

(2-1) ディーゼル排気曝露がスギ花粉症様病態におよぼす影響

小林隆弘(国立環境研究所), 青柳 元(東邦大学理学部), 飯嶋麻里子(筑波大学医学系)

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.そこで本実験では,大気汚染の中で特にアレルギー症状との関連が大きいとされる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増悪させるかどうか動物を用いて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.初めの3週間の清浄空気内飼育後,8週間にわたりフィルターを通した清浄空気,1および3mg/m³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8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.

くしゃみ回数は,1および3mg/m³ DE曝露群いずれにおいても清浄空気曝露群と比較して有意な増加が見られた.鼻汁分泌量においても1および3mg/m³ DE曝露群ともに有意な増加が見られた.また,JCP特異的抗体価については,IgG抗体価では1mg/m³ DE曝露群で有意差が見られ,IgE抗体価では3mg/m³ DE曝露群で増加傾向が見られた.好酸球浸潤数についての検討では,上皮における浸潤数は3mg/m³ DE曝露群で有意な増加が見られた.上皮下における浸潤数は,1および3mg/m³ DE曝露群いずれにおいても有意な増加が見られた.これらのことから,DE曝露は,清浄空気曝露と比較して花粉症様病態を増悪させることが明らかとなった.また,増悪作用はDE濃度に依存していることが確認された.このアレルギー反応の増悪作用は,DE曝露による鼻粘膜上皮組織の損傷,スギ花粉特異的抗体価の増加,好酸球浸潤数の亢進によることが示唆された.

はじめに

近年、鼻炎や気管支喘息、花粉症といった呼吸性アレルギー疾患の罹患率は多くの工業先進国において急激に増加している(1-9)。この原因として、多くの可能性が考えられる。例として、衛生環境の改善による幼少期の感染症などの罹患率の低下、居住空間の密閉化、食環境の変化、慢性的な運動不足、遺伝的な要因、大気汚染による有害物質の増加などがあげられる。また、何らかの呼吸性アレルギー疾患を経験した人々は、都市部郊外に住む人々よりも都市部に住む人々の方が多いという傾向がある。このことから大気汚染とアレルギー疾患との関連性が注目されており、多くの調査が行われている。

日本における大気汚染と呼吸性アレルギー症状の関連について様々な疫学調査が行われている(10-14)。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、その因果関係を調査する事は重要である。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(12)。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(13)。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(14)。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。

しかし一方で、大気汚染物質と花粉症等アレルギー疾患増加との間の関連性を疑問視する疫学報告も存在する。ドイツにおける調査によると、旧東ドイツ地域と旧西ドイツ地域では、大気汚染が深刻である旧東ドイツ地域よりも、より生活水準が高く大気汚染が改善されている旧西ドイツ地域のほうがアレルギー症状などの罹患率が高いことを報告している(15-17)。この場合、食事内容、住環境、衛生環境などの因子が罹患率に影響を及ぼしている可能性がある。日本や欧米諸国における生活水準、大気汚染状況は旧西ドイツ地域と似ており、実際に環境因子との関連を調べるためにはさらなる検討が必要となる。

このように相反する疫学調査の結果が報告されている。従って、実際に動物を用いた実験系を確立し、その影響を調査することが必要となる。

日本は第2次世界大戦後、著しい経済発展とともに深刻な大気汚染が大きな社会問題となった。この対策として、大気汚染防止法の制定(1968(昭和43)年)、大気環境基準の設定(1969(昭和44)年より順次)、大気汚染物質の排出規制、全国的な大気汚染モニタリングの実施等の結果、産業型である硫黄酸化物(SO_x)や一酸化炭素(CO)による汚染は大幅に改善された。しかし、近年の自動車保有台数・自動車交通量の増加から、窒素酸化物(NO_x)及び粒子状物質(Suspended particulate

matter: SPM) といった都市・生活型による汚染は、依然として横ばい傾向であり大きな課題となっている。

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年間に於いておよそ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(18)。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って占められている。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。

ディーゼル排気ガスが花粉症様病態に及ぼす影響について、動物を用いた実験を行ったこれまでの研究報告では、すでに卵白アルブミン(OVA)を抗原としたモルモット花粉症様病態モデルがディーゼル排気ガス(diesel exhaust: DE)によってその花粉症症状が増悪されることを示している(19)。しかし、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。

ところが、スギ花粉を抗原とした場合でのDEによる影響の調査はこれまでに行われていなかった。これは、スギ花粉自体を抗原として用いた場合、抗原となるタンパク質等は花粉表皮の中に存在し、溶出までに時間を要することや、溶出しきれなかったものが存在し、結果として感作しにくいという特徴があるためである。そこで本研究では、できるだけ感作を成立させるために、アジュバントと抗原の点鼻投与を行い、さらに抗原投与量を増加させて花粉症様病態モデルを作成し、ディーゼル排気ガスがスギ花粉を抗原とした花粉症様病態に対しどのような影響を及ぼすかを検討した。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

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 ，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-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．

方法

1 実験計画

実験計画を Fig.1 に示した．4 週齢で導入したモルモットを 1 週間馴化期間を置き 5 週齢とし，それから 2 週間にわたり週一回ずつ事前感作のために JCP+水酸化アルミニウム（Alum）懸濁液を全てのモルモットに点鼻投与した．その後，初めの 3 週間にわたり全てのモルモットをフィルターを通した清浄な空気内で飼育し，続く 8 週間にわたり 3 群（16 匹 / 群）にわけ，フィルターを通した清浄な空気， $1\text{mg}/\text{m}^3\text{DEP}$ ， $3\text{mg}/\text{m}^3\text{DEP}$ 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をさらに 2 群（10 匹 / 群，6 匹 / 群）にわけ（Fig.2），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 $50 \mu\text{l}/\text{kg}$ 注入し，20 分以内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 8 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．

2 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 2.4m^3 換気回数 40 回 / h 温度 25.5 ± 0.7 湿度 $55.4 \pm 6.8\%$ ，流速 $1.41\text{m}/\text{s}$ の環境で行った．曝露 DEP の各濃度は $3 \pm 0.03 \text{mg}/\text{m}^3$ ， $1 \pm 0.02 \text{mg}/\text{m}^3$ であった．

3 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 μ l 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.

4 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, Fig.3 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.

5 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.

6 抗体価の測定

曝露開始から 8 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.

7 組織学的検討

8 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 Fig. 4a 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。ミクロトーム(RM2155 Leica, Germany)を用いて作成した 5 μm の厚さの薄切切片を、1% Poli-L-Lysin を塗布したスライドガラス(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下(Fig. 4b)の単位面積あたりの数を計測した。

8 統計学的検討

値は平均値 ± 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 Fig. 5 に示した。清浄空気曝露群に対し、1 および 3mg/m³ DE 曝露群いずれ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 Fig. 6 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した。清浄空気曝露群に対し、1mg/m³ DE 曝露群において抗原投与 9, 10 週目において有意な増加が見られ、3mg/m³ DE 曝露群においては抗原投与 8, 9, 10, 11 週目において有意な増加が見られた。1mg/m³ DE 曝露群と 3mg/m³ DE 曝露群のくしゃみ回数の比較では、両者の間で傾向、有意差ともに見られなかった。

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 Fig. 7 に示した。清浄空気曝露群に対し、1 および 3mg/m³ DE 曝露群いずれ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 Fig. 8 に示した。清浄空気曝露群に対し、1mg/m³ DE 曝露群において抗原投与 10 週目において有意な増加が見られ、11 週目においても増加傾向が見られた。3mg/m³ DE 曝露群においては 5, 6, 9, 10 週目において有意な増加が見られた。濃度依存差については、ほぼ各回の抗原投与回において 3mg/m³ DE 曝露群が高く、さらに 1mg/m³ DE 曝露群に対して 3mg/m³ DE 曝露群を比較検討した結果、抗原投与 9 週目において増

加傾向が見られた。このことから，DE 曝露下で抗原投与における鼻汁分泌量は DE 濃度依存的に増加する傾向のあることが明らかとなった。

3 DE 曝露による鼻粘膜上皮に及ぼす損傷の検討

DE 曝露下での生理食塩水投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響を Fig.9 に示した。清浄空気曝露群に対し，DE 曝露群において鼻粘膜の損傷が見られ，その損傷の度合いは DE 濃度依存的であった。

また，DE 曝露下での抗原投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響を Fig.10 に示した。清浄空気曝露群に対し，DE 曝露群において鼻粘膜の損傷が見られた。損傷の度合いについては，DE 濃度依存的であり，生理食塩水投与群と比較してさらに大きい損傷であることが確認された。

4 DE 曝露下での抗原投与が抗体産生に及ぼす影響

DE 曝露下での抗原投与が IgG 抗体産生に及ぼす影響を検討した結果を Fig.11 に示した。清浄空気曝露群に対し，1mg/m³ DE 曝露群において有意な増加が見られたが，3mg/m³ DE 曝露群においては有意差が見られなかった。

また，DE 曝露下での抗原投与が IgE 抗体産生に及ぼす影響を検討した結果を Fig.12 に示した。清浄空気曝露群に対し，1 および 3mg/m³ DE 曝露群の有意な増加は見られなかったが，3mg/m³ DE 曝露群においてその増加傾向が見られた。

5 DE 曝露下での抗原投与が好酸球浸潤に及ぼす影響

DE曝露下での生理食塩水投与が鼻中隔上皮の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果をFig.13に示した。清浄空気曝露群に対し，1および 3mg/m³ DE曝露群ともに有意な増加が見られなかった。

また，DE 曝露下での抗原投与が鼻中隔上皮の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果を Fig.14 に示した。清浄空気曝露群に対し，3mg/m³ DE 曝露群において有意な増加が見られ，鼻中隔上皮における好酸球浸潤数は DE 濃度依存的であった。

次に，DE曝露下での生理食塩水投与が鼻中隔上皮下の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果をFig.15に示した。清浄空気曝露群に対し，1および 3mg/m³ DE曝露群ともに有意な増加が見られなかった。

また，DE 曝露下での抗原投与が鼻中隔上皮下の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果を Fig.16 に示した。清浄空気曝露群に対し，1 および 3mg/m³ DE 曝露群ともに有意な増加が見られた。鼻中隔上皮下の好酸球浸潤数についても，DE 濃度依存的であった。

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た (Fig.7, 8). 特に鼻汁分泌量の増加については，ほぼ各回の抗原投与後において DE 濃度に依存する傾向が見られた (Fig.8). これらの反応について，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の結果を見ると，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 (Fig.5, 7). OVA を抗原とした研究においても，DE 曝露がくしゃみ回数・鼻汁分泌量を増加させることが報告されている (19). スギ花粉を抗原として繰り返し投与した本研究の結果からも，DE 曝露は花粉症様病態を増悪させ，その効果は DE 濃度に依存しているということが明らかとなった。

このアレルギー反応の増悪作用の要因としては，DE曝露による鼻粘膜の過敏性，鼻粘膜上皮の損傷，抗原特異的抗体価の上昇や炎症細胞の浸潤等の可能性が考えられる。

鼻粘膜の物理的的刺激に対する反応性については，生理食塩水投与群の影響を指標とした。DE曝露下での生理食塩水投与ではくしゃみ回数，鼻汁分泌量ともに反応性は低く，清浄空気曝露群と比較して有意差も見られなかった (Fig.5, 7). この結果から DE曝露は鼻粘膜上皮の物理的的刺激に対する反応性を亢進しなかった。しかし，DE曝露動物にヒスタミンを投与することによって，鼻腔や気道の反応性が亢進すること (20, 21) や，NO₂，O₃，SO₂，硫酸エアロゾルなど他の大気汚染物質によっても鼻腔や気道の過敏性が高められること (22) が報告されている。このことから，DEを含む大気汚染物質は鼻粘膜の反応性を高め，アレルギー反応を引き起こす可能性があると考えられることから，今後物理的刺激のより強いヒスタミン等を用いてさらに検討を行う必要がある。

DE曝露下での生理食塩水投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響を検討した結果，清浄空気曝露群に対しDE曝露群において鼻粘膜上皮の損傷が見られた (Fig.9). また，DE曝露下での抗原投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響を検討した結果においても，DE曝露群において鼻粘膜上皮の損傷が見られた (Fig.10). 生理食塩水投与群，抗原投与群ともにDE濃度依存的に損傷が亢進し，特に抗原投与群においては，その損傷度合いが生理食塩水投与群に比べ大きくなっていった。これらの結果から，DE曝露のみでも鼻粘膜上皮への損傷が起こり，さらに抗原を投与することによってその損傷が大きくなりアレルギー反応が増悪することが明らかとなった。DE曝露によって鼻粘膜上皮が損傷を受けると，鼻粘膜上皮の透過性が亢進され，抗原がより上皮を通過しやすくなると考えられる。その結果，抗原特異的抗体産生が亢進し，さらにサイトカイン等の作用によって炎症性細胞の浸潤がおこりさらなる組織の損傷が起こることが示唆された。

抗体価については、抗原投与群でのスギ花粉特異的IgG、IgE抗体価について検討した。IgG抗体価について検討した結果、清浄空気曝露群と比較して、1mg/m³ DE曝露群において有意な増加が見られた (Fig.11)。またIgE抗体価については、1および3mg/m³ DE曝露群ともに有意差は見られなかったが、3mg/m³ DE曝露群においてはp=0.581となり、増加傾向が見られた (Fig.12)。

これまでに報告されているマウスを用いた実験では、DEPのアジュバント作用(23, 24)や、DE曝露によるIL-4やIL-10の増加、IFN- γ の減少を通じて、抗原特異的IgE抗体の産生が促進されることが示されている(25)。モルモットにおける花粉症症状の主な抗体はIgG抗体であり(26)、マウスやヒトとの種の相違はあるが、今回の実験においてもTh2活性型サイトカイン等の増加によって抗体産生の亢進が起こったと考えられる。DE曝露によって起こるサイトカイン等の増加について、詳細な機構は明らかになっていないが、DE曝露による一連の抗体産生の亢進がアレルギー反応の増悪に深く関連していると考えられる。また、抗体価の増加傾向はDE濃度に依存的であったことから、高濃度のDEはそのアレルギー反応の増悪作用も大きいことが明らかとなった。

抗原抗体反応が起きると、マスト細胞やリンパ球から様々なサイトカインやケモカインが産生・分泌され、それらの作用によって好酸球や好中球、マクロファージなどの炎症性細胞が鼻粘膜組織に浸潤してくる(27, 28)。特に好酸球は、遅延反応において最も大きな役割を果たしていることが知られている(29, 30)。

好酸球は骨髄由来の顆粒球で、その顆粒にはアルギニンに富む塩基性タンパクを含んでいる。好酸球は有害な顆粒タンパクやフリーラジカルを放出することが知られており、これは微生物や寄生虫を攻撃する一方で、組織傷害の原因ともなる(31, 32)。また、プロスタグランジンやロイコトリエン、サイトカインの産生は、さらに別の炎症性細胞や上皮細胞を活性化して炎症反応を増幅することが知られている(32)。

本研究では、鼻中隔上皮および上皮下における好酸球の浸潤数は、生理食塩水投与群において1および3mg/m³ DE曝露群ともに清浄空気曝露群と比較して有意差が見られなかった (Fig.13, 15)。これに対し、抗原投与群における鼻中隔上皮では、3mg/m³ DE曝露群で有意差がみられ、上皮下においては、1および3mg/m³ DE曝露群ともに有意に増加した (Fig.14, 16)。このことから、DE曝露による鼻粘膜上皮の損傷により、抗原が上皮を通過しやすくなることや、マスト細胞やリンパ球から放出されるサイトカイン等の増加によって好酸球の浸潤が亢進したと考えられる。その結果、浸潤した好酸球による血管拡張作用や血管透過性亢進作用、平滑筋収縮作用によって炎症反応が起こり、各種の顆粒タンパクによる組織傷害が起こったものと考えられる。また、OVAを抗原とした鼻アレルギー病態モデルにおいても、DEやNO₂、O₃曝露による鼻アレルギー反応の増悪に、鼻粘膜への好酸球の浸潤の増加が関連していることが報告されている(19, 33)。これらの報告は、アレルギー増悪作用の要

因として好酸球浸潤数の増加が関連しているという本研究の結果を支持するものである。

本研究の結果から，DE曝露がアレルギー反応を増悪させる機構として次のことが推察される（Fig.17）。

まず最初の段階として，DE曝露による鼻粘膜上皮の損傷が考えられる．今回の実験においては，DE曝露下での生理食塩水投与群におけるくしゃみ回数，鼻汁分泌量の有意な増加は見られず，物理的刺激に対する反応性の亢進は観察されなかった．しかし，組織学的検討では，鼻粘膜の損傷が確認された．この損傷によって，鼻粘膜の反応性や透過性が増加し，より抗原が上皮へ通過しやすい状態になると考えられる．

スギ花粉が鼻粘膜に付着し，抗原成分が溶出すると，それはマクロファージや樹状細胞によって取り込まれる．取り込まれた抗原の一部はMHCクラス 分子とともに抗原ペプチドとして細胞表面に提示され，ヘルパーT細胞がこれを認識する．抗原提示を受けたT細胞はその情報をB細胞に伝え，B細胞は形質細胞へと変化し，抗原特異的な抗体を産生する．ヘルパーT細胞は，Th1，Th2タイプの2つの相反する作用をもった種類があり，両者のバランスによって免疫系を担っている（34，35）．花粉症症状においては，これら二つの細胞のうちTh2細胞の作用が優勢に働いていると考えられている（36）．DE曝露により鼻粘膜上皮が損傷し，侵入する抗原量が増加することや，誘導されるサイトカイン等の液性因子によって，よりTh2細胞側に傾き，抗体産生量が増加することが示唆された．多量に産生された抗体はマスト細胞や好塩基球の表面に結合し，抗原によって架橋されると脱顆粒を起こし，ヒスタミン等の化学伝達物質を放出することで即時反応を引き起こしやすい状態にさせる．またロイコトリエンやプロスタグランジン，サイトカイン類を放出し，好酸球などの炎症性細胞の浸潤を誘発する（32）．これらの炎症性細胞の浸潤は，炎症反応を起こし，さらに組織傷害を引き起こす原因と考えられる．

以上の一連の過程によって，DEによるアレルギー反応の増悪が起きると考えられる．

結論

DE曝露はスギ花粉を抗原とした場合においても，くしゃみ，鼻汁といった花粉症症状を増悪させ，その効果はDE濃度依存的であることが確認された．その要因としては，DE曝露による鼻粘膜上皮の損傷やスギ花粉特異的抗体価の増加，好酸球浸潤の亢進があげられ，それらの効果によりアレルギー反応が増悪する可能性が示唆された．

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 . 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 Eijenen 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 Persepct 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.
- 11 Miyamoto T. :Epidemiology of pollution-induced airway disease in Japan. Allergy 1997:52(suppl 38):30-34.
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 von Mutius E, Fritzsck C, Weiland SK, Roell G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany:a descriptive comparison. Br Med J 1992;305:1395-1399.
- 16 Von Mutius E, Weiland SK, Fritzsck C, Duhne H, Keil U. Increasing prevalence

- of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 1998;351:862-866.
- 17 Nicolai T. Epidemiology of pollution-induced airway disease: urban/rural differences in East and West Germany. *Allergy* 1997;52(suppl 38):26-29.
 - 18 「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
 - 19 Kobayashi T :Exposure to Diesel Exhaust Aggravates Nasal Allergic Reaction in Guinea Pigs. *Am J Respir Crit Care Med* vol 162.pp352-356,2000.
 - 20 Kobayashi,T.& Ito,T. :Diesel exhaust particulates induce nasal mucosal hyperresponsiveness to inhaled histamin aerosol. *Fundam.Appl.Toxicol.* 27:195,1995.
 - 21 Kobayashi T. Ikeue T. Ito T. Ikeda A. Murakami M. Kato A. Maejima K. Nakajima T. and Suzuki T. :Short-Term Exposure to Diesel Exhaust Induces Nasal Mucosal Hyperresponsiveness to Histamine in Guinea Pigs. *Fundam.Appl.Toxicol* 38,166-172,1997.
 - 22 小林隆弘 : 大気汚染とアレルギー . 呼吸 , 14:342,1995.
 - 23 Muranaka,M., S. Suzuki, K. Koizumi,S. Takafuji, T. Miyamoto,R. Ikemori, and H. Tokiwa,1986. :Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J.Allergy Clin.Immunol.* 77:616-623.
 - 24 Takafuji S,MD. Suzuki S,MD. Koizumi K,MD. Tadokoro K,MD. Miyamoto T,MD. Ikemori R,MD. and Muranaka M,MD. :Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:639-45.
 - 25 Fujimaki H. Saneyoshi K. Shiraishi F. Imai T. Endo T. :Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology* 116 (1997) 227-233
 - 26 Allaith M, Weyer A, Havet N, Dumarey C, Vargaftig BB, Bachelet M.: Immunoglobulin-G-dependent stimulation of guinea-pig lung mast-cells and macrophages. *Allergy* 48 (8) : 608-614 Nov 1993.
 - 27 Beaven,M.A and Metzger,H.: Signal transduction by Fc receptors: theFc RI case. *Immunol. Today* 1993, 14:222-226.
 - 28 Sutton, B.J. and Gould, H.J.: The human IgE network. *Nature* 1993, 366:421-428.
 - 29 Charlesworth, E.N., Kagey Sobotka, A. Schleimer, R.P., Norman, P.S., and Lichtenstein, L.M.: Prednisone inhibits the appearance of inflammatory mediators and the influx of eosinophils and basophils associated with the cutaneous late-phase response to allergen. *J. Immunol.* 1991, 146:671-676.
 - 30 Liu, M.C., Hubbard, W.C., Proud, D., Stealey, B.A., Galli, S.J., Kagey Sobotka, A., Bleecker, E.R., and Lichtenstein, L.M.: Immediate and late

- inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1991, 144:51-58.
- 31 Gounni AS, Lamkhioused B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M.: High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature.* 1994 Jan 13;367 (6459) :183-6.
 - 32 Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM.: The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med.* 1993;44:85-101.
 - 33 Iijima, M. Kobayashi, T., Kamada, H., et al. :Exposure to ozone aggravates nasal allergy like symptoms in guinea pigs. *Toxicol.Lett.*, 123:77,2001.
 - 34 『免疫生物学 - 免疫系の正常と病理- 』原書第3版 笹月健彦 監訳 南江堂
 - 35 『スタンダード免疫学』 小林芳郎 編 丸善株式会社
 - 36 Romagnani S.: Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol.* 1994 Dec;6 (6): 838-46.

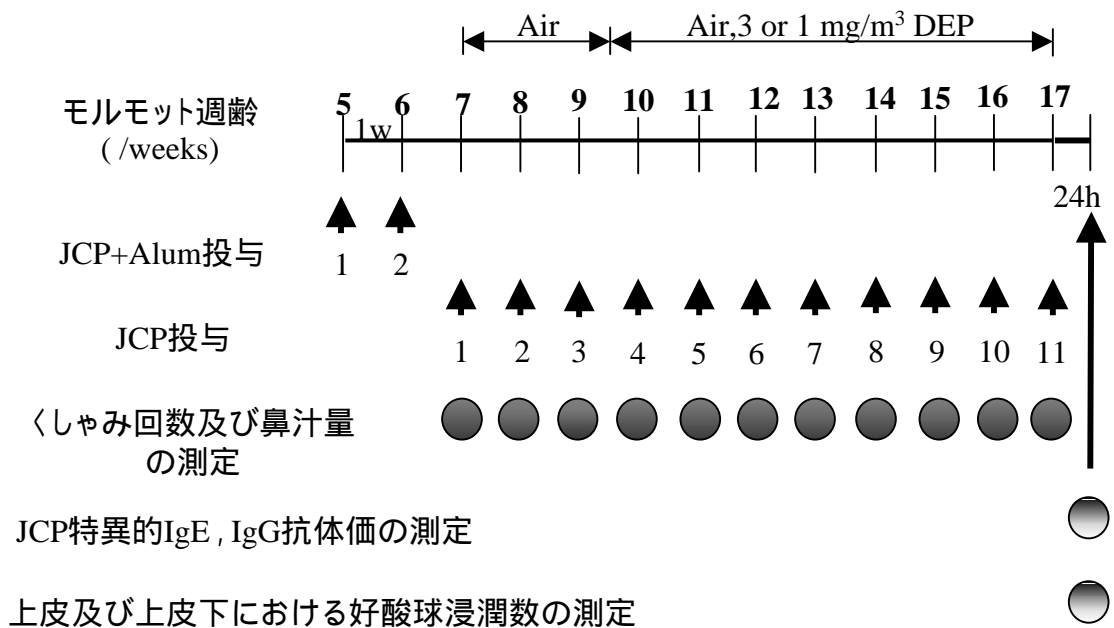


Fig.1 実験計画

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3週間フィルターを通した清浄な空気を全てのモルモットに曝露した。続く8週間は3群にわけ、フィルターを通した清浄な空気、1 mg/m³DEP、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。

抗原投与群(JCP + Saline)

Air	→	10匹
1mg/m ³ DE	→	10匹
3mg/m ³ DE	→	10匹

抗原非投与群(Saline)

Air	→	6匹
1mg/m ³ DE	→	6匹
3mg/m ³ DE	→	6匹

Fig.2 実験群とそのモルモット使用匹数

抗原投与群(JCP+Saline)については、Air、1または3mg/m³ DE曝露群それぞれ10匹、生理食塩水投与群(Saline)ではAir、1または3mg/m³曝露群それぞれ6匹を使用した。

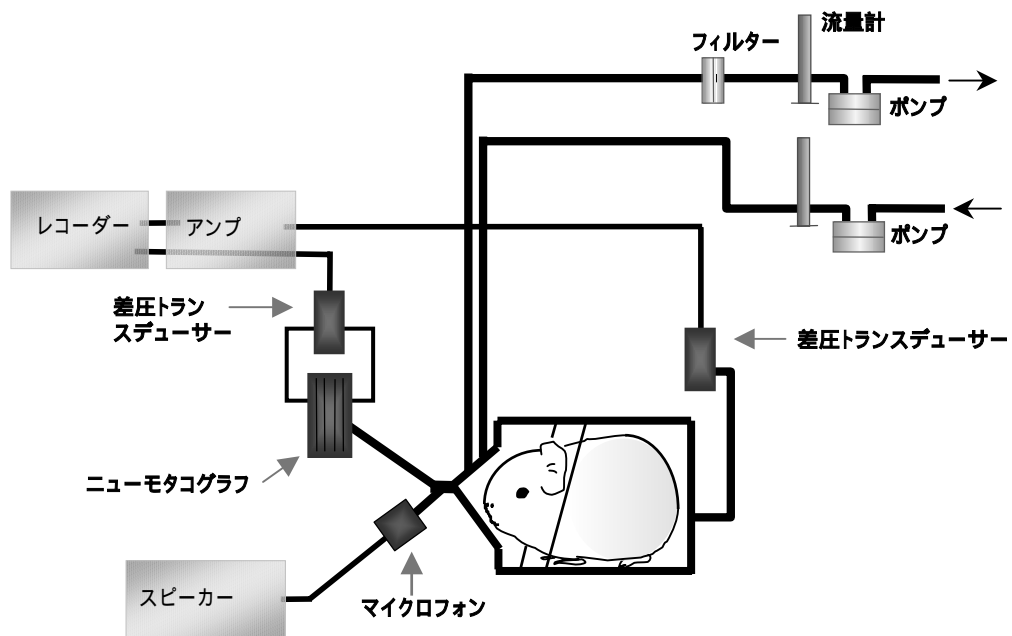


Fig.3 くしゃみ反応測定装置

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ロフォンを置き、スピーカーによって確認した。

切片作成部位

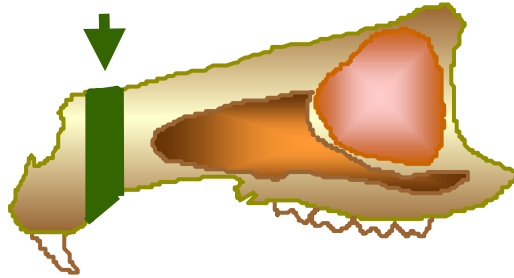


Fig.4 a モルモット上部頭蓋骨

鼻中隔

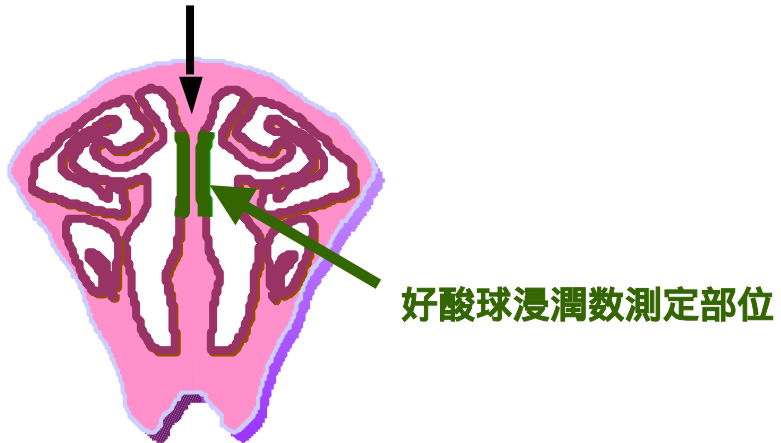


Fig.4b 組織切片図

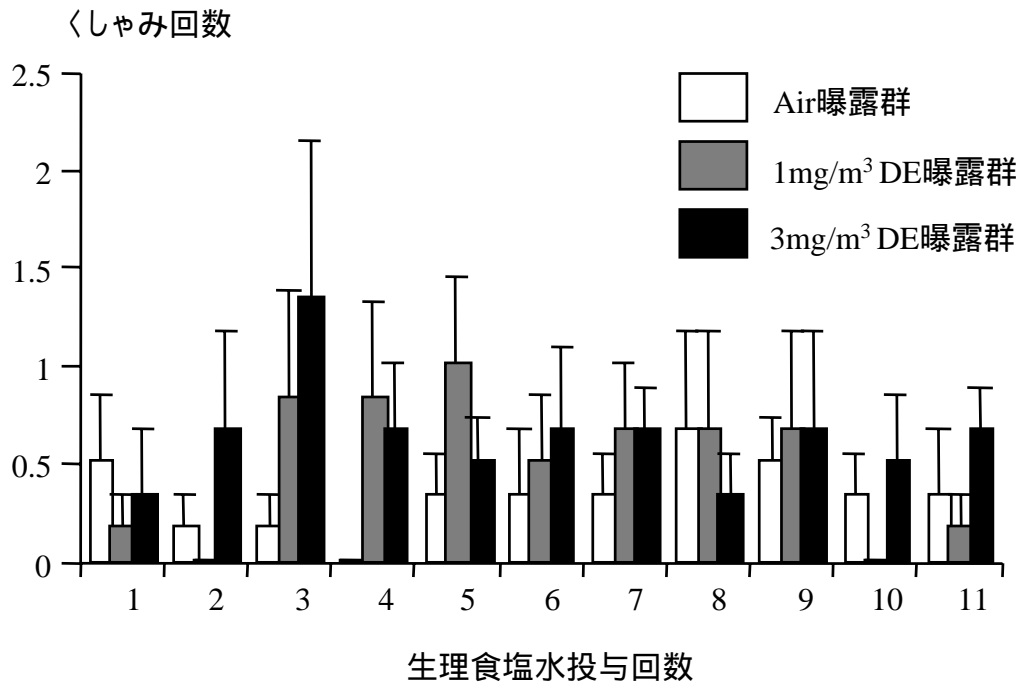


Fig.5 DE曝露下での生理食塩水投与がくしゃみ回数に及ぼす影響

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。清浄空気曝露群に対し、1または3mg/m³ DE曝露群いずれにおいても有意差は見られなかった。

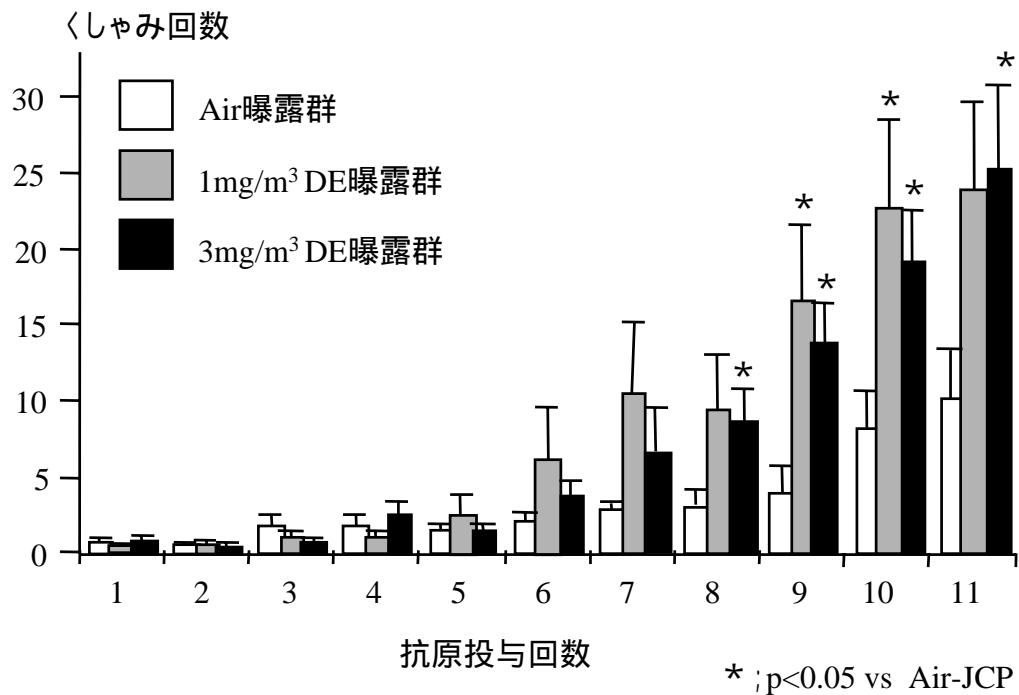


Fig.6 DE曝露下での抗原投与がくしゃみ回数に及ぼす影響

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。清浄空気曝露群に対し、1mg/m³ DE曝露群では抗原投与9, 10週目に有意な増加が見られ、3mg/m³ DE曝露群では抗原投与8, 9, 10, 11週目に有意な増加が見られた。

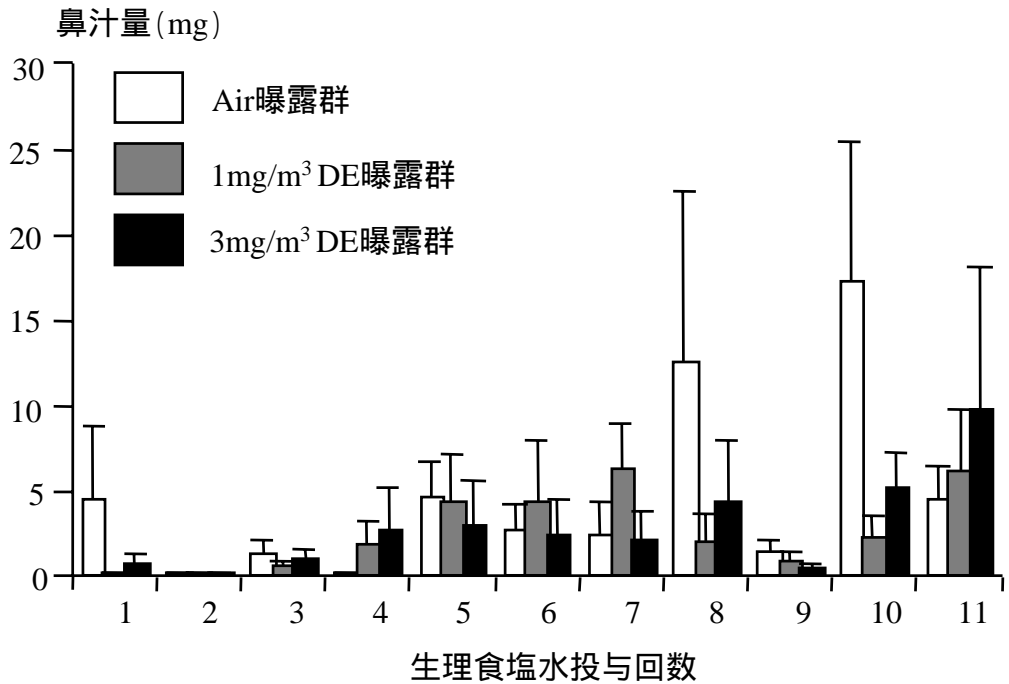


Fig.7 DE曝露下での生理食塩水投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響

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。清浄空気曝露群に対し、1または3mg/m³ DE曝露群いずれにおいても有意差は見られなかった。

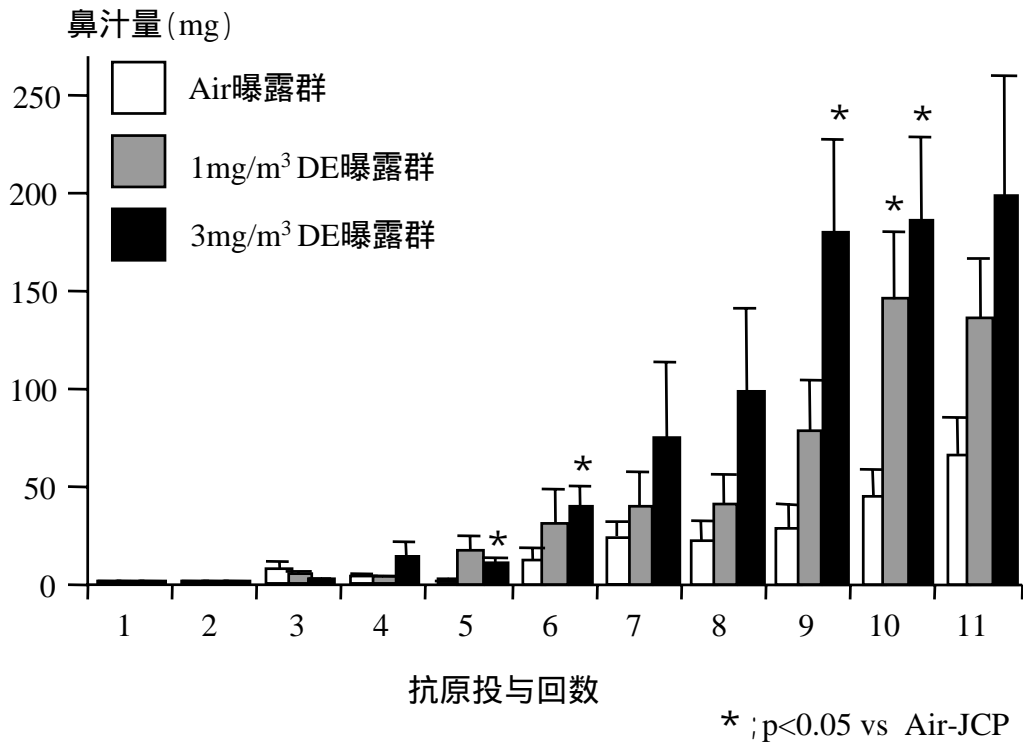
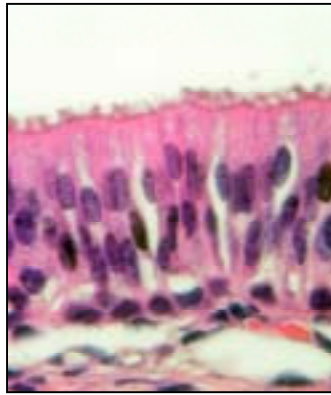
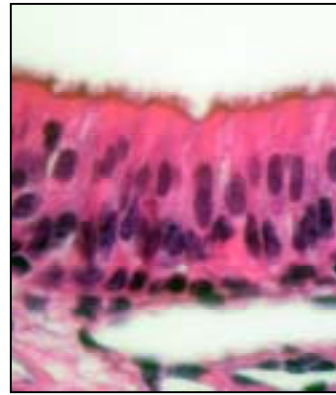


Fig. 8 DE曝露下での抗原投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響

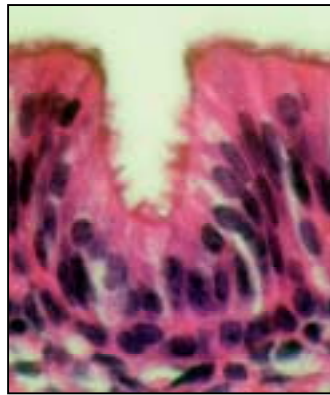
DE曝露下での抗原投与が鼻汁分泌量に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群に対し、1mg/m³ DE曝露群では抗原投与10週目に有意な増加が見られ、3mg/m³ DE曝露群では抗原投与5、6、9、10週目に有意な増加が見られた。



Air曝露群



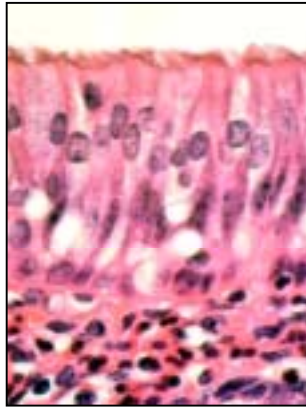
1mg/m³DE曝露群



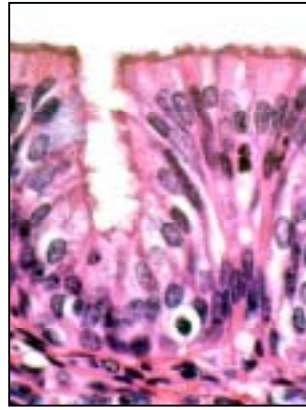
3mg/m³DE曝露群

Fig. 9 DE曝露下での生理食塩水投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響

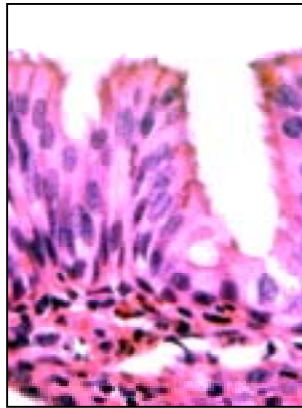
DE曝露下での生理食塩水投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響を示した。清浄空気曝露群に対し、DE曝露群において鼻粘膜の損傷が見られた。また、その損傷の度合いはDE濃度依存的であった。



Air曝露群



1mg/m³ DE曝露群



3mg/m³ DE曝露群

Fig. 10 DE曝露下での抗原投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響

DE曝露下での抗原投与が鼻粘膜上皮に及ぼす影響を示した。清浄空気曝露群に対し、DE曝露群において鼻粘膜の損傷が見られた。損傷の度合いについては、DE濃度依存的であり、生理食塩水投与群と比較してさらに大きい損傷であった。

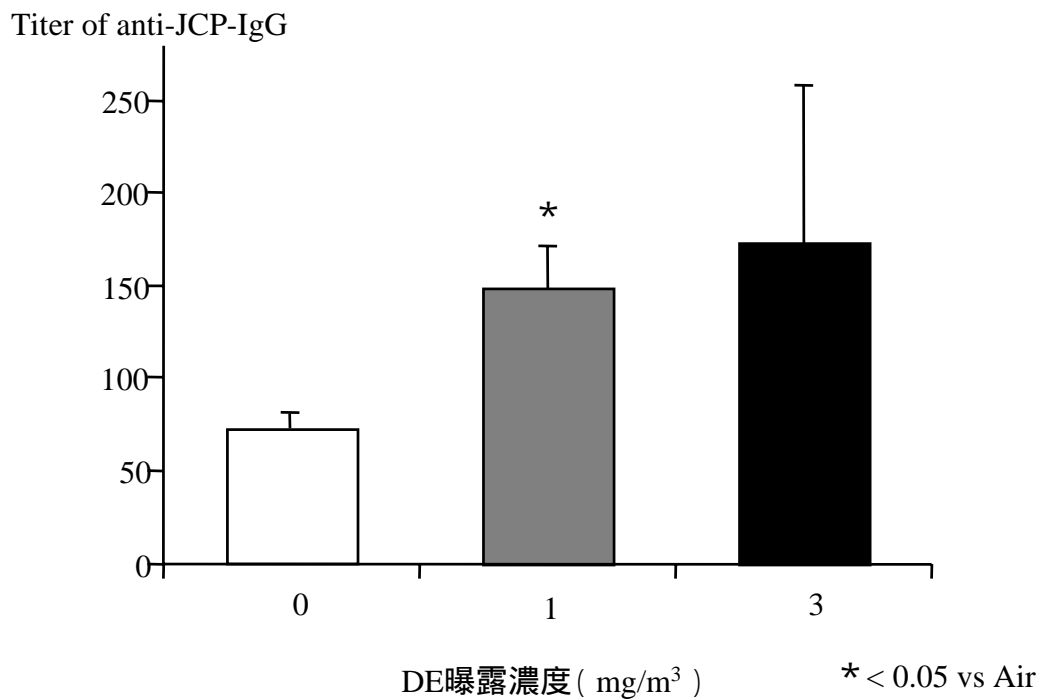


Fig.11 DE曝露下での抗原投与がJCP特異的IgG抗体産生に及ぼす影響

DE曝露下での抗原投与が、JCP特異的IgG抗体産生に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群と比較して、1mg/m³ DE曝露群において有意な増加が見られた。

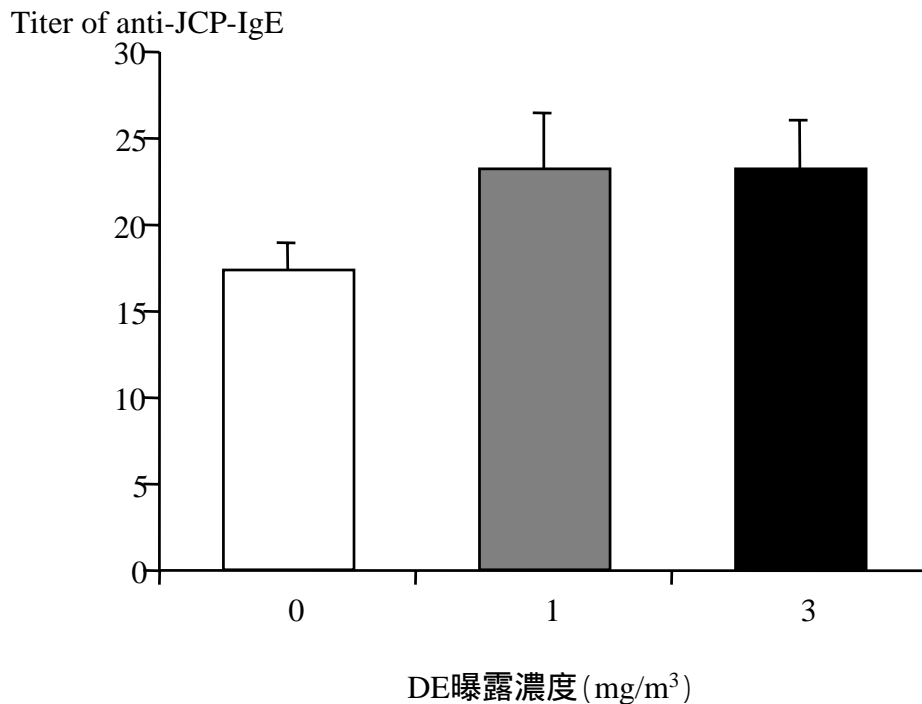


Fig. 12 DE曝露下での抗原投与がJCP特異的IgE抗体産生に及ぼす影響

DE曝露下での抗原投与が、JCP特異的IgE抗体産生に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群と比較して、1または3mg/m³ DE曝露群いずれにおいても有意差は見られなかった。しかし、3mg/m³ DE曝露群においてはp=0.581となりその増加傾向が見られた。

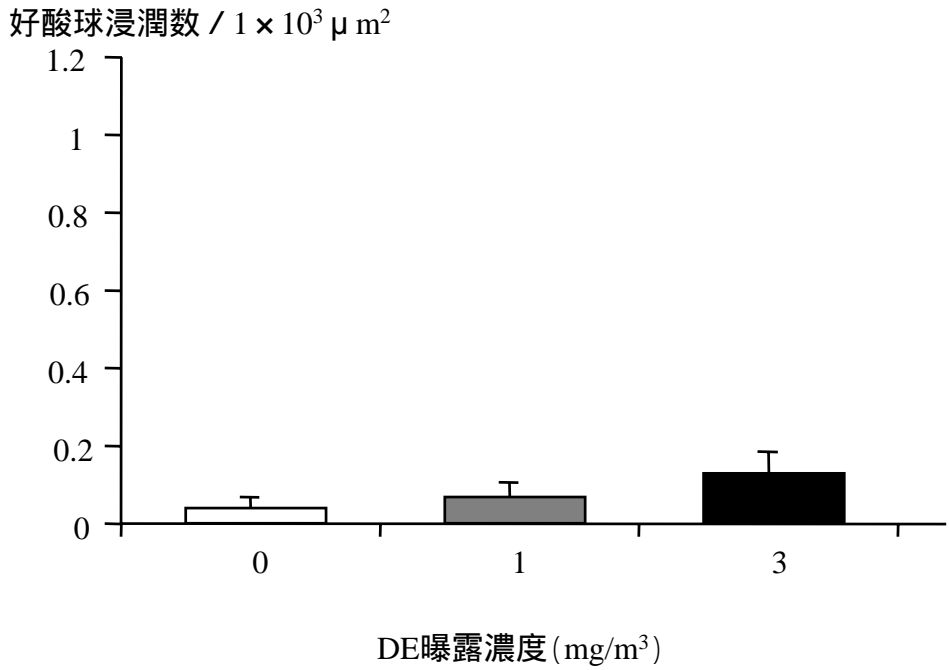


Fig.13 DE曝露下での生理食塩水投与が鼻中隔上皮の好酸球浸潤数に及ぼす影響

DE曝露下での生理食塩水投与が鼻中隔上皮の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群に対し、1または $3mg/m^3$ DE曝露群ともに有意な増加が見られなかった。

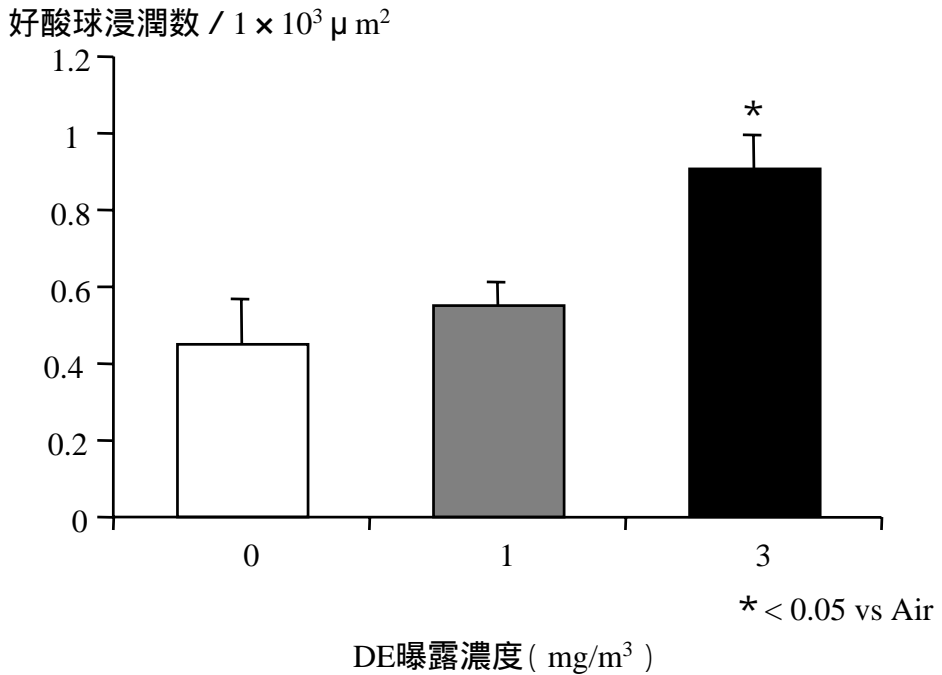


Fig.14 DE曝露下での抗原投与が鼻中隔上皮の好酸球浸潤数に及ぼす影響

DE曝露下での抗原投与が鼻中隔上皮の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群に対し、1または3mg/m³ DE曝露群ともに有意な増加が見られた。また、鼻中隔上皮下における好酸球浸潤数はDE濃度依存的であった。

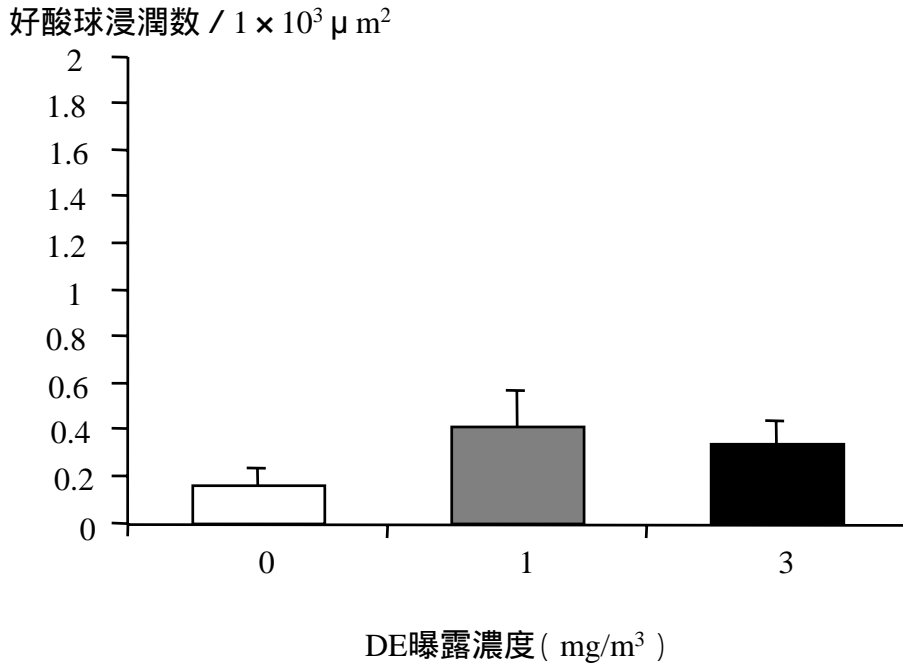


Fig.15 DE曝露下での生理食塩水投与が鼻中隔上皮下の好酸球浸潤数に及ぼす影響

DE曝露下での生理食塩水投与が鼻中隔上皮下の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群に対し、1または3mg/m³ DE曝露群ともに有意な増加が見られなかった。

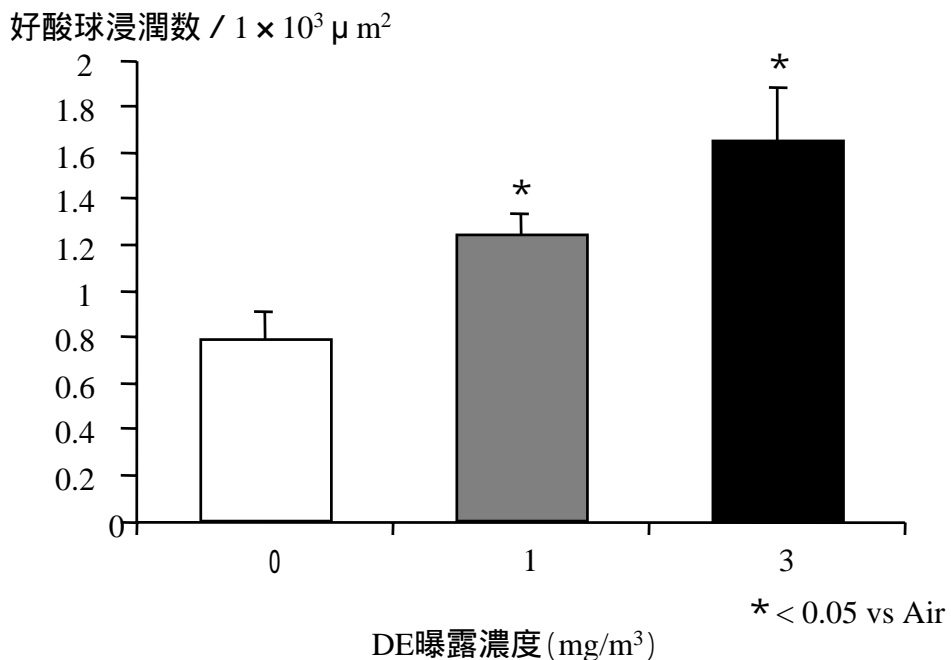


Fig.16 DE曝露下での抗原投与が鼻中隔上皮下の好酸球浸潤数に及ぼす影響

DE曝露下での抗原投与が鼻中隔上皮下の好酸球浸潤数に及ぼす影響を検討した結果を示した。清浄空気曝露群に対し、3mg/m³ DE曝露群において有意な増加が見られた。また、鼻中隔上皮下における好酸球浸潤数はDE濃度依存的であった。

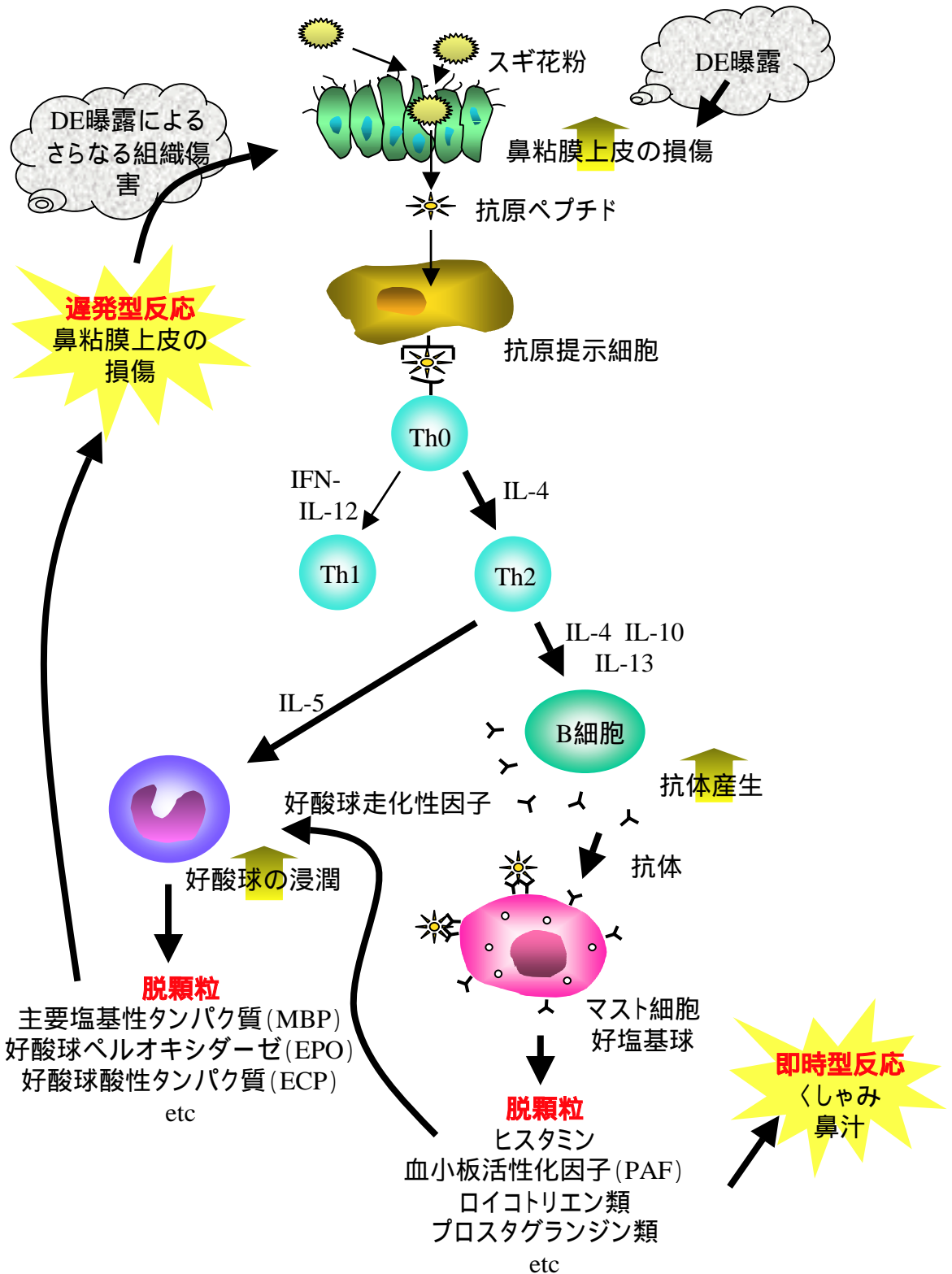


Fig.17 DE曝露によるアレルギー反応増悪の機構