディーゼル排出ガス (排ガス) を各々ばく露させた群、及び感作動物と無感作動物に清浄空気を各々ばく露させた群の4群を設けた。動物数は各群 20 匹とした。

ディーゼル排出ガスのばく露は、動物の初回感作直後から開始し、1日6時間、週5日間で30日間行った。動物は再感作 (チャレンジ) 終了から1

週間後に解剖した。

2. 病理組織標本作成

各群 10 匹について、組織標本を作成し、組織学的観察を行った。解剖時、各臓器を摘出、秤量後、緩衝ホルマリン (pH7.4) で固定後、常法によりパラフィン包埋切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、組織観察を行った。肺重量は、肺を気管とともに摘出、秤量後、気管より固定液を注入、再膨張させた後、気管重量を減じた値を肺重量とした。秤量臓器 (表) の他、鼻腔、縦隔リンパ節、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎についても組織観察を行った。鼻腔は固定、脱灰した後、I ; 切歯乳頭部 (呼吸上皮) 及び II ; 第一臼歯部 (嗅上皮) の2ヶ所の横断組織について、パラフィン包埋切片を作成した。

結果

DPF 非装着 (DPF なし) または DPF 装着 (DPF あり) 時の実験において、1群 (清浄空気群)、2群 (排ガスばく露群)、3群 (清浄空気 + OVA 感作群) 及び4群 (排ガス曝露 + OVA 感作) の各群の結果について、以下の順で比較し、OVA 感作動物における、排ガスばく露の影響の有無を検討した。

①1群と2群の比較; 排ガス曝露のみの影響の有無の観察、②1群と3群の比較; OVA 感作のみの作用の観察、③2群と4群の比較; 排ガスばく露ラットに対する OVA 感作の作用の観察、④3群と4群の比較; OVA 感作ラットに対する排ガスばく露の影響の有無。

1. 体重

解剖時体重は、DPF (なし) では、3群で1群と比べて、また4群では1、2群及び3群と比べて有意に

小さかった。DPF(あり)では4群で、1群及び2群と比べて有意に小さかった(表1)。DPD(あり)では3群と4群間では有意な差はなかった。

2. 臓器重量

DPF(なし)と(あり)に分けて、それぞれ表に示した。DPF(なし)では、副腎(右)重量が1群と比べて、2群で有意な増加、4群で増加傾向を示した。その他、胸腺、脾臓、脳、腎、精巣、心、肝臓で1群に比べて、2、3及び4群で実重量または体重比重量の変動が見られたが、これらはいずれも体重の変化に関連した、変化と考えられた(表2、3)。

DPF(あり)では、副腎重量が1群と比べて、2、3及び4群で、有意な増加または増加傾向を示した。その他、脾臓、肺、脳、肝臓で実重量または体重比重量の変動が見られたが、これらはいずれも体重の変化に関連した、変化と考えられた(表4、5)。

DPFの有無に関わらず、副腎重量の増加またはその傾向が2、3、4群でみられた。副腎重量増加は排ガスばく露、OVA 感作またはその両者による影響が考えられたが、各群間では差は明らかでなかった。

3. 肉眼所見

DPF(なし)では、1群と比べて2群及び4群では、肺表面の色が、全葉にわたって、やや灰色を呈していた。DPF(あり)では、DPF(なし)に比べて、その程度が軽度であった(図1、2)。また3群ではDPF(なし)またはDPF(あり)ともに、1群とほぼ同様であった(図1、2)。

4. 病理組織所見

排ガスばく露時 DPF(なし)と DPF(あり)の各群の観察は、いずれも同様であり、本報告ではDPF(なし)の実験結果を中心に記載した。

鼻腔の組織像：鼻腔はⅠ呼吸上皮、Ⅱ嗅上皮が存在する2ヶ所の部位について観察した。

部位Ⅰ(呼吸上皮)と部位Ⅱ(嗅上皮)では、粘膜上皮における好酸球の浸潤、杯細胞の増加および各上皮細胞変性等の変化は認められなかつ

た(表6)。また各部位の上皮細胞の厚さ(高さ)も、1群と2、3及び4群間では顕著な差はなかった(表7)。鼻腔の組織変化はDPF(あり)においても同様であった。

気管及び気管支：気管は気管支部を含め、気管を上部(部位Ⅰ)及び下部(部位Ⅱ)と気管支部(部位Ⅲ)の3部位について観察した。

1群と比べて2、3および4群では、各部位における粘膜上皮下組織や上皮細胞間における好酸球浸潤、杯細胞の増加等の変化は認められなかった。(図5、表6)。また各部位の上皮細胞高は1群と2、3及び4群間で差は認められなかった(表7)。

以上の気管粘膜上皮の変化は、DPF(あり)の場合でも、同様に認められた(表6、7)。

肺泡領域：1群に比べて2群と4群では肺胞内にディーゼル排ガスに由来する黒色粒子を貪食した大食細胞がほぼ組織全体にわたって散在性に見られた。表7に示すように肺内の大食細胞数は、DPFなしで1群に比べて4群で有意に多かったが、1、2群間及び2、4群間では差はみとめられないことから、OVA と排ガスばく露の相互作用によって増加したかは不明である。DPF(あり)でも同様に大食細胞は散在性に見られるが、DPF(なし)に比べて大食細胞の胞体中の黒色粒子の密度が低く、肉眼所見と一致していて、排ガス粒子に対してDPF装着は有効であることを示している。

OVA 感作による作用として、軽度な血管周囲の好酸球の浸潤が3及び4群の全例に認められた。その程度や発現頻度には、3、4群間で顕著な差はなく、排ガスばく露による影響は明らかでなかった。(図5、表6)。以上の変化はDPF(あり)3、4群においても、同様であった(表6)。そのほか1群と2、3及び4群に共通した変化として、肺胞内における大食細胞の集簇、肺胞壁における炎症細胞の浸潤、肺胞上皮細胞の腫大、軽度線維化等の変化からなる炎症性病変が各群で、近位部または胸膜下の肺泡領域に単発性に認められた。排ガスばく露やOVA 感作によってその程度や発現頻度の

増加は認められなかった。

考察

OVA感作したF344ラットを用い、DPF非装着時(DPFなし)及び装着時(DPFあり)ディーゼル排ガスの呼吸器系に対する免疫過敏性作用の有無について病理組織学的に検討した。

DPF(なし)の3及び4群、DPF(あり)の4群における体重の減少はOVA感作および排ガスばく露+OVA感作による影響が考えられる。また副腎はDPF(あり)・(なし)で2,3及び4群で重量増加が見られており、排ガスばく露やOVA感作またはOVAチャレンジ等のばく露の生体作用が考えられる。

いくつかの臓器で重量変化が見られたが、副腎以外は体重の変動に伴ったものと考えられた。DPF(あり)では体重の減少の程度が、DPF(なし)に比べて強く、このことがDPF(あり)の2,3,4群において重量変化を示した臓器が多かったことと関連していると思われる。

3群(OVA感作群)及び4群(OVA感作群+排ガスばく露)では肺内の血管周囲における軽度な好酸球の浸潤が認められたが、その程度や発現頻度は排ガスばく露によって、顕著に強められることはなかった。また鼻腔及び気管粘膜における好酸球浸潤の程度にも変化は認められなかった。また1群及び2,3,4群に共通して認められた自然発生性の炎症性病変も、排ガスばく露やOVA感作またはその両者によって、その程度や発現頻度は顕著な変化は認められなかった。2,3及び4群における肺重量に変化がなかったことも、以上の肺の組織変化の状況を反映していると思われる。OVA感作およびチャレンジによって、ぜん息様病変の組織学的指標のひとつである好酸球浸潤は認められたが、肺内の血管に限って認められた変化であり、気道系における作用は認められなかった。

ディーゼル排ガスの免疫学的過敏性の亢進作用の有無については、組織学的に3及び4群間で差がないことから、排ガスばく露の作用は今回の実

験条件下では明らかでなかった。

今回の実験では、排ガスばく露期間は30日間と短かった。排ガスばく露の影響が明らかでなかったことに関しては、ばく露期間の影響や今回設定したばく露濃度が低く、抗原性が発現しなかった可能性も考えられる。

5. まとめ

OVA感作したF344ラットにDPF非装着または装着時のディーゼル排ガスの吸入ばく露を行い、OVA感作による呼吸器系反応に対する排ガスの影響を調べた。

①体重、副腎重量に排ガスばく露およびOVA感作等の影響が認められた。副腎以外の臓器では重量変化と各処置との関連は明らかでなかった。

②OVA感作及びチャレンジによって肺の血管周囲における好酸球の浸潤が認められたが、気道系における作用は認められなかった。

③OVA感作によって誘発された肺の組織変化は、DPF(なし)、(あり)に関わらず排ガスばく露によって影響されなかった。

④今回の実験条件下では、ディーゼル排ガスによる呼吸器系の過敏性反応の誘発は明らかでなかった。

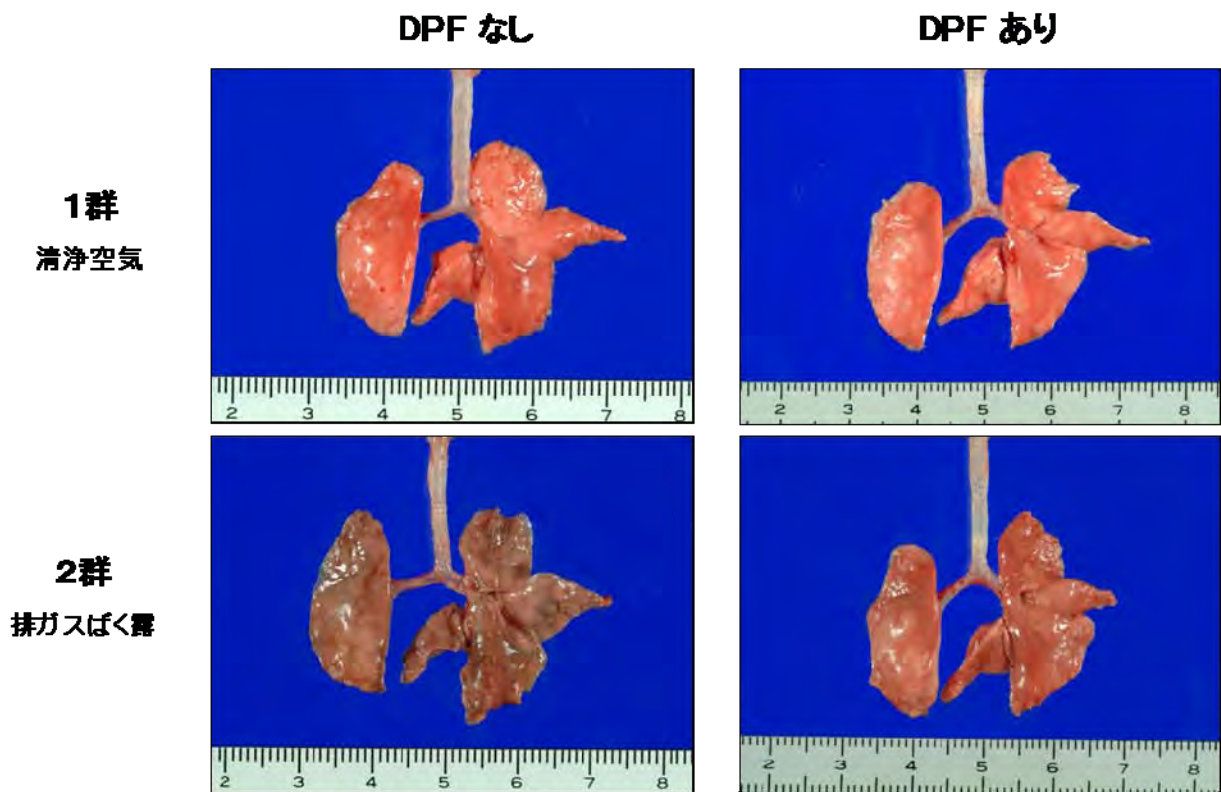


図1. ディーゼル排ガスばく露ぜん息モデル F344 ラットの肺 肉眼像ー1

2群では、肺全葉で表面の色が、1群と比べて、ほぼ全体的に、灰色を呈していた。DPF ありでは、DPF なしの比べて、程度は弱かった。

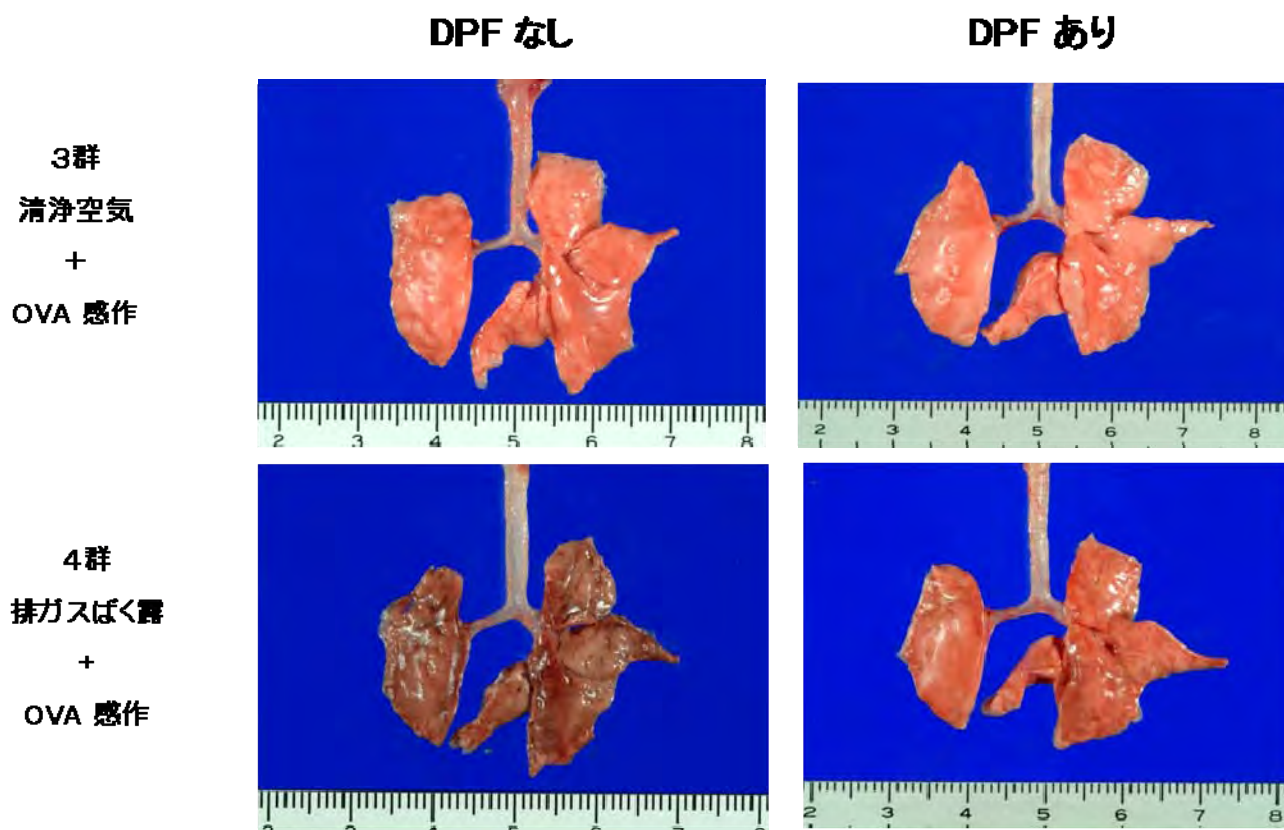


図2. ディーゼル排ガスばく露ぜん息モデル F344 ラットの肺 肉眼像-2

3群では、1及び4群と比べて、肺全葉で表面の色が、ほぼ全体的に、灰色を呈していた。その程度(灰色の濃さ)は、2群と同様であり、また DPF ありでは、DPF なしに比べて、程度は弱かった。

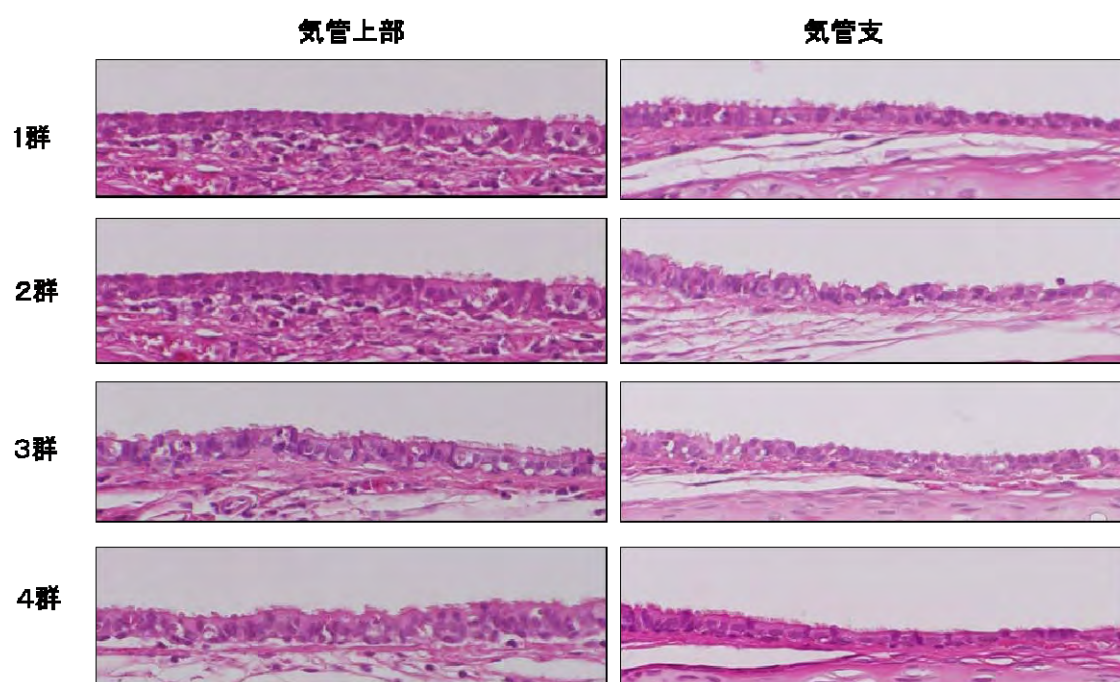


図3.気管上部及び気管支(DPFなし)の組織像. H&E x200

1群と比べて2, 3及び4群で, 顕著な変化は認められない.

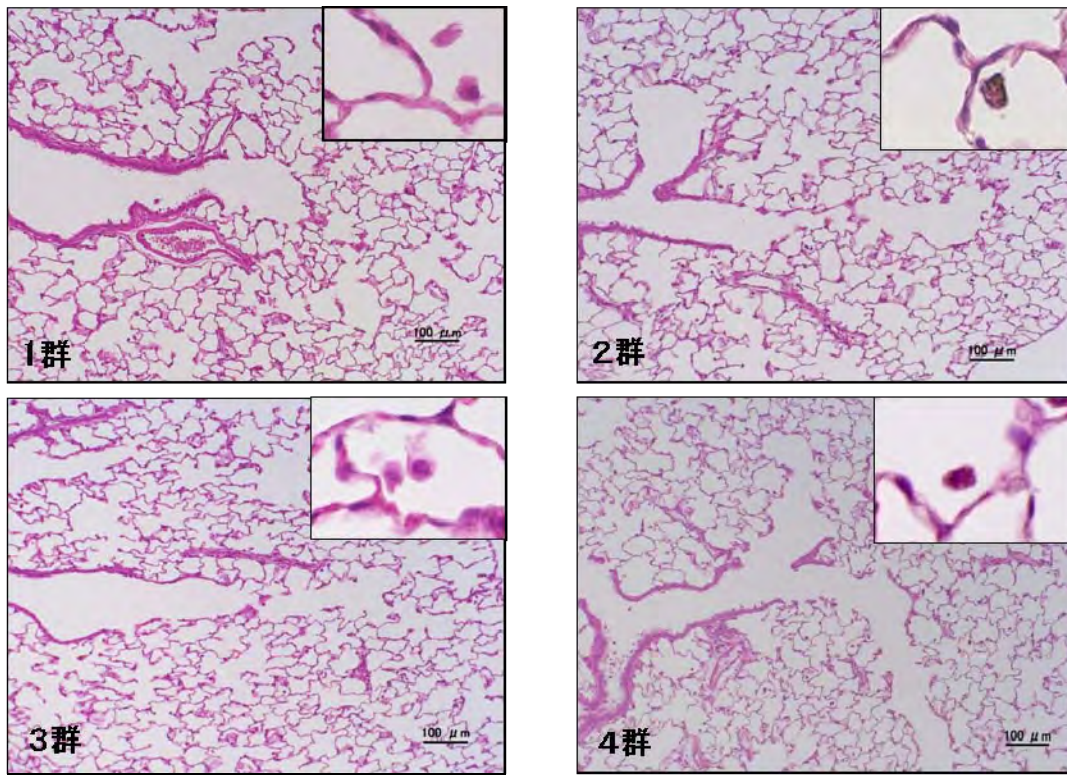


図4. 終末細気管支～肺胞領域の組織像(DPFなし). H&E x100 (挿入図 x400)

肺実質には顕著な変化は見られない. 2及び4群では肺胞腔に黒色の排ガス粒子を貪食した大食細胞が見られる.

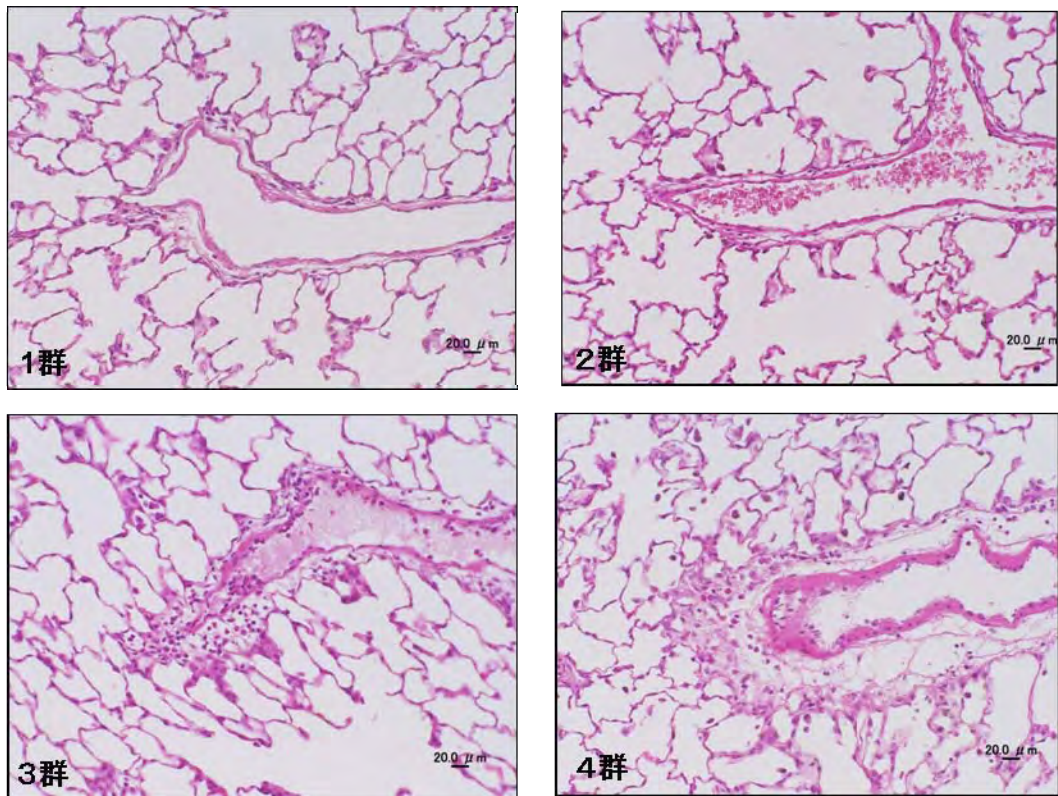


図 5. 肺内血管周囲(間質)における好酸球浸潤 (DPF なし) . H&E x200

1及び2群に比べて3及び4群では好酸球の軽度な浸潤が見られる。

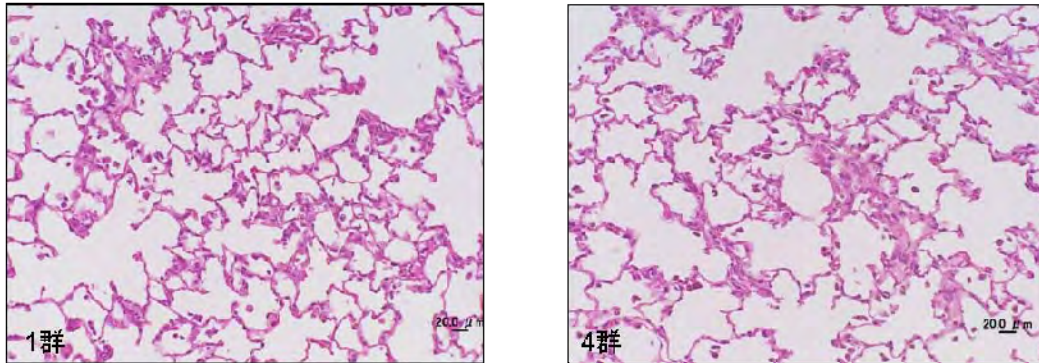


図 6. 肺胞領域における炎症性病変（1群と4群, DPF なし）H&E x200

大食細胞の集簇、炎症性細胞の浸潤、肺胞上皮細胞の腫大及び軽度増生による肺胞壁の肥厚。

この病変は, DPF あり・なしに関わらず, 1群~4群で散発的に見られ, 排ガスばく露や OVA 感作またはその両者によっても程度や発現頻度には顕著な差はなかった。

表 1. 実験開始時及び解剖時の体重

| 実験群 | DPF なし | | | | DPF あり | | | |
|------------------|-----------|-----------------------|-----------|------------------|-----------|------------------------|-----------|--------------|
| | 開始時 | | 解剖時 | | 開始時 | | 解剖時 | |
| | 測定 動物数 | 体重 | 測定 動物数 | 体重 | 測定 動物数 | 体重 | 測定 動物数 | 体重 |
| 1群 清浄空気 | 10 | 163 ± 2 ^{a)} | 10 | 245 ± 14 | 10 | 164 ± 26 ^{a)} | 10 | 256 ± 11 |
| 2群 排ガスばく露 | 10 | 170 ± 3 | 10 | 235 ± 8 | 10 | 181 ± 3 | 10 | 259 ± 10 |
| 3群 清浄空気 +OVA感作 | 10 | 162 ± 6 | 10 | 230 ± 10 * | 10 | 179 ± 3 | 10 | 247 ± 7 |
| 4群 排ガスばく露 +OVA感作 | 10 | 160 ± 4 | 10 | 213 ± 7 **,#,#\$ | 10 | 176 ± 3 | 10 | 242 ± 11 * # |

a) 平均値±SD,

* p<0.05, ** p<0.01 vs. 1群, # p<0.05, ## p<0.01 vs. 2群 \$\$ p<0.01 vs.3群

表 2. DPF なし 臓器重量-1

| 秤量臓器 | 実験群 | | | |
|-------|---------------------------|----------------|-----------------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | 清浄空気 | 排ガスばく露 | 清浄空気 + OVA感作 | 排ガスばく露 + OVA感作 |
| | 10 ^{a)} | 10 | 10 | 10 |
| 副腎(左) | 17.2 ± 1.6 ^{b)} | 18.9 ± 2.0 | 17.9 ± 1.8 | 18.8 ± 2.2 |
| | 7.02 ± 0.72 ^{c)} | 8.07 ± 0.89 | 7.76 ± 0.58 | 8.8 ± 1.0 ** |
| 副腎(右) | 15.5 ± 1.4 | 17.9 ± 2.0 * | 15.7 ± 1.5 # | 17.3 ± 0.8 |
| | 6.33 ± 0.48 | 7.61 ± 0.78 ** | 6.83 ± 0.52 # | 8.13 ± 0.49 ** \$\$ |
| 胸腺 | 203 ± 21 | 184 ± 17 | 193 ± 14 | 167 ± 18 ** \$ |
| | 83 ± 9 | 78 ± 6 | 84 ± 5 | 78 ± 6 |
| 脾臓 | 543 ± 26 | 517 ± 22 | 543 ± 44 | 505 ± 30 |
| | 222 ± 9 | 220 ± 7 | 236 ± 17 | 237 ± 13 # |
| 肺 | 804 ± 33 | 796 ± 45 | 816 ± 76 | 760 ± 65 |
| | 329 ± 23 | 339 ± 14 | 354 ± 23 | 356 ± 22 |
| 脳 | 1856 ± 39 | 1873 ± 27 | 1823 ± 46 | 1814 ± 30 # |
| | 760 ± 40 | 798 ± 17 * | 793 ± 29 | 850 ± 22 **, ##, \$\$ |

a) 動物数 b)絶対重量 (mg), 平均値±SD, c) 相対重量 (mg/100g 体重)

* p<0.05, ** p<0.01 vs. 1群, # p<0.05, ## p<0.01vs. 2群, \$ p<0.05, \$\$ p<0.01 vs 3群

表 3. DPF なし 臓器重量-2

| 秤量臓器 | 実験群 | | | |
|-------|------------------------|-------------|-----------------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | 清浄空気 | 排ガスばく露 | 清浄空気 + OVA感作 | 排ガスばく露 + OVA感作 |
| | 10 ^{a)} | 10 | 10 | 10 |
| 腎臓(左) | 815 ± 42 ^{b)} | 772 ± 28 | 747 ± 47 ** | 715 ± 29 ** # |
| | 333 ± 11 ^{c)} | 329 ± 6 | 325 ± 13 | 335 ± 15 |
| 腎臓(右) | 795 ± 56 | 751 ± 35 | 737 ± 64 | 711 ± 33 ** |
| | 325 ± 15 | 320 ± 7 | 320 ± 20 | 333 ± 17 |
| 精巣(左) | 1399 ± 46 | 1408 ± 68 | 1367 ± 43 * | 1366 ± 52 |
| | 572 ± 24 | 600 ± 28 | 595 ± 21 | 638 ± 28 # \$ |
| 精巣(右) | 1340 ± 58 | 1371 ± 55 | 1350 ± 45 | 1328 ± 41 |
| | 548 ± 17 | 584 ± 16 ** | 587 ± 20 ** | 623 ± 25 **, ##, \$\$ |
| 心臓 | 717 ± 34 | 686 ± 33 | 692 ± 52 | 652 ± 23 |
| | 293 ± 15 | 292 ± 10 | 300 ± 11 | 306 ± 12 |
| 肝臓 | 8760 ± 521 | 8300 ± 353 | 8187 ± 499 * | 7816 ± 305 ** |
| | 3578 ± 107 | 3535 ± 63 | 3556 ± 138 | 3661 ± 123 |

a) 動物数 b)絶対重量 (mg), 平均値±SD, c) 相対重量(mg/100g 体重)

* p<0.05, ** p<0.01 vs. 1群, # p<0.05, ## p<0.01 vs. 2群, \$ p<0.05, \$\$ p<0.01 vs 3群

表 4. DPF あり 臓器重量-1

| 秤量臓器 | 実験群 | | | |
|-------|---------------------------|---------------|------------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | 清浄空気 | 排ガスばく露 | 清浄空気 + OVA感作 | 排ガスばく露 + OVA感作 |
| | 10 ^{a)} | 10 | 10 | 10 |
| 副腎(左) | 17.8 ± 1.5 ^{b)} | 20.1 ± 1.5 * | 19.0 ± 0.9 | 19.9 ± 1.8 * |
| | 6.94 ± 0.46 ^{c)} | 7.76 ± 0.53 * | 7.71 ± 0.43 * | 8.23 ± 0.79 * |
| 副腎(右) | 17.1 ± 1.3 | 18.3 ± 1.5 | 19.2 ± 2.3 * | 18.6 ± 0.7 |
| | 6.68 ± 0.61 | 7.08 ± 0.44 | 7.76 ± 0.85 ** | 7.67 ± 0.37 # |
| 胸腺 | 196 ± 19 | 202 ± 13 | 187 ± 14 | 192 ± 24 |
| | 77 ± 6 | 78 ± 6 | 76 ± 6 | 79 ± 9 |
| 脾臓 | 560 ± 34 | 569 ± 32 | 587 ± 49 | 567 ± 31 |
| | 219 ± 9 | 220 ± 8 | 237 ± 17 ** # | 234 ± 8 * # |
| 肺 | 811 ± 28 | 777 ± 49 | 826 ± 59 | 799 ± 33 |
| | 318 ± 13 | 299 ± 19 | 334 ± 19 ## | 330 ± 15 ## |
| 脳 | 1907 ± 29 | 1891 ± 19 | 1864 ± 48 | 1851 ± 35 * |
| | 747 ± 32 | 732 ± 28 | 754 ± 19 | 764 ± 28 |

a) 動物数 b)絶対重量 (mg), 平均値±SD, c) 相対重量(mg/100g 体重)

* p<0.05, ** p<0.01 vs. 1群, # p<0.05, ## p<0.01 vs. 2群

表 5. DPF あり 臓器重量-2

| 秤量臓器 | 実験群 | | | |
|-------|------------------------|------------|-----------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | 清浄空気 | 排ガスばく露 | 清浄空気 + OVA感作 | 排ガスばく露 + OVA感作 |
| | 10 ^{a)} | 10 | 10 | 10 |
| 腎臓(左) | 819 ± 38 ^{b)} | 826 ± 41 | 816 ± 37 | 806 ± 55 |
| | 321 ± 12 ^{c)} | 319 ± 11 | 330 ± 11 | 332 ± 10 |
| 腎臓(右) | 815 ± 37 | 821 ± 39 | 813 ± 48 | 792 ± 28 |
| | 319 ± 13 | 317 ± 11 | 328 ± 13 | 327 ± 8 |
| 精巣(左) | 1432 ± 60 | 1463 ± 27 | 1390 ± 85 | 1416 ± 90 |
| | 560 ± 20 | 570 ± 13 | 562 ± 24 | 585 ± 43 |
| 精巣(右) | 1389 ± 67 | 1431 ± 37 | 1398 ± 111 | 1397 ± 74 |
| | 543 ± 22 | 557 ± 12 | 563 ± 38 | 579 ± 32 |
| 心臓 | 733 ± 38 | 750 ± 32 | 737 ± 42 | 727 ± 49 |
| | 287 ± 10 | 290 ± 11 | 298 ± 14 | 300 ± 10 |
| 肝臓 | 9083 ± 450 | 9242 ± 488 | 9141 ± 327 | 8980 ± 526 |
| | 3553 ± 95 | 3595 ± 111 | 3698 ± 130 * | 3703 ± 93 * |

a) 動物数 b)絶対重量 (mg), 平均値±SD, c) 相対重量(mg/100g 体重)

* p<0.05, ** p<0.01 vs. 1群, # p<0.05, ## p<0.01 vs. 2群

表6. 呼吸器系の組織変化

| 観察項目／観察部位 | | DPF なし | | | | DPF あり | | | | |
|------------------------------------------------------|-------------|------------------|------------------|----|----|--------|----|----|----|----|
| | | 1群 ^{a)} | 2群 | 3群 | 4群 | 1群 | 2群 | 3群 | 4群 | |
| | | 10 ^{b)} | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| 気道系:鼻腔～細気管支 | | | | | | | | | | |
| 粘膜細胞浸潤(好酸球) | | | | | | | | | | |
| 鼻腔 | I (呼吸上皮) | — ^{c)} | 10 ^{d)} | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | II (嗅上皮) | — | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 気管 | I～III | — | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 細気管支 | I～II | — | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 杯細胞の増加 | | | | | | | | | | |
| 鼻腔 | II (呼吸上皮) | — | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 気管 | I～III (気管支) | — | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 細気管支 | I～II | — | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 肺泡領域 | | | | | | | | | | |
| 炎症性病変(単発性) | | | | | | | | | | |
| 大食細胞/泡沫細胞集簇 炎症細胞の浸潤 肺胞上皮細胞の肥大,軽度増生 肺胞壁 軽度肥厚 | :近位部 | — | 1 | 4 | 4 | 3 | 7 | 6 | 5 | 4 |
| | | + | 6 | 4 | 4 | 6 | 3 | 2 | 5 | 6 |
| | | ++ | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | :遠位部(胸膜下) | — | 9 | 8 | 8 | 7 | 8 | 10 | 10 | 9 |
| | + | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | ++ | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 血管周囲 好酸球浸潤 | | | | | | | | | | |
| | | — | 10 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 | 0 |
| | | ± | 0 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 5 | 8 |
| | | + | 0 | 0 | 7 | 6 | 0 | 0 | 5 | 2 |
| 胸膜下 リンパ球集簇 | | | | | | | | | | |
| | | — | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 | 1 | 1 | 4 |
| | | + | 6 | 5 | 7 | 6 | 6 | 9 | 9 | 6 |
| 肺内の黒色粒子の沈着 | | | | | | | | | | |
| 気管周囲結合組織/リンパ組織 | | — | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| | | + | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 |

a) 実験群 1群,清浄空気, 2群,排ガスばく露, 3群, 清浄空気+OVA 感作, 4群,排ガスばく露+OVA 感作

b) 観察動物. c) 肺組織変化の程度, —変化なし, ±極軽度, +軽度, ++中等度. d) 変化が見られた動物数

観察部位 : 鼻腔, I 切歯乳頭部, II 第一臼歯部

気管, I 上部, II 下部, III 気管支部

細気管支, I 管径 200 μm, II 呼吸細気管支

表7. 鼻腔, 気管・気管支および細気管支粘膜上皮の厚さ及び肺内大食細胞数

| | DPF(-) | | | | DPF(+) | | | |
|-------------|-----------------------|--------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------|--------------------|----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | 清浄空気 | 排ガスばく露 | 清浄空気 + OVA感作 | 排ガスばく露 + OVA感作 | 清浄空気 | 排ガスばく露 | 清浄空気 + OVA感作 | 排ガスばく露 + OVA感作 |
| 粘膜上皮の厚さ(μm) | | | | | | | | |
| 鼻腔 I(呼吸上皮) | 16.76 ± 1.28 | 17.87 ± 1.27 | 16.87 ± 0.83 | 17.35 ± 0.79 | 16.11 ± 0.49 | 16.31 ± 0.71 | 16.64 ± 0.61 | 16.52 ± 1.15 |
| II(嗅上皮) | 44.95 ± 2.30 | 45.27 ± 3.49 | 46.06 ± 3.37 | 45.28 ± 2.04 | 42.98 ± 2.06 | 44.35 ± 1.58 | 46.81 ± 1.28 | 44.96 ± 4.07 |
| 気管 I | 15.92 ± 1.13 | 15.36 ± 1.10 | 15.53 ± 1.68 | 17.02 ± 0.93 | 15.29 ± 1.56 | 15.18 ± 1.56 | 15.97 ± 1.12 | 16.96 ± 1.04 |
| II | 1106 ± 1.73 | 9.94 ± 0.85 | 9.53 ± 0.82 | 12.37 ± 1.95 | 9.34 ± 0.77 | 10.30 ± 1.68 | 9.96 ± 0.41 | 11.86 ± 1.80 |
| III | 7.90 ± 0.74 | 7.17 ± 0.40 | 7.14 ± 0.17 | 9.27 ± 0.42 | 7.64 ± 0.85 | 7.43 ± 0.82 | 7.20 ± 0.42 | 7.33 ± 0.43 |
| 細気管支 I | 9.49 ± 0.32 | 9.97 ± 0.55 | 9.74 ± 0.48 | 10.97 ± 1.10 | 9.40 ± 0.40 | 9.47 ± 0.26 | 9.55 ± 0.33 | 9.01 ± 0.58 |
| II | 6.66 ± 0.47 | 5.55 ± 0.72 | 5.21 ± 0.36 | 5.33 ± 0.42 | 5.45 ± 0.35 | 5.26 ± 0.27 | 5.16 ± 0.25 | 5.49 ± 0.30 |
| 肺泡領域大食細胞数 | 個/250 μm ² | | | | 個/250 μm ² | | | |
| 近位部 | 5.54 ± 0.96 | 6.12 ± 1.03 | 5.00 ± 0.41 | 7.20 ± 1.01 [*] # | 5.20 ± 1.11 | 5.52 ± 0.56 | 5.93 ± 0.80 | 6.01 ± 0.26 |
| 遠位部(辺縁) | 5.16 ± 0.77 | 7.33 ± 1.41 | 6.74 ± 0.87 | 7.97 ± 1.28 [#] | 6.02 ± 1.02 | 6.69 ± 1.47 | 6.01 ± 0.43 | 6.17 ± 0.82 |

観察部位 : 鼻腔, I 切歯乳頭部, II 第一臼歯部, 気管, I 上部, II 中間部, III 気管支部
細気管支, I 管径 200 μm, II 呼吸細気管支

*; p < 0.05 vs. 1群, #; p < 0.05 vs. 3群

イ 免疫学的検討

実験方法

1. 血清中の総 IgE 量の分析

血清中の総 IgE 量を ELISA キット (BETHYL Lab. Inc.) で測定した。血清は添付の希釈液で 5 倍に希釈して測定した。方法は添付のプロトコールにしたがって行った。

2. 末梢血中の白血球の分析

末梢血は下肢静脈から抗凝固剤として EDTA を添加した試験管に採血した。白血球のサブタイプは白血球を蛍光標識した抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。血液 0.1 ml に、PE-Cy5 標識 anti-rat CD45 抗体 (総白血球数)、PE 標識 anti-rat CD4 抗体、FITC 標識 anti-rat CD8 抗体、FITC 標識 anti-rat CD3 抗体 (T 細胞)、PE 標識 anti-rat CD45RA 抗体 (B 細胞)、または FITC 標識 anti-rat 顆粒球抗体を加え 30 分インキュベーションした後、4 ml の溶血液 (Tris 1 g, NH₄Cl 2.8 g / 500 ml) を加えて 10 分後、同量の PBS で希釈し、1,200 rpm、5 min で遠心した。さらに 4 ml の 0.5% BSA を含む PBS で 1,200 rpm、5 min で 2 回洗浄し、500 μl の 0.5% BSA を含む PBS に再浮遊した。蛍光染色した細胞はフローサイトメトリー (Cell Lab Quanta SC, ベックマン・コールター社製) で蛍光強度と数を同時に測定した。総白血球数は PE-Cy5 標識 anti-rat CD45 抗体で染色された細胞から数を計算した。白血球画分のうち、それぞれの抗体で染色された細胞の割合を測定し細胞数を計算した。

3. 肺胞細胞数と肺胞洗浄液中の蛋白の分析

肺胞を 10 ml の肺胞洗浄液 (0.3% BSA+0.05 mM EDTA-2K / PBS) で洗浄し、1,500 rpm、10 分で遠心し、上清と沈査に分離した。沈査は 1 ml の肺胞洗浄液に再浮遊させ、10 倍の溶血液で赤血球を溶血した後細胞数を測定した。

上清のうちの 50-100 μl を使用して ELISA キットで検出した。ヒスタミンは SPI BIO 社製、ECP は Nova TeinBio 社製、ロイコトリエン C₄/D₄/E₄ は Oxford Biomedical Research 社製、MCP-1 は Thermo Scientific 社製を使用した。方法はそれぞれの添付のプロトコールにしたがって行った。

結果

1. 血清中の総 IgE 量の分析

血清中の IgE 量は、DPF なしの場合、清浄空気群、ディーゼル排ガスばく露群、OVA 感作・清浄空気群、OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群でそれぞれ、 3.5 ± 1.9 、 4.6 ± 1.8 、 54.5 ± 19.6 、 89.9 ± 19.3 ng/ml であり、DPF ありの場合清浄空気群、ディーゼル排ガスばく露群、OVA 感作・清浄空気群、OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群でそれぞれ、 6.9 ± 1.5 、 8.3 ± 1.1 、 41.9 ± 8.8 、 88.0 ± 23.5 ng/ml であった。DPF なし DPF ありともに OVA 感作・清浄空気群とディーゼル排ガスばく露群ともに有意に増加していた。OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群は OVA 感作・清浄空気群より高かったが有意な差ではなかった。また、DPF なしとありで差はなかった。

2. 末梢血中の白血球の分析

末梢血中の総白血球数は、DPF なし・OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群では減少、DPF あり・OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群ではそれぞれの OVA 非感作・清浄空気群に比べて有意に増加した。また、DPF あり・OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群は DPF なし・OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群比べて白血球数は有意に増加していた。顆粒球数は、DPF なしとありとも OVA 感作群は OVA 非感作群に比べて有意に増加し、DPF あり・OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群は DPF なし・OVA 感作・ディーゼル排ガスばく露群

比べて有意に増加していた。

B細胞は、DPFなしありともOVA感作・清浄空気群はOVA非感作・清浄空気群に比べて減少し、DPFなしありともOVA感作・ディーゼル排ガスばく露群はOVA感作・清浄空気群より増加した。OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群はDPFありの方がDPFなしより増加した。

T細胞も、DPFなしありともOVA感作群はOVA非感作群に比べて減少し、OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群はOVA感作・清浄空気群より増加していた。

CD4とCD8細胞はDPFなしの場合OVA感作・清浄空気群とディーゼル排ガスばく露群はOVA非感作・清浄空気群より有意に減少したが、DPFありの場合は有意な差はなかった。CD4とCD8細胞は、DPFあり・OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群はDPFなし・OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群より有意に増加した。CD8細胞はDPFありでOVA感作・清浄空気群よりOVA感作・ディーゼル排ガスばく露群は有意に増加した。

3. 肺胞細胞数

肺胞細胞はDPFなしの場合、清浄空気群、ディーゼル排ガスばく露群、OVA感作・清浄空気群、OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群でそれぞれ、 1.6 ± 0.1 、 1.4 ± 0.1 、 2.1 ± 0.1 、 $1.6 \pm 0.1 \times 10^6$ cellsであり、DPFありの場合清浄空気群、ディーゼル排ガスばく露群、OVA感作・清浄空気群、OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群でそれぞれ、 1.2 ± 0.1 、 1.5 ± 0.1 、 2.4 ± 0.1 、 $2.2 \pm 0.3 \times 10^6$ cellsであった。DPFなしの場合はOVA感作・清浄空気群で増加、DPFありの場合はOVA非感作・ディーゼル排ガスばく露群、OVA感作・清浄空気群とディーゼル排ガスばく露群で増加した。DPFなし・OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群はDPFなし・OVA感作・清浄空気群

より低下した。

4. 肺胞洗浄液中の炎症性蛋白の分析

炎症の指標として肺洗浄液中のECP、ヒスタミン、MCP-1、ロイコトリエンC4/D4/E4を測定した。ECP、ヒスタミン、ロイコトリエンC4/D4/EはDPFの有り無しともに、変化は少なかった。MCP-1は、DPFありなしともOVA感作・清浄空気群でOVA非感作・清浄空気群より少なく、DPFありでOVA感作・ディーゼル排ガスばく露群はOVA感作・清浄空気群よりも多かった、また、DPFありなしで差はなかった。

考察

OVA感作した病態ラットを用いて、DPFありとなしでディーゼル排ガス30日間ばく露をおこない、炎症・免疫系への影響を調べた。OVA感作で血清中のIgE量は増加し、ぜん息・アレルギー症状を示している。OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群はOVA感作・清浄空気群よりIgEの平均値は高く、ぜん息・アレルギー症状を亢進した可能性も考えられるが、その差は有意ではなかった。また、DPFなしとありで差はなく、DPFはぜん息・アレルギー症状増悪を抑制していなかった。

OVA感作・ディーゼル排ガスばく露群のDPFなしありを比べると、白血球数、顆粒球数、B細胞数、CD4細胞とCD8細胞は、DPFなしに比べDPFありで増加していた。このことはDPFが炎症・免疫系を抑制するというより、亢進していることを示唆している。

肺胞洗浄液中の炎症性蛋白質の変化は少なく、OVA感作・ディーゼルばく露でも重篤な炎症は生じていなかった。

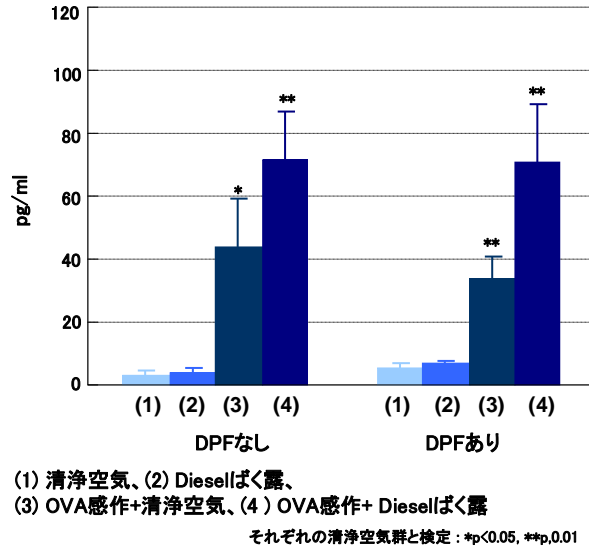


図1 血清中のIgE濃度

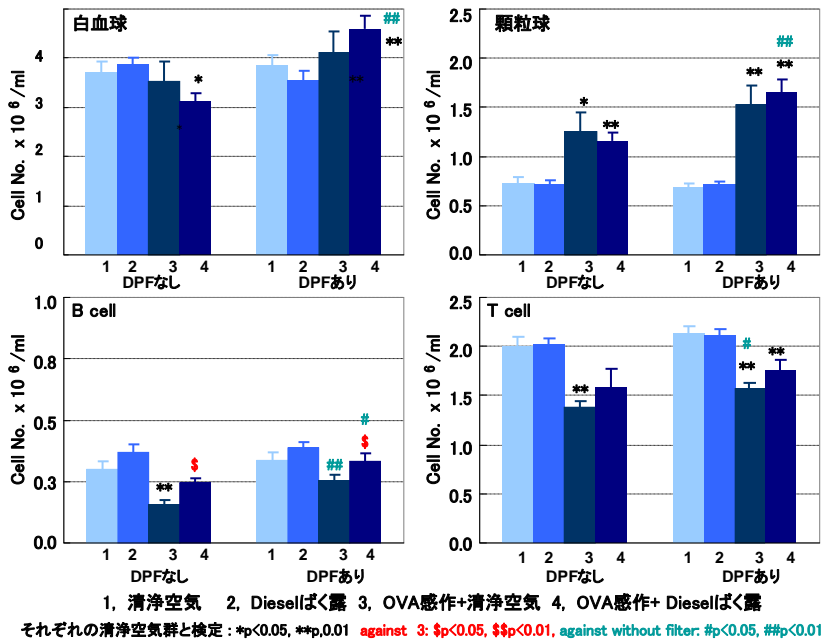


図2 ディーゼル排気ガス30日間ばく露後の末梢血中の白血球数

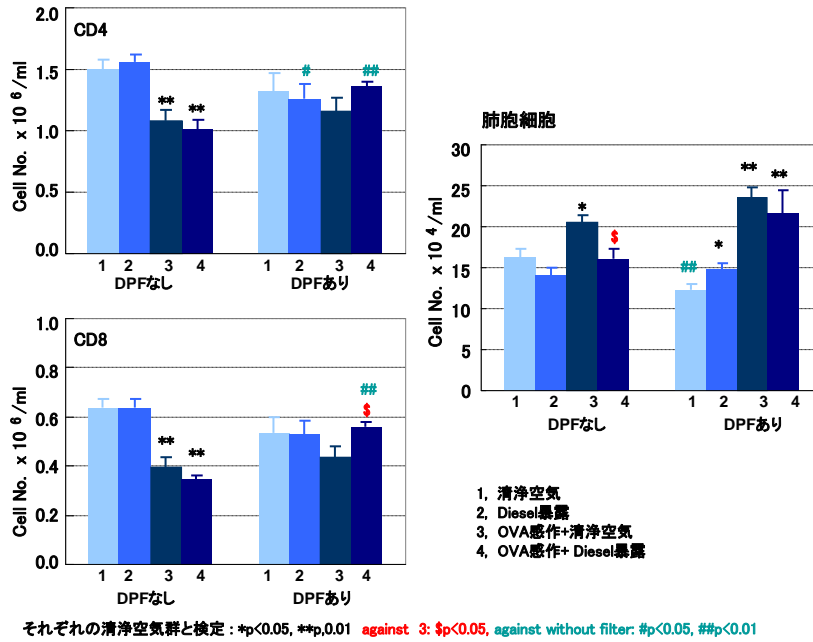


図3 ディーゼル排気ガス 30 日間ばく露後の T 細胞中の CD4 と CD8 細胞数と肺胞細胞数

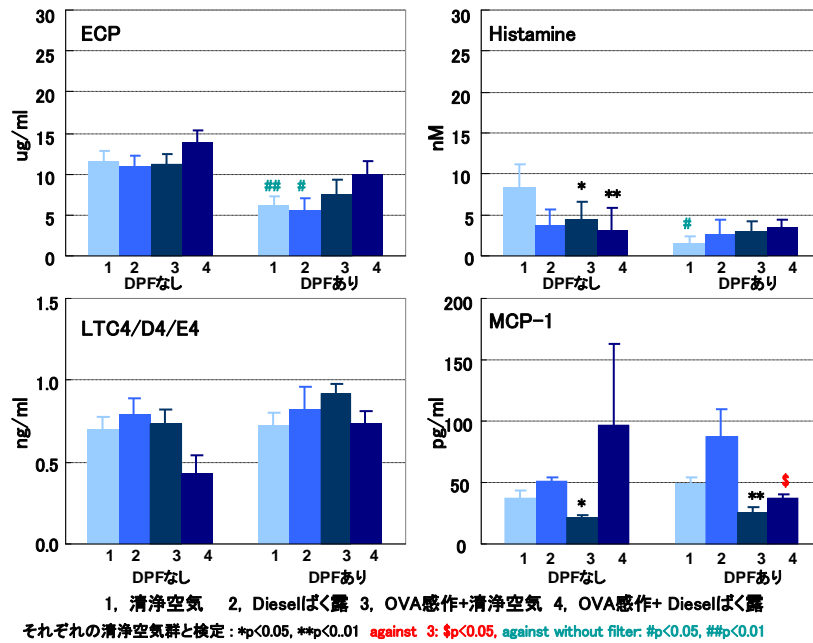


図4 ディーゼル排気ガス 30 日間ばく露後の肺洗浄液中の物質

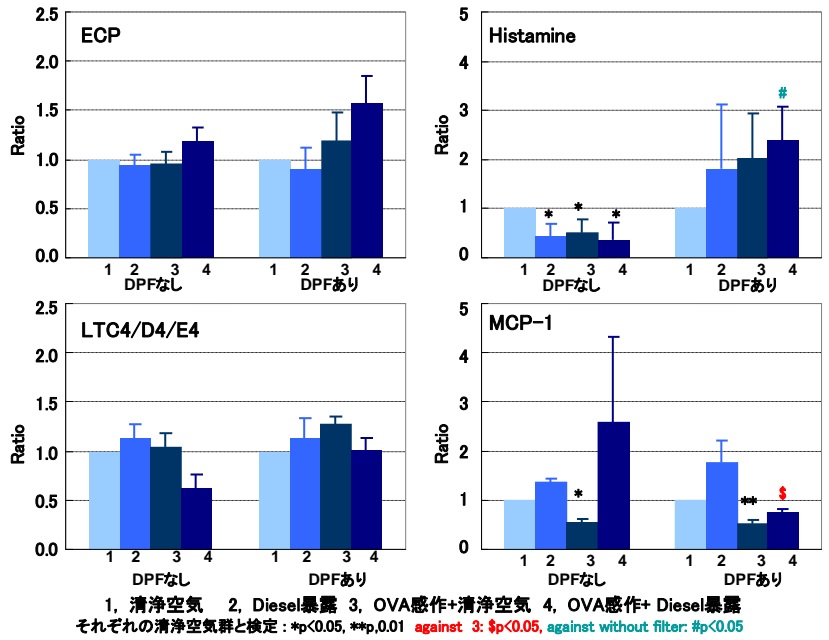


図5 ディーゼル排気ガス 30 日間ばく露後の肺洗浄液中の物質 (清浄空気を 1 として)

ウ 生化学的検討

実験方法

1 過酸化脂質の定量

肺ホモジュネート 0.2 ml にチオバルビツール酸試薬 2 ml を添加し沸騰水中で 15 分間加熱後、遠心分離し上清について分光法により定量した。

2 好酸球ペロキシダーゼ活性測定

肺胞洗浄液(BALF)細胞成分けん濁液 0.1 ml につき α -ジアニジジンおよび過酸化水素を基質として分光法により測定した。

3 ミエロペロキシダーゼ活性測定

BALF 細胞成分けん濁液 0.1 ml につき α -フェニレンジアミンジヒドロクロリドおよび過酸化水素を基質として分光法により測定した。

4 統計

データは 8~10 匹の平均値±標準偏差で示した。有意差検定は Bonferroni の多重比較により行い、有意水準を 5%とした。

結果

肺ホモジュネートの過酸化脂質量は DPF 装着、非装着の両方において、OVA 感作し、ディーゼルばく露した群において明瞭な増加が認められた

(図 1)。BALF 細胞成分について、好酸球ペロキシダーゼおよびミエロペロキシダーゼ活性を測定した。DPF 装着、非装着いずれの群においても、OVA 感作およびディーゼルばく露による好酸球ペロキシダーゼの増加は認められなかった(図 2)。ミエロペロキシダーゼ活性は、DPF 装着、非装着いずれの群においても、OVA 感作およびディーゼルばく露により有意に減少した(図 3)。

考察

1. OVA 感作し、ディーゼルばく露した群における肺の過酸化脂質量の上昇は、これらの処理による肺細胞の傷害を反映しているものと考えられ、気道の傷害をも示唆するものであり、ぜん息の素因を有

する動物における、ディーゼルばく露によるぜん息の増悪の可能性を示していると思われる¹⁾。この作用は DPF の装着によって防御されるものではなかった。

2. 好酸球はぜん息症状および発症に深く関わっているとされるが²⁾、本実験においては好酸球の指標酵素である好酸球ペロキシダーゼ活性のディーゼルばく露と関係した変化は認められず、好酸球の増加および活性化は、本処理により惹起されていないことが示された。従って、ぜん息様症状は惹起はされなかったと考えられる。

3. 好中球は急性炎症時に増加するが、ぜん息患者の BALF においても、好酸球に次いで増加する白血球である²⁾。BALF の好中球に存在するミエロペロキシダーゼ活性を測定した。DPF 装着および非装着群ともに、OVA 感作、ディーゼルばく露処理により、活性は低下した。この作用においては、OVA 感作の影響が大きいと考えられる。この結果から、炎症等が惹起されているとは考えられない。

以上の結果より、ぜん息の素因を有する動物にディーゼルをばく露しても、ぜん息様症状および呼吸器系炎症の惹起は認められないが、肺細胞における微小な酸化的傷害が示され、ディーゼルばく露によるぜん息発症の可能性を示唆しているものと考えられた。

参考文献

- 1) Wood, L.G., Gibson, P.G., Garg, M.L.: Biomarker of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur. Respir. J.*, 21, 177-186, 2003.
- 2) 周藤眞康: 気道液性成分からみた呼吸器の研究 第2編 気管支肺胞洗浄液における顆粒球とアリルサルファターゼ, 岡山医学会雑誌, 99, 1223-1237, 1987.

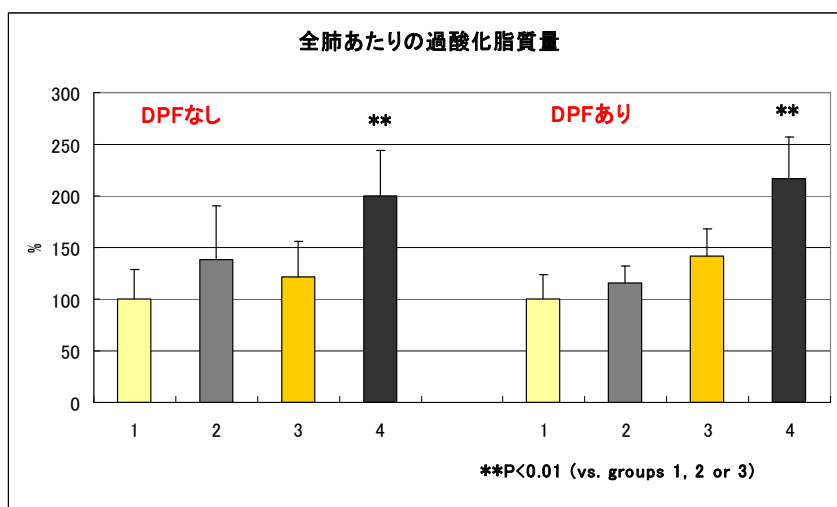


図 1. 肺ホモジュネートの過酸化脂質量

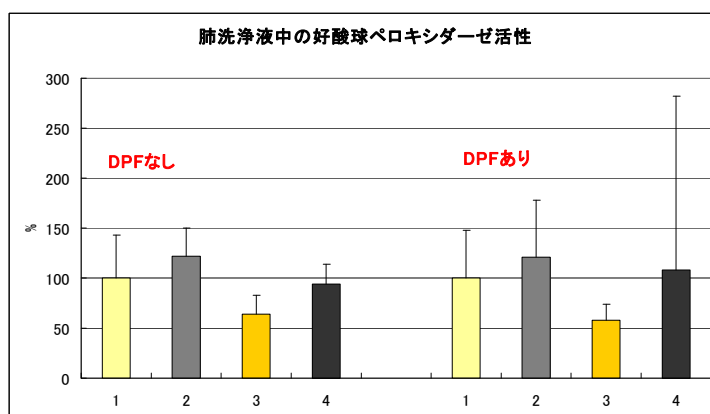


図 2. 肺洗浄液細胞成分の好酸球ペロキシダーゼ活性

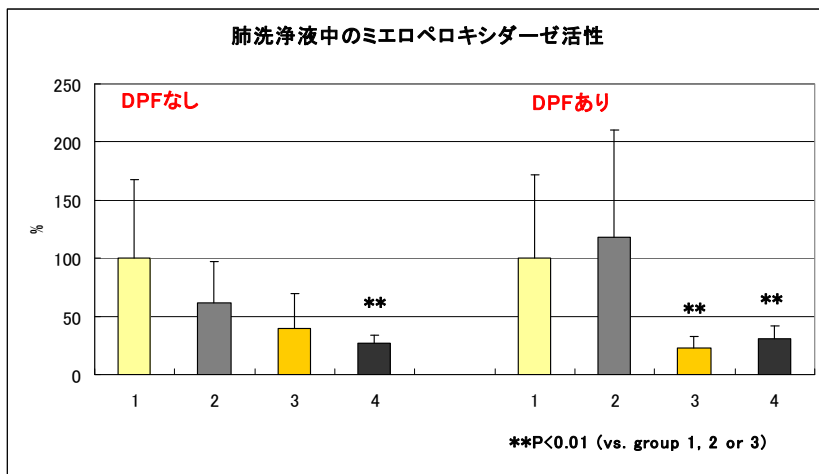


図 3. 肺洗浄液細胞成分のミエロペロキシダーゼ活性

細胞ばく露実験

研究要旨

ディーゼル排出ガスは、ぜん息など、呼吸器系へ影響を及ぼすと考えられている。本実験においては、培養ヒト肺上皮由来がん細胞 A549 細胞を用いて、ディーゼル排出ガスの影響を調査した。予備実験として、A549 細胞にディーゼル粒子を直接ばく露したところ、粒子濃度 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞増殖に影響があった。また酸化ストレスマーカー HO-1 が少し上昇し、ESR により OH ラジカルが検出された。このことからディーゼル粒子は酸化ストレスを与えることがわかった。A549 細胞にディーゼル排出ガスを直接ばく露すると、細胞増殖能力に影響を与えることが明らかとなり、その作用の発生には酸化ストレスが関与していると考えられた。また粒子状物質減少装置 (DPF) の装着によって、細胞増殖作用への悪影響を抑制する可能性が示唆された。

I 研究の目的

ディーゼル排出ガスは、ヒトに対して、ぜん息など、特に呼吸器系への影響を及ぼすと考えられている。ディーゼル排出ガスは、窒素酸化物や硫黄酸化物などのガス状成分と、多環芳香族炭化水素を始め数多くの有機化学物質を吸着した粒子状物質からなる。これまで東京都健康安全研究センターにおいて実施されたラットへのばく露実験によって、呼吸器や胎児への影響など、ディーゼル排出ガスの様々な生体への影響が報告されてきた¹⁾。現在、都民の健康と安全を確保する環境に関する条例 (環境確保条例) により、ディーゼルエンジンを搭載するトラック・バス・特殊用途自動車等は、粒子状物質減少装置 (DPF) を装着し、条例に定める粒子状物質排出基準を満たさなければ、東京都内を走行できない。本事業においては、そうした状況の変化がディーゼル排出ガスの生体影響をどのように変化させたかについて、調査研究を行っている。

ディーゼル排出ガスは、主に呼吸器系から気相ばく露される。したがって、ディーゼル排出ガスの生体影響を評価するためには、そうしたばく露経路を考慮した実験を行うことが必要である。しかし、動物実験は実験期間が長期間に及ぶことが多く、種差による反応の違いも考えられる。培養細胞を用いた実験は *in vitro* 実験ではあるが、ヒト由来培養細胞

を用いることにより、ヒトへの影響を考察する際の更なる判断材料として有用である。培養細胞ばく露実験装置 Cultex® システムは、培養細胞に気相の被検物質をばく露するために開発された、現在のところ唯一の実験装置である。本実験は、この培養細胞ばく露実験装置を用い、呼吸器系からのばく露を考慮した環境で、培養ヒト肺上皮由来がん細胞にディーゼル排出ガスをばく露して、酸化ストレスの誘導や、免疫系などぜん息を中心に生体への影響について調査した。また、DPF を装着したディーゼル排出ガスについても同様にばく露実験を行い、ディーゼル排出ガスの生体影響に対する DPF 装着の効果についても調査した。また予備実験として培養ヒト肺上皮由来がん細胞にディーゼル粒子を直接ばく露する実験も行い、影響を検討した。

II 実験方法

1. 培養ヒト肺上皮由来がん細胞へのディーゼル粒子直接ばく露

1) 培養ヒト肺上皮由来がん細胞の処理

培養ヒト肺上皮由来がん細胞 A549 細胞 (American Type Culture Collection より購入) は、10%FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて、37°C・5% CO₂/95%air の条件下で継代培養した。A549 細胞は、必要時にトリプシンを用いてフラスコからはがし、

細胞数を数えてプレートに播種した。播種 2 日後、FBS を含有しない RPMI1640 培地に換え、実験に供した。

2) 細胞増殖試験

A549 細胞は 96 ウェルプレートに 1×10^4 cells/well 播種した。2 日間培養後、培地交換し、DMSO で希釈したディーゼル粒子 (NBS No.1650) を加え培養した。24 または 72 時間後、WST-1 溶液を加え 3 時間培養した後、測定波長 450 nm、参照波長 600 nm に設定し吸光度を測定した。ばく露していない細胞の吸光度を 100% としてばく露した細胞の吸光度から増殖能力を求めた。

3) IL-8、TNF- α 測定

A549 細胞は 24 ウェルプレートに 40×10^4 cells/well 播種した。2 日間培養後、培地交換し、DMSO で希釈したディーゼル粒子を加え培養した。反応後、培地を回収した。IL-8、TNF- α 濃度の測定は DuoSet® ELISA Development kit (R&D SYSTEMS) の human CXCL8/IL-8 および human TNF- α /TNFSF1A を使用して添付された方法に従って実験を行い、測定波長 450 nm、参照波長 540 nm に設定し、吸光度を測定、定量した。

4) HO-1測定

A549 細胞は 24 ウェルプレートに 40×10^4 cells/well 播種した。2 日間培養後、培地交換し、DMSO で希釈したディーゼル粒子を加え培養した。培地を捨て、トリプシンを用いて細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、溶解液 (1mM EDTA、0.5% Triton X-100、プロテアーゼインヒビター含有 PBS) で調整した細胞溶解液を用い、DuoSet® IC Human Total HO-1/HMOX1 ELISA (R&D SYSTEMS) で添付された方法に従って実験を行い、測定波長 450 nm、参照波長 540 nm に設定し、吸光度を測定、定量した。なお、細胞溶解液のタンパク質濃度は、Lowry 法を用いて定量した。

5) ESR 測定

A549 細胞は 24 ウェルプレートに 40×10^4 cells/well 播種した。2 日間培養後、培地交換、

DMSO で希釈したディーゼル粒子を加え、24 時間培養した。反応後、培地を回収した。培地にスピントラップ剤 DMPO を加え、ESR でシグナルを測定した。ESR の条件は磁場、掃引幅 335 ± 5 mT、出力 5 mW、変調 9.412 GHz、掃引時間 2 分、応答時間 0.1 秒、増幅比 3.2×100 。

2. 培養細胞ばく露装置による培養ヒト肺上皮由来がん細胞へのばく露実験

1) ディーゼル排出ガス

DPF 非装着 (DPF なし) ディーゼル排出ガスについては、ディーゼルエンジン (NFAD-50-EX 型、ヤンマー製、排気量 309 cc) を用いて発生させたディーゼル排出ガスを、東京都健康安全研究センター内の動物ばく露チャンバー (内容量 1.6 m^3) を経由して培養細胞ばく露チャンバーに導入した。

一方、DPF 装着 (DPF あり) ディーゼル排出ガスについては、上記エンジンを用いて発生させたディーゼル排出ガスを DPF (オーデン製 ODP-S06) に通過させた後に、動物ばく露チャンバー経由で培養細胞ばく露チャンバーに導入した。

なお、ばく露チャンバー内の粒子状物質濃度および窒素酸化物 (NO_2) 濃度の平均値は、DPF なしディーゼル排出ガスでそれぞれ $1.6 \text{ mg}/\text{m}^3$ および 4.0 ppm、DPF ありディーゼル排出ガスでそれぞれ $0.47 \text{ mg}/\text{m}^3$ および 4.6 ppm であった。

2) 培養細胞ばく露実験装置

培養細胞ばく露実験装置は、Cultex® CG システム (Cultex Laboratories GmbH、柴田科学) を用いた。

3) 培養ヒト肺上皮由来がん細胞の処理

培養ヒト肺上皮由来がん細胞 A549 細胞は、10% FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2 / 95\% \text{air}$ の条件下で継代培養した。A549 細胞は、必要時にトリプシンを用いてフラスコからはがし、培地を入れたプレートのウェル上に置いたインサート (面積 0.9 cm^2) に 5×10^4 個の細胞を播種し、インサートのメンブラン膜上で、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2 / 95\% \text{air}$ の条件

下にて7日間培養した。細胞を培養したインサートは、その後培地を1%FBS含有RPMI1640培地に変更し、Cultex® CG システムの細胞ばく露チャンバーに設置した。A549細胞は、DPFなしまたはDPFありディーゼル排出ガス、または対照群として活性炭を通過させ清浄にした空気を、1.0 mL/minの流速で、20・40・60・90 または 120 分間ばく露させた後、1%FBS含有RPMI1640培地を入れたプレートのウェルに入れ、インサート内にも培地を0.5 mL加え、37°C・5%CO₂/95%airの条件下にて培養した。

実験は、1回のばく露実験を3個同時に行い、同じ条件の実験を3回繰り返し行った。

4) 細胞増殖能力試験

細胞増殖能力は、ばく露後24時間培養したA549細胞にWST-1溶液を加え、3時間培養した後、測定波長450 nm、参照波長600 nmに設定し吸光度を測定した。ばく露していない細胞の吸光度を100%としてばく露した細胞の吸光度から増殖能力を求めた。

5) IL-8・TNF- α 濃度

IL-8・TNF- α 濃度は、ばく露後24時間培養したA549細胞の培地を回収した。当該培地を用い、DuoSet® ELISA Development kit (R&D SYSTEMS)のhuman CXCL8/IL-8 および human TNF- α /TNFSF1A を使用して添付された方法に従って実験を行い、測定波長450 nm、参照波長540 nmに設定し、吸光度を測定、定量した。IL-8濃度は、HO-1測定に用いた細胞溶解液のタンパク濃度で換算した。

6) HO-1 遺伝子発現

ばく露後3時間培養したA549細胞をPBSで2回洗浄後、RNA抽出試薬(RNA queous® Kit、Ambion)を用いて、マニュアルに従ってtotal RNAを抽出、精製し、吸光度計によりRNA量を定量した。次にHigh Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems)を用いて、マニュアルに従ってmRNAをcDNAに逆転写した。このcDNAにTaqMan® Gene Expression Master Mix および TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) をマニュアルに従って加え、リアルタイムPCRシステム(Applied

Biosystems 7500)を用いてリアルタイムPCRを行い、遺伝子の発現量を定量した。目的遺伝子はHO-1、リファレンス遺伝子として β -アクチンを用いた。HO-1遺伝子発現量は β -アクチン遺伝子発現量で補正し、相対定量を行った。

7) HO-1濃度

HO-1濃度は、ばく露後3時間培養したA549細胞をトリプシンで回収し、PBSで2回洗浄後、溶解液(1mM EDTA、0.5% Triton X-100、プロテアーゼインヒビター含有PBS)で調整した細胞溶解液を用い、DuoSet® IC Human Total HO-1/HMOX1 ELISA (R&D SYSTEMS)で添付された方法に従って実験を行い、測定波長450 nm、参照波長540 nmに設定し、吸光度を測定、定量した。なお、細胞溶解液のタンパク濃度は、Lowry法を用いて定量した。

8) 活性酸素同定

DPFなし・ありのディーゼル排出ガスおよび清浄空気中に存在する活性酸素は、スピントラップ剤DMPOを10%含有するPBSを30 mL/minの流速の当該ガスで1時間バブリングし、電子スピン共鳴装置(ESR)を用いてシグナルを測定して同定した。ESRの条件は、磁場掃引幅335 \pm 5 mT、出力5 mW、変調9.412 GHz、掃引時間2分、応答時間0.1秒、増幅比3.2 x 100とした。

9) 統計学的解析

統計学的検定はStudentのt検定を用いて、同じばく露時間の対照群とDPFなし・ありディーゼル排出ガスばく露群またはDPFなし群とDPFあり群の結果を検定した。

III 結果および考察

1. 培養ヒト肺上皮由来がん細胞へのディーゼル粒子直接ばく露

ディーゼル粒子ばく露による細胞増殖試験の結果を図1に示す。反応時間が24時間では、ディーゼル粒子濃度10 μ g/mLから増殖抑制作用が見られ、100 μ g/mLで20%以下になった。反応時間が72時間では10 μ g/mL以上で増殖抑制作用が見られ、

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でほとんど細胞が増殖されなかった。ディーゼル粒子は10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで細胞増殖作用にほとんど影響を与えず、傷害性は比較的弱いと考えられた。

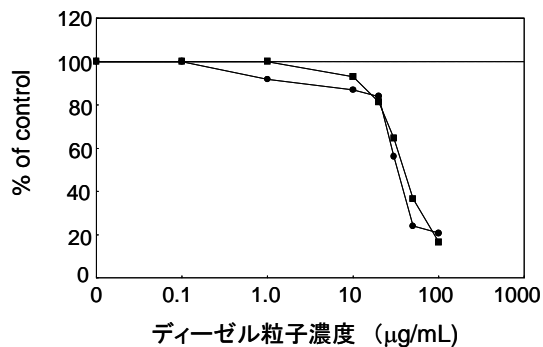


図 1 ディーゼル粒子をばく露した A549 細胞の増殖率

●; 24 時間、■; 72 時間

IL-8、TNF- α は炎症症状を引き起こす原因因子として関与している。培地に放出された IL-8 濃度の結果を図 2 に示す。DMSO を加えた対照群に比べ、反応時間 4、24 時間の時、粒子濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では変化ないが、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にすると IL-8 濃度が減少した。反応時間 1、2 時間ではほとんど粒子による影響は見られず、また長く反応させると IL-8 濃度は減少した。また A549 細胞にディーゼル粒子を 1、2、4 または 24 時間反応させても、TNF- α は今回の実験では検出されなかった。

今回の実験ではディーゼル粒子を DMSO に分散させ培地へ加えたが、粒子はすぐに凝集するため細胞全体に接触しにくい。したがって、A549 細胞にディーゼル粒子を直接反応させても、IL-8、TNF- α に対する影響が弱いと考えられた。

HO-1 は酸化ストレスマーカーである。A549 細胞に DMSO を加え培養すると、細胞中 HO-1 濃度は時間と共に減少し 24 時間後に対照と比べては開始時の約半分の濃度に減少した。ディーゼル粒子を 4 または 24 時間反応させると、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で少し上昇し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でさらに上昇した (図 3)。しかし、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にすると減少した。ディーゼル粒子によ

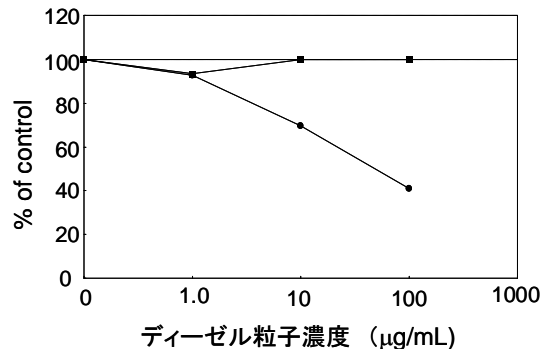


図 2 ディーゼル粒子をばく露した A549 細胞から放出される IL-8

●; 4 時間、■; 24 時間

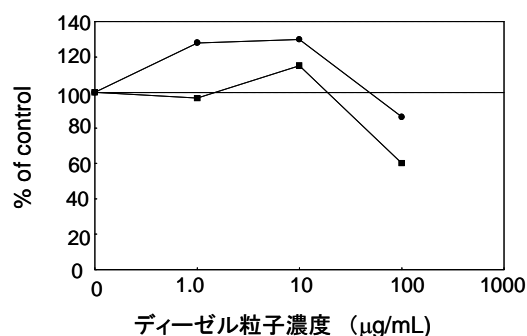


図 3 ディーゼル粒子をばく露した A549 細胞に生成される HO-1

●; 4 時間、■; 24 時間

て細胞内で HO-1 生成が亢進し、ディーゼル粒子が細胞に酸化ストレスを与えられた。

A549 細胞とディーゼル粒子を反応させた培地にスピントラップ剤 DMPO を加え ESR で測定した結果を図 4 に示す。ディーゼル粒子のみの場合、DMPO-OH シグナルが見られた (図 4-a)。そしてカタラーゼ 1000U/mL を加えると DMPO-OH シグナルは完全に消失した (図 4-b)。このことからディーゼル粒子は OH ラジカルを発生することがわかった。

今回の実験で、ディーゼル粒子は培養ヒト肺上皮由来がん細胞 A549 細胞に活性酸素を発生させ、酸化ストレスを与える可能性が考えられた。しかし炎症に関与する反応を確認することはできなかった。

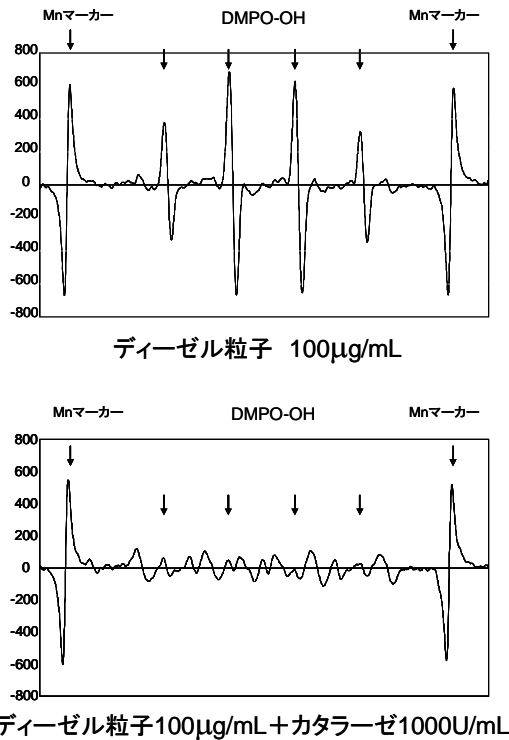


図 4 ディーゼル粒子をばく露した A549 細胞を培養した培地の ESR 測定結果

2. 培養細胞ばく露装置による培養ヒト肺上皮由来がん細胞へのばく露実験

ディーゼル排出ガスを20、40、60分間ばく露し、24時間経過後におけるA549細胞の増殖能力を図5に示す。清浄空気のばく露は、増殖能力に影響しなかった。DPFなしディーゼル排出ガスのばく露は、ばく露時間60分間で対照群より増殖能力が低下した。DPFありディーゼル排出ガスのばく露は、対照群とあまり変わらなかった。

IL-8 と TNF- α は、共に炎症症状を引き起こす原因因子として作用することが報告されている。図6は、ディーゼル排出ガスをばく露した後24時間で放出されたIL-8濃度を示す。DPFなしディーゼル排出ガスでは、各ばく露時間でIL-8濃度が増加したが、対照群でも同様の濃度変化を示した。DPFありディーゼル排出ガスでは、20、60分間ばく露により、IL-8濃度が減少した。一方、TNF- α は検出されなかった。

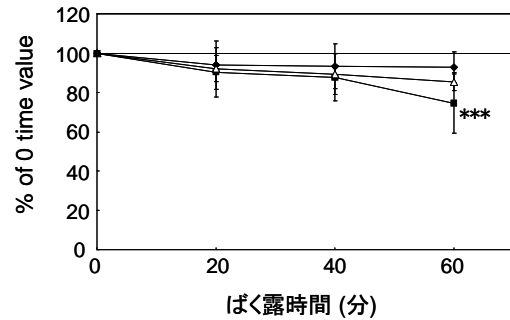


図 5 A549 細胞の増殖能力に対するディーゼル排出ガスばく露の影響

◆;対照群、■;DPFなし排出ガス群、△;DPFあり排出ガス群、
***;P<0.001 なし群 vs 対照群

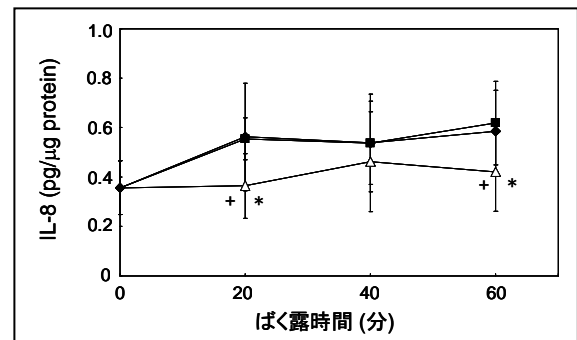


図 6 ディーゼル排出ガスをばく露した A549 細胞から放出される IL-8 濃度

◆;対照群、■; DPFなし排出ガス群、△;DPFあり排出ガス群、
*;P<0.05 あり群 vs 対照群
+;P<0.05 なし群 vs あり群

A549細胞の酸化ストレスマーカーHO-1遺伝子発現量の結果を図7に示す。ばく露時間0分の発現量を1として、各ばく露した3時間後の細胞中HO-1遺伝子の発現量を数値で示した。細胞にDPFありディーゼル排出ガスをばく露すると、HO-1遺伝子発現量は、ばく露時間60、90分間で対照群に比べ増加したが、120分間では対照群と同じレベルになった。DPFなしディーゼル排出ガス群は、対照群と比べ大きな変化は見られなかった。

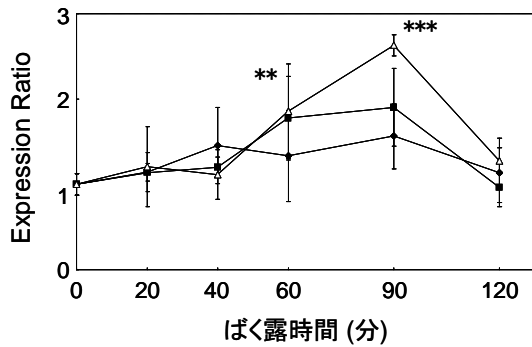


図 7 ディーゼル排出ガスをばく露した A549 細胞で発現した HO-1 遺伝子

◆; 対照群、■; DPF なし排出ガス群、△; DPF あり排出ガス群、

; $P < 0.01$ 、*; $P < 0.001$ あり群 vs 対照群

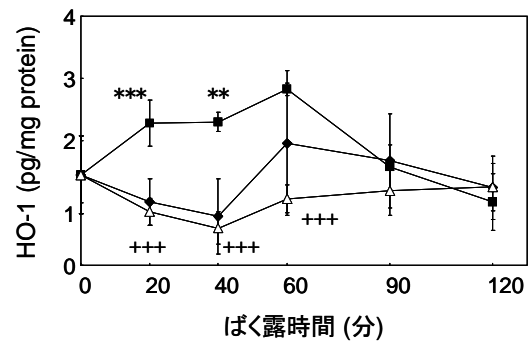


図 8 ディーゼル排出ガスをばく露した A549 細胞で生成される HO-1 濃度

◆; 対照群、■; DPF なし排出ガス群、△; DPF あり排出ガス群、

; $P < 0.01$ 、*; $P < 0.001$ なし群 vs 対照群

+++; $P < 0.001$ 、なし群 vs あり群

ディーゼル排出ガスをばく露して 3 時間後の細胞中の HO-1 濃度を示す (図 8)。DPF なしディーゼル排出ガスでは、HO-1 濃度はばく露時間 0 分の値より増加し、そして対照群に比べ高かった。DPF ありディーゼル排出ガスでは 20、40 分間ばく露で、HO-1 濃度は対照群と同程度を示し、生成量は少なかった。DPF を装着した排出ガスは、HO-1 濃度が減少することがわかった。また、90、120 分間ばく露すると DPF なし群で HO-1 濃度は減少した。

今回の実験では、RT-PCR 法で HO-1 遺伝子の発現量、ELISA 法で HO-1 タンパク濃度を測定した。その結果、遺伝子とタンパク質の発現量の変化は一致しなかった。DPF あり群では、ばく露により遺伝子の発現は増加したが、タンパク質濃度は減少した。DPF あり排出ガスの成分がタンパク質合成を抑制する作用を有する可能性など、DPF なし・ありでは、ばく露による影響の表われ方に違いのあることが示唆された。酸化ストレスはぜん息の発症、悪化に関連していることから、DPF の有無が何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。

図 9 は、ディーゼル排出ガスをバブリングさせた 10% DMPO 含有 PBS を ESR で測定した結果を示

す。DPF なし・ありに係わらず、ディーゼル排出ガスで処理した場合には、弱い DMPO-OH シグナルが検出された (図 9-a)。このシグナルは、カタラーゼ 1000 U/mL、SOD 500 U/mL を加えると消失した (図 9-b、c)。このことから、ディーゼル排出ガスは OH ラジカルを発生するが、その作用は弱いことが判明し、さらに、当該ラジカル発生に過酸化水素が関与することが示唆された。

21 年度の清浄空気をばく露する予備実験では、A549 細胞に空気を流速 1.0 mL/min で 60 分間ばく露すると、24 時間後に細胞増殖能力が 42% に減少した²⁾。本年度は、ばく露のノズルの高さを調節し、実験に用いる培地に 1% FBS を加えるなど、種々の実験条件修正を行い、清浄空気をばく露による A549 細胞増殖能力への影響を排除することができた。しかし、IL-8 や HO-1 の濃度については、清浄空気をばく露した対照群でもばく露時間に依存した変化がみられたことから、物理的な刺激により細胞がなんらかの影響を受けることが避けられないものと考えられた。したがって、本実験においてディーゼル排出ガスばく露群で観察された変化の意義は、あくまでも清浄空気をばく露した対照群における変化と比較し

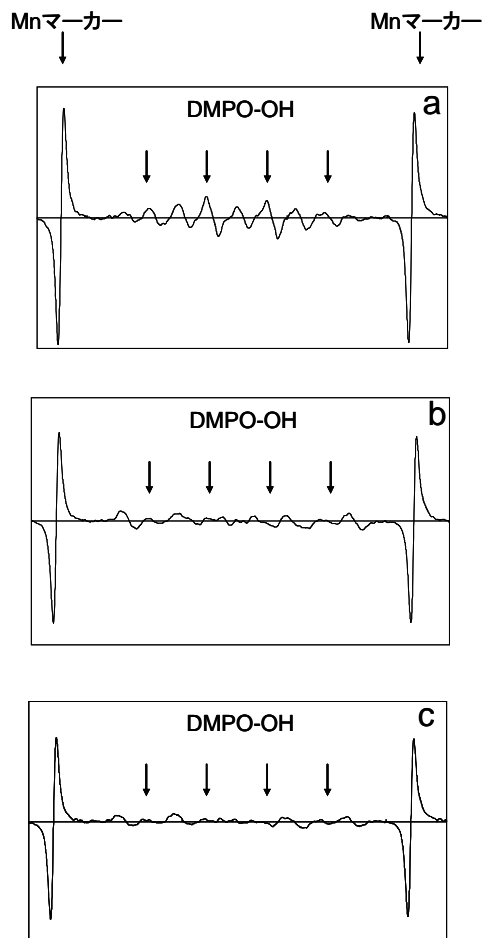


図9 ディーゼル排出ガスの ESR 測定結果
 a; DPF なし排出ガス、b; DPF なし排出ガス+カタラーゼ、c; DPF なし排出ガス+SOD

た上で評価すべきものであることが判明した。

本実験により、ディーゼル排出ガスは細胞増殖能力に影響を持つことが明らかとなり、この作用の発生には酸化ストレスが関与していると考えられた。また DPF 装着によって細胞増殖作用への悪影響を抑制する可能性が示唆された。

IV 参考文献

- 1) 大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書 —平成 15 年度から平成 19 年度までの 5 年間のまとめ— 東京都福祉保健局
- 2) 平成 21 年度大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書 — 東京都福祉保健局