

課題1 スギ花粉症モデル(鼻アレルギー)を用いたディーゼル排気曝露の影響解析

小林隆弘、島 浩稔、尾村誠一 (国立環境研究所)
青柳 元、篠原律子 (筑波大学)

研究要旨

1964年に初めて花粉症が報告されて以来、その罹患率は急激に増加し、現在では国民の10数%が花粉症症状をもつといわれている。疫学調査によると、スギ花粉の飛散数がほぼ同じ地域では、主要道路付近で交通量の多い場所に住む人は、交通量の少ない郊外に住む人より花粉症の罹患率が高いことが報告されている。このことから、大気汚染が花粉症の発症や増悪に関与している可能性があることが示唆されている。これまでの研究でディーゼル排気ガス(Diesel exhaust: DE)が、スギ花粉(Japanese cedar pollen: JCP)を抗原とした花粉症様病態をDE濃度依存的に増悪させることを報告した。しかしながら、環境基準値が $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ であることを考えると、これまで曝露したDE濃度は、 1.0 、 $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ であり、高濃度であると考えられる。そこで今年度では、動物に曝露するDE濃度として環境基準の3倍の濃度 $0.3\text{mg}/\text{m}^3$ を設定し、同様の花粉症症状が増悪するかどうかの検討を行うことを目的とした。

Hartley系雄性モルモットを用いて実験を行った。全てのモルモットに対し、事前感作のために2週にわたり週1回ずつJCP+水酸化アルミニウム懸濁液を投与した。その後、11週間にわたりフィルターを通した清浄空気、 $0.3\text{mg}/\text{m}^3$ のディーゼル排気粒子(Diesel exhaust particle: DEP)を含むDEをそれぞれ連続曝露(12時間/日, 7日/週)した。その間、それぞれの実験群によって、抗原としてJCP+生理食塩水または生理食塩水のみを点鼻投与し、投与後20分間に誘発されるくしゃみ回数と鼻汁分泌量を測定した。曝露開始から11週目の測定終了24時間後に採血し、分取した血清を用いて皮内反応によってJCPに特異的なIgG、IgE抗体価を測定した。また、鼻部を摘出し、中性ホルマリン固定・脱灰操作洗浄後、切片を作成して鼻粘膜上皮および上皮下の組織学的観察を行い、好酸球の浸潤数を計測した。

くしゃみ回数及び鼻汁分泌量については、清浄空気曝露群と比較して $0.3\text{mg}/\text{m}^3$ DE曝露群は、いずれの測定日においても有意な増加が見られなかった。以上のことから、スギ花粉を抗原とした場合、DE曝露濃度 $0.3\text{mg}/\text{m}^3$ では、花粉症症状が増悪されないことが明らかになった。

背景・目的

近年、鼻炎や気管支喘息、花粉症等の呼吸性アレルギー疾患の罹患率は、増加する傾向にある¹⁻⁹⁾。特に日本における花粉症患者は、今や国民の10数%に及ぶ国民病となっており、大きな社会問題となっている¹⁰⁾。アレルギー疾患を引き起こす要因として、花粉飛散数やハウスダストなどの抗原の増加、衣食住におけるライフスタイルの変容、遺伝的要因などが考えられる。さらに呼吸性アレルギー疾患の罹患率は、都市部郊外より都市部に多いという傾向があり、アレルギー疾患と大気汚染との関連性が指摘されている。例えば、栃木県日光・今市地区における地域別花粉症患者数の調査によると、スギが密集している主要道路沿い(日光杉並木沿い)での花粉症患者数は、同等のスギ花粉が存在する街周辺のスギ林近くの地域や花粉の少ない道路沿道、スギのない山間部の患者数に比べて多いことが報告されている¹¹⁾。東京都杉並区の小学校の学童約700名を対象としたスギIgE抗体測定を含む調査では、幹線道路からの距離別にスギ抗体陽性率をみると、0-50m群では23.2%、50-100m群では15.0%、100m以上群では17.3%であり、沿道に近い群で陽性率が高い傾向を認めている¹²⁾。また、大気汚染濃度が異なり、スギ花粉の飛散数がほぼ同程度の宮崎、東大阪の事業所の従業員を対象とした花粉症症状、粘膜症状に関する調査では、花粉数が少なく大気汚染濃度の高い東大阪地域で花粉症症状が高率であることが報告されている¹³⁾。これらの結果は、花粉症発症率と自動車排気ガスなどによる大気汚染物質との関連を示唆するものである。

日本の自動車保有台数は1967年の約1000万台から1997年の約7000万台と過去35年間においておよそ7倍に増加した。その中でディーゼル車が占める割合は、およそ25%で約1800万台に達している。東京都衛生局によると、主要幹線道路沿道付近のSPM中に含まれるディーゼル排気粒子(Diesel exhaust particle: DEP)の割合は約44~73%であり、道路から離れた地域(後背地)では19~55%であった¹⁴⁾。また、東京都内の自動車排気ガスに由来する窒素酸化物の7割がディーゼル車から排出されるガスによ

て占められている。このことから、都市部における大気汚染の一つの原因としてディーゼルエンジンによる排気ガスが大きく関連しており、生体影響との関連性を調査することは重要である。また実際の花粉症症状において、抗原となるのは環境中に浮遊する花粉であり、その中で最も多いものはスギ花粉である。従って、実際にスギ花粉を抗原としたモルモット花粉症様病態モデルを用い、その生体影響を調べることは実際の疫学調査との関連を考える上で重要になると考えられる。

これまでの研究から、1.0、3.0mg/m³ディーゼル排気ガスの曝露下で抗原としてスギ花粉を繰り返しモルモットに点鼻投与するとくしゃみ、鼻汁等の花粉症症状を濃度依存的に増悪させることが見いだされている。しかし環境基準値が0.1mg/m³であることを考えると、これらの濃度は、高濃度であると考えられる。そこで今年度は、環境基準の3倍の濃度0.3mg/m³で設定し、同様の花粉症症状が増悪するかどうか検討した。花粉症症状として抗原投与後に誘発されるくしゃみ・鼻汁量、花粉症症状の機構の解析として抗原非投与下での物理的刺激に対する反応・スギ花粉特異的抗体価・好酸球の浸潤数・鼻粘膜上皮の損傷をそれぞれ指標とした。

材料と方法

1. 動物

日本 SLC 株式会社（浜松、日本）より雄性モルモットを、4 週齢で購入した。動物は一週間の馴化期間、温度 25 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %、明暗期 12 時間で飼育した。標準的モルモット餌である RC4（オリエンタル酵母コーポレーション 東京、日本）を使用し、餌、滅菌水とともに自由摂取させた。一週間の馴化期間後、5 週齢で実験に使用した。

2. 試薬

抗原としてスギ花粉（Japanese cedar pollen: JCP）を使用した。生理食塩水は大塚製薬株式会社（東京、日本）製を使用した。ペントバルビタール注射液は大日本製薬株式会社（大阪、日本）製を使用した。脱灰液（Decalcifying Soln. B）、Polyl-L-Lysin はナカライテスク株式会社（京都、日本）製を使用した。エバンスブルー色素、中性ホルマリン液、キシレン、エタノール、ホルムアミドは和光純薬工業株式会社（大阪、日本）製を使用した。パラフィン・ワックス、ヘマトキシリン、エオジンはサクラ精機株式会社（東京、日本）製を使用した。

3. 実験計画

実験計画を図 1 に示した。5 週齢のモルモットに、2 週間にわたり週一回ずつ、JCP+水酸化アルミニウム（Alum）懸濁液を計 2 回点鼻投与することにより感作した。その後、2 群（10 匹 / 群、8 匹 / 群）にわけ、最終感作後 1 週間ごとに 1 回計 11 回、それぞれに抗原として JCP+生理食塩水（Saline）もしくは生理食塩水（Saline）のみを両側鼻腔内に各 50 μl/kg 注入し、投与後 20 分間に誘発されるくしゃみ回数と鼻汁分泌量を測定した。曝露開始から 11 週目の測定終了 24 時間後に採取した血清を用いて、皮内反応によって JCP に特異的な IgG 抗体価、および IgE 抗体価を測定した。また、鼻部を摘出し、切片を作成し鼻中隔上皮および上皮下の組織学的観察を行った。

4. 曝露方法

国立環境研究所のガラス-ステンレス製曝露チャンバーを用いて曝露を行った。チャンバー内は、容積 2.4m³、換気回数 40 回 / h、温度 25 °C、湿度 55%、流速 1.41m/s の環境で行った。曝露 DEP の各濃度は 0.3mg/m³であった。

5. 点鼻投与

針の付いていない 1 ml シリンジ（SS-01T、テルモ株式会社、東京）を用い、仰向けに固定したモルモットの両側鼻腔内に投与した。JCP-Alum 懸濁液については、20mg / ml 水酸化アルミニウム-蒸留水 500 μl に JCP 60mg を懸濁したもの（12%JCP-Alum 懸濁液）を使用した。JCP-Saline 懸濁液は、0.9%-NaCl Saline

500 μ l に JCP 60mg を懸濁したもの(12%JCP-Saline 懸濁液)を使用した。JCP-Alum 懸濁液投与、JCP-Saline 懸濁液投与、Saline 投与ともに両側鼻腔内それぞれに 50 μ l / kg 投与した。

6. くしゃみ回数の測定

抗原投与後、20 分間において誘発されるくしゃみ回数を測定した。くしゃみ回数は、図 2 に示す首かせ式保定器によってモルモットを保定し、無麻酔下で、呼吸流速の急激な増加、肺内容量の減少、およびくしゃみの際の音声と肉眼的観察によって測定した。呼吸流速はニューモタコグラフ (no.3、Fleish、Instruments、Lausanne、Switzerland) を用いて、アンプ (carrier demodulator、model CD72、Validyne、Northridge、CA) を接続した差圧トランスデューサー (model MP4514、Validyne、Northridge、CA) でニューモタコグラフ前後の差圧を測定することにより求めた。肺内容量の変化は首以下の体部の体積変化を、箱内圧を差圧トランスデューサーで測定し、指標とした。また、くしゃみの音声はモルモットの口の前に小型マイクロフォン (RP3102、日本光電工業株式会社、東京) を置き、スピーカー (RX-D12、松下電器産業株式会社、大阪府) により拡声することにより確認した。

7. 鼻汁量の測定

抗原投与後、20 分間に鼻孔外に放出された鼻汁量を、あらかじめ重量を量っておいたキムワイブに吸収させ重量の増加を測定し、鼻汁分泌の指標とした。

8. 抗体価の測定

曝露開始から 11 週目の抗原投与 24 時間後に、腋窩動静脈より血液を採取した。採取した血液は、3500rpm で 20 分間遠心し、血清を分画した。ペントバルビタールナトリウム注射液を 45mg / kg で腹腔内投与し、麻酔したモルモットの背部に倍々希釈した血清 (IgG 抗体価測定の場合 $\times 256$ 、 $\times 128$ 、 $\times 64$ 、 $\times 32$ 、 $\times 16$ 、 $\times 8$ 。IgE 抗体価測定の場合 $\times 64$ 、 $\times 32$ 、 $\times 16$ 、 $\times 8$ 、 $\times 4$ 、 $\times 2$ のそれぞれの濃度に調製した。) を 100 μ l ずつ皮内投与した。IgG および IgE 抗体価は、血清の皮内投与後それぞれ 4 時間および 1 週間後に 1%エバンスブルー色素 0.05%JCP 生理食塩水溶液を 1000 μ l / kg 静脈内投与し 30 分後、皮内に漏出した色素を、ホルムアミド 5ml を用い、60、48 時間で溶出させた。溶出させた色素量は、650nm の吸光度を分光光度計 (U2000 日立、東京) により測定した。

9. 組織学的検討

11 回目の最終抗原投与 24 時間後に採取した鼻部組織から、筋肉や皮膚を除去し、ホルマリン固定した。約 1 ヶ月のホルマリン固定後、脱灰液 (Decalcifying Soln. B) による 1 ヶ月間ずつの脱灰を 2 度行った。脱灰した組織を図 3 a の部分で切り出し、切片として TP1050 (Leica、Germany) で前処理した後、Histo Embedder (CV5000 Leica、Germany) を用い、パラフィン包埋した。マイクローム (RM2155 Leica、Germany) を用いて作成した 5 μ m の厚さの薄切切片を、1% Poli-L-Lysin を塗布したスライドグラス (松浪硝子工業株式会社、大坂) に張り付け、Auto Stainer XL (Leica、Germany) によってヘマトキシリン-エオジン染色した。好酸球の浸潤数は光学顕微鏡 (BX50、オリンパス) を用いてビデオマイクロメーター (オリンパス) により、鼻中隔上皮および上皮 (図 3 b) の単位面積あたりの数を計測した。

10. 統計処理

値は平均値 \pm 標準誤差で示した。JCP 抗原投与群において DE 曝露個体と Air 曝露個体との有意差比較検討は、Student の t 検定を用いて行った。p < 0.1、0.05 をそれぞれ傾向および有意差とした。

結果

1. DE 曝露下での生理食塩水または抗原投与がくしゃみ回数に及ぼす影響

DE 曝露下での生理食塩水投与がくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を図 4 に示した。清浄空気曝露群に対し、0.3mg/m³ DE 曝露群においては、いずれの生理食塩水投与回数においても有意差は見られなか

った。

また、DE 曝露下での抗原投与がくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を図5に示した。いずれの曝露群においても、抗原投与回数にほぼ依存してくしゃみ回数が増加する傾向を示した。清浄空気曝露群に対し、0.3mg/m³ DE 曝露群においては、いずれの抗原投与回数においても有意差が見られなかった。

2. DE 曝露下での生理食塩水または抗原投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響

DE 曝露下での生理食塩水投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響を検討した結果を図6に示した。清浄空気曝露群に対し、0.3mg/m³ DE 曝露群においては、いずれの生理食塩水投与回数においても有意差は見られなかった。

また、DE 曝露下での抗原投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響を検討した結果を図7に示した。いずれの曝露群においても、抗原投与回数にほぼ依存してくしゃみ回数が増加する傾向を示した。清浄空気曝露群に対し、0.3mg/m³ DE 曝露群においては、いずれの抗原投与回数においても有意差が見られなかった。

考察

DE 曝露下での抗原投与がくしゃみ回数、鼻汁分泌量に及ぼす影響を検討した結果、くしゃみ回数、鼻汁分泌量ともに清浄空気曝露群と比較して有意な増加が見られなかった。(図5、7)。また物理的な刺激に対する反応性を検討するために、抗原の代わりに生理食塩水を繰り返し投与した場合には、くしゃみ回数・鼻汁分泌量ともにその反応性が低く有意差も見られなかった(図4、6)。これまでの研究から、1.0及び3.0mg/m³ DE 曝露下でスギ花粉を抗原として繰り返し投与した際、くしゃみ回数及び鼻汁分泌量は、DE 濃度依存的に増加し、かついずれも清浄空気曝露群と比較して有意に増加することが見出されている。しかし今回設定したDE濃度は0.3mg/m³であり、くしゃみや鼻汁のような花粉症症状の増悪が認められなかったことから、閾値以下であることが考えられる。一方、卵アルブミン(OVA)を抗原とした研究では、0.3mg/m³のDE濃度でくしゃみ回数・鼻汁分泌量を増加させることが報告されている¹⁵⁾。このことは、OVAに比べ、スギ花粉の花粉症症状の惹起能は弱いということを示唆している。

以上のことから、スギ花粉を抗原とした場合、0.3 mg/m³ DE曝露群においてくしゃみや鼻汁等の花粉症症状の増悪は認められなかった。

参考文献

- 1) United Nations Environment Programme. Air pollution in the world's megacities. Environ 1994;36:5-37
- 2) American Thoracic Society. Health effects of outdoor air pollution. Part 1. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:3-50.
- 3) Lebowitz MD. Epidemiological studies of the respiratory effects of air pollution. Eur Respir J 1996;9:1029-1054
- 4) Gielen MH, Van der Zee SC, Van Eijnen JH, Van Steen CJ, Brunekreef B. Acute effects of asthmatic children. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:2105-2108.
- 5) Pope CA. Mortality and air pollution: association persists with continued advances in research methodology. Environ Health Perspect 1999;107:613-614
- 6) G.D·Amato, G.Liccardi, M.D·Amato, M.Cazzola :Respiratory allergic diseases induced by outdoor air pollution in urban areas. Monaldi Arch Chest Dis 2002;57:3-4,161-163.
- 7) G.D·Amato :Urban air pollution and respiratory allergy. Monaldi Arch Chest Dis 2002;57:2,136-140
- 8) G.D·Amato :Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. Allergy 2002;Volume:57(Suppl.72):30-33
- 9) T.Schafer, J.Ring :Epidemiology of allergic diseases. Allergy 1997;52 (suppl 38):14-22
- 10) Okuda, M :Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. Ann Allergy Asthma Immunol. 2003;91:288-296.

- 1 1) Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy* 1987;58:265-70
- 1 2) 逢坂文夫, 他: 学童における血清スギ IgE 抗体と居住環境との関係について. *アレルギー*, vol 36;72-80, 1987
- 1 3) 常俊義三 : 花粉症の素因等に関する研究. 平成 12 年度環境省委託業務結果報告書「大気汚染と花粉症の相互作用に関する基礎的調査研究」 財団法人 日本公衆衛生協会 平成 13 年 2 月
- 1 4) 「ディーゼル車排気ガスと花粉症の関連に関する調査委員会 報告書」東京都衛生局 平成 15 年 5 月
- 1 5) Kobayashi T : Exposure to Diesel Exhaust Aggravates Nasal Allergic Reaction in Guinea Pigs. *Am J Respir Crit Care Med* vol 162.pp352-356,2000.

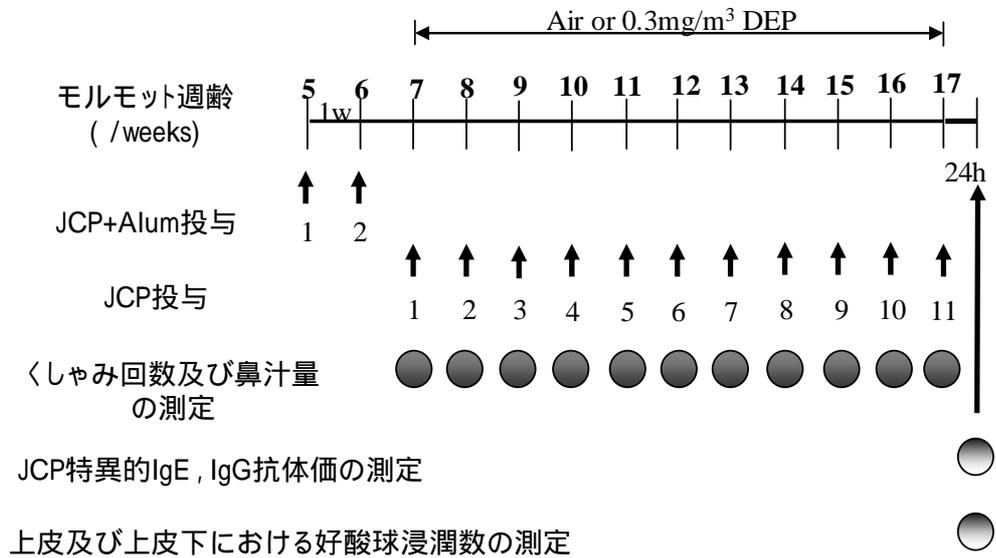


図1 実験計画

5週齢の雄性Hartley系モルモットを使用した。最初の2週間、週1回ずつ計2回JCP+Alumを点鼻投与した。JCP+Alum投与から11週間は2群にわけ、フィルターを通した清浄な空気、0.3 mg/m³DEPを含むDEをそれぞれ曝露した。この間、各群をさらに2群にわけJCP+SalineもしくはSalineのみを週一回50 μl/kgで点鼻投与した。週1回の抗原投与後20分間に誘発されるくしゃみ回数、および鼻汁分泌量をアレルギー反応の指標とした。最後の抗原投与から24時間後にモルモットから血清を採取し皮内反応を用いてJCPに特異的なIgG抗体価、IgE抗体価を求めた。また、モルモットから鼻部を摘出し、切片を作成して鼻中隔上皮または上皮下の組織学的観察を行った。

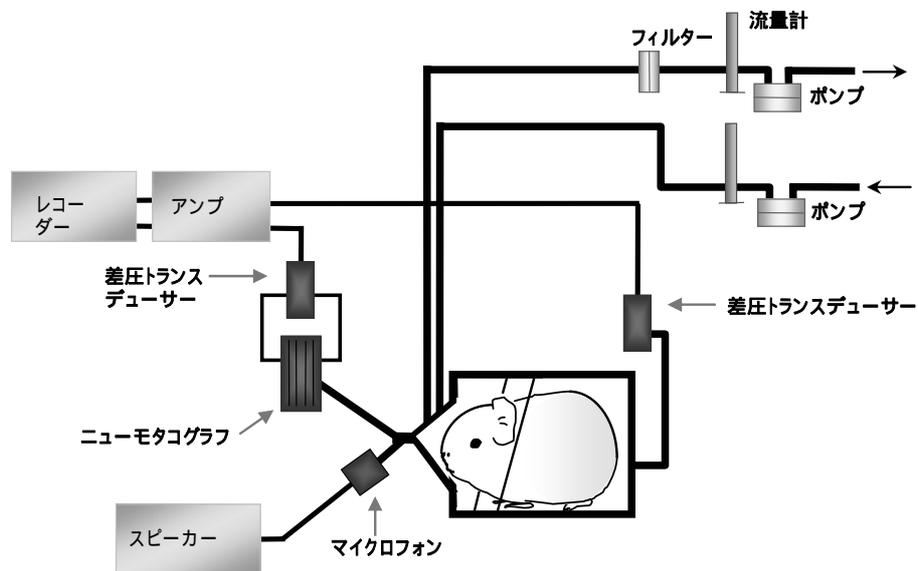


図2 くしゃみ反応測定装置

くしゃみ回数の測定は、モルモットを首かせ式固定器で固定し、無麻酔下で行った。呼吸流速はニューモタコグラフを用い、アンプを接続した差圧トランスデューサーで差圧を測定することによって求めた。肺内容量の変化は首以下の体部の体積変化を指標とした。くしゃみの音声は、モルモットの口の前に小型マイクを置き、スピーカーによって確認した。

切片作成部位

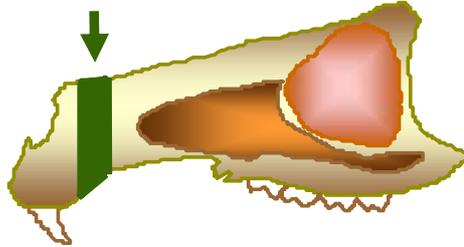
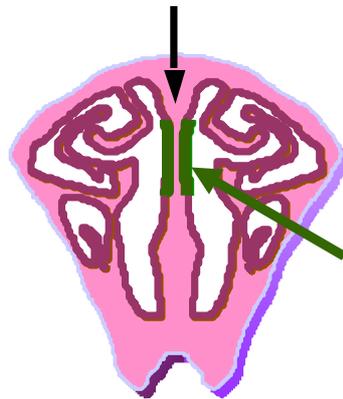


図3a モルモット上部頭蓋骨

鼻中隔



好酸球浸潤数測定部位

図3b 組織切片図

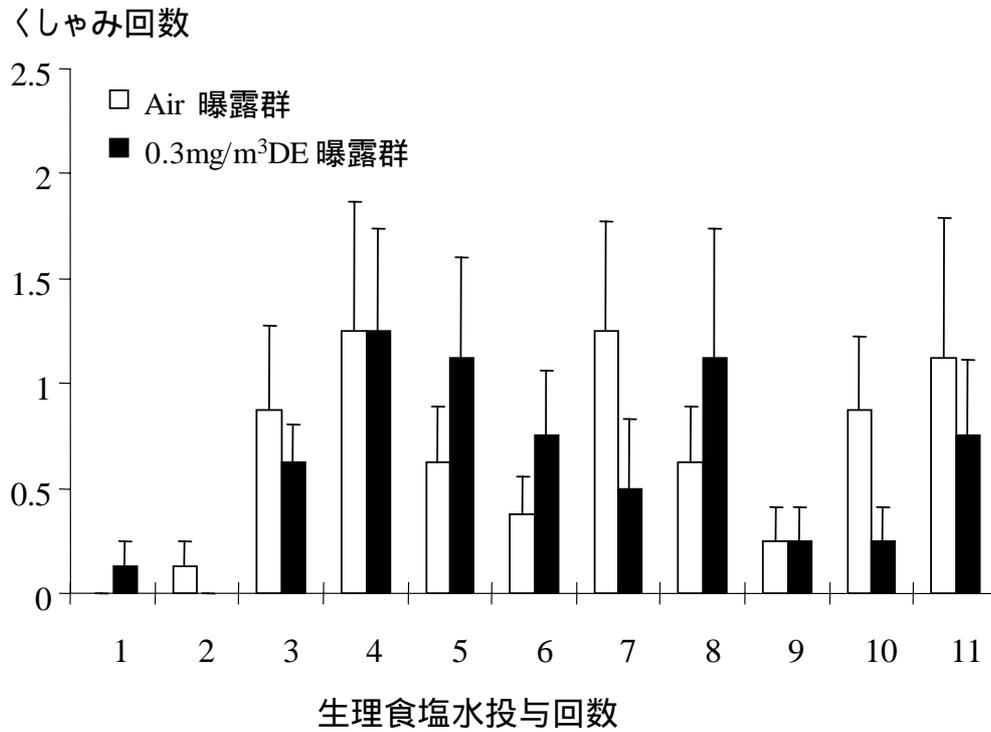


図4 DE曝露下での生理食塩水投与がくしゃみ回数に及ぼす影響

DE曝露下での生理食塩水投与がくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群と0.3mg/m³ DE 曝露群との間では有意差は見られなかった。

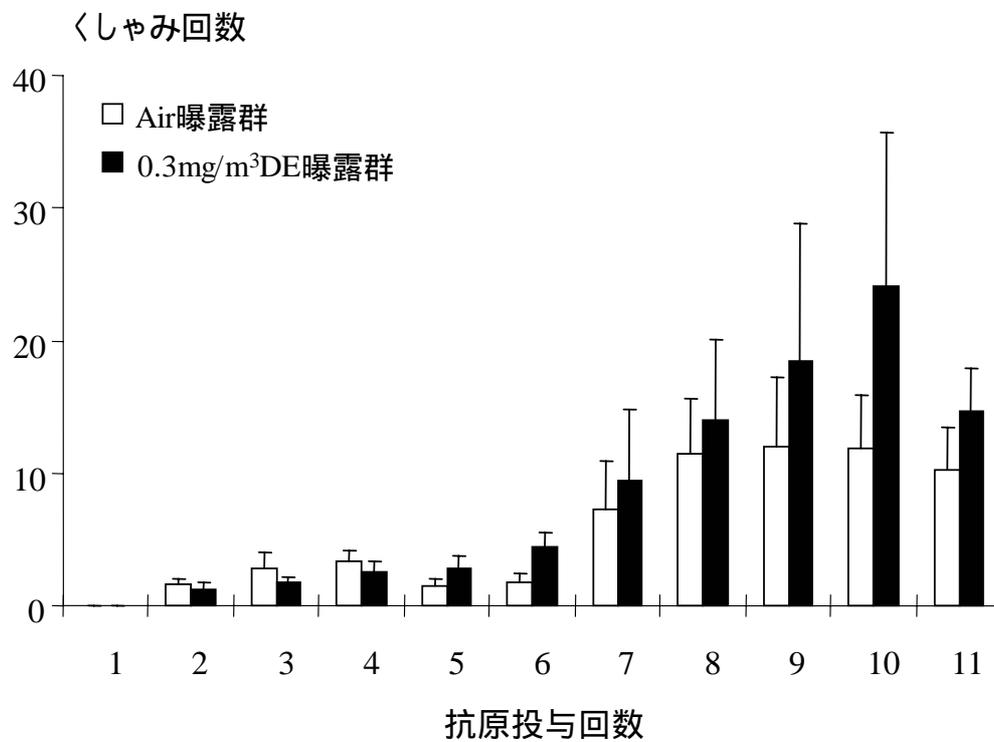


図5 DE曝露下での抗原投与がくしゃみ回数に及ぼす影響

DE曝露下での抗原投与がくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群と0.3mg/m³ DE曝露群との間では有意差は見られなかった。

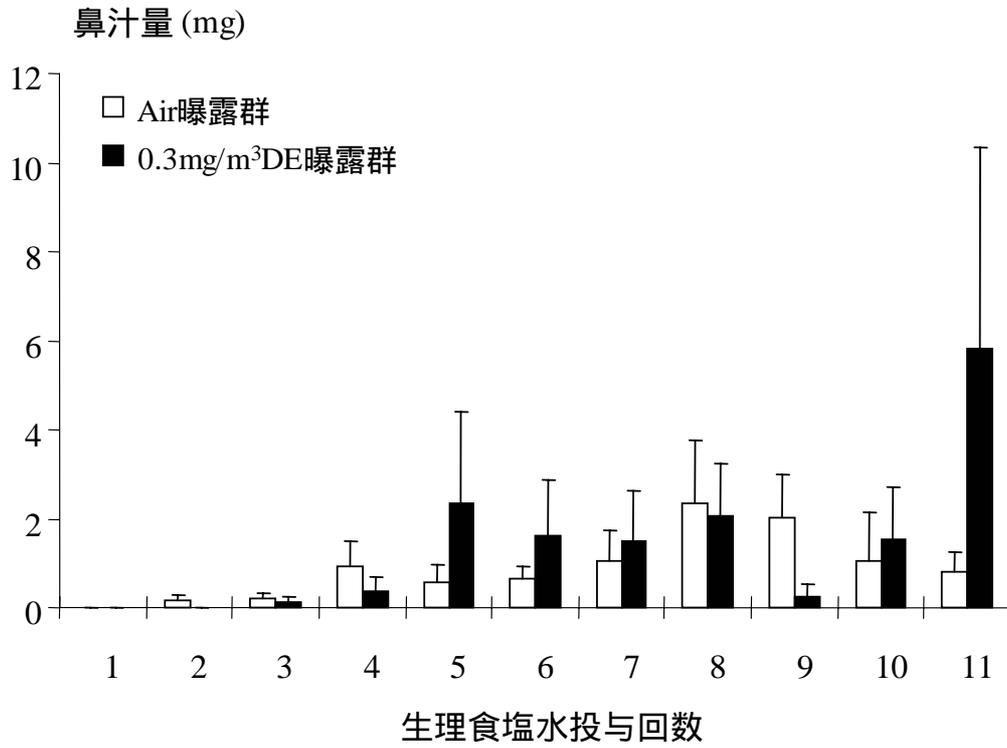


図6 DE曝露下での生理食塩水投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響

DE曝露下での生理食塩水投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群と0.3mg/m³DE曝露群との間では有意差は見られなかった。

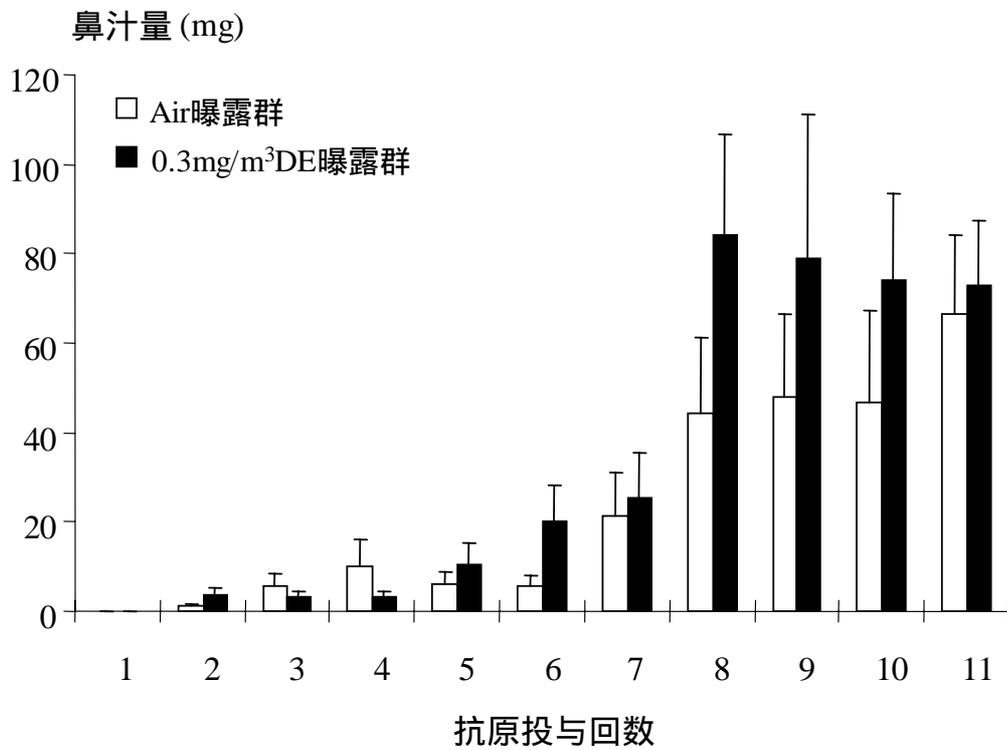


図7 DE曝露下での抗原投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響

DE曝露下での抗原投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群と0.3mg/m³ DE曝露群の間では有意差が見られなかった。