

平成16年度大気汚染と花粉症の相互作用に関する 調査研究（動物実験）業務報告概要

1. 業務目的

花粉症が近年増加しており、スギ花粉症においては国民の15-30%が感作され、有症率が5-10%に達すると推定されている。その原因として、スギ花粉飛散数の増加が第一義的な要因としてあげられるが、同時に花粉飛散数がほぼ同じところでは、大気汚染のひどい都市部で患者が多発していること、花粉症に対するIgE抗体産生が浮遊粒子状物質により高まるアジュバント効果が報告されていることから、花粉症増加の要因として自動車排気ガスを中心とした大気汚染の関与が指摘されている。

本研究ではこれまでに、花粉症の増加に大気汚染が関与する可能性があるかについて検討し、ディーゼル排気ガスが抗原投与による鼻アレルギーおよびアレルギー性結膜炎様病態を増悪することが、明らかにされてきた。これらのことを踏まえ、ディーゼル排気ガス中のガス状成分および粒子状成分が病態の増悪にどのようにかかわっているかについて検討を進めること、および、抗原としてスギ花粉を用いた花粉症モデルでの影響の解析と評価を行うことを目的としている。

2. 業務結果の概要

(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

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濃度1.0、3.0 mg/m³でDE濃度依存的に増悪させることを報告してきた。そこで今年度は、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 mg/m³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、0.3mg/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0.3mg/m³DE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 mg/m³では、花粉症症状が増悪されないことが明らかになった。

(2) スギ花粉症モデル(アレルギー性結膜炎)を用いたディーゼル排気曝露の影響解析

0.05、0.1、0.3 および 1.0 mg/m³ の粒子濃度のDE35日間曝露がアレルギー性結膜炎に及ぼす影響を検討し、DE単独では炎症スコアおよび結膜血管透過性に影響を与えないが、0.1、0.3 および 1.0 mg/m³ の濃度において、OVA感作動物におけるアレルギー性結膜炎スコアおよび結膜炎時の血管透過性亢進に対する増強が濃度依存的に認められ、DE曝露がアレルギー性結膜炎を増悪する可能性を示唆してきた。また、DEの0.3 および 1.0 mg/m³において認められたアレルギー性結膜炎の増悪は粒子を除去することにより減少することが示唆された。そこで、除粒子によるアレルギー性結膜炎増悪の減少に濃度依存性が成り立つかを厳密に確認する目的で、単独では炎症スコアおよび結膜血管透過性にほとんど影響を及ぼさない濃度である0.1 mg/m³ (DEP濃度として)のDE濃度について確認のためにさらに検討を加えた。アレルギー性結膜炎における結膜炎症状スコアおよび結膜内色素漏出量において、Air群と比較してDEの0.1 mg/m³群およびDEの除粒子群ともに色素漏出量の有意差な差はみられなかった。

これらの結果から、用量(濃度)反応性を確認する基本である3濃度について検討した結果、DE曝露による結膜血管透過性の増強にはDE中のガス状成分よりも粒子状成分の方がより強く関与していることが示唆された。

(3) ディーゼル排気中ガス状物質曝露がアレルギー性結膜炎に及ぼす影響の解析

これまで DE 曝露により、アレルギー性結膜炎が増悪する可能性を見いだしてきた。しかし、これまではアレルギー性結膜炎を誘発する抗原として、実験系が確立している卵白アルブミン(OVA)を用いて検討を行ってきた。一方、我国における花粉症の80%以上は日本スギによるものであるといわれていることから、平成15年度に、日本スギ花粉(JCP)を抗原として用いたアレルギー性結膜炎モデルを用いて、ディーゼル排気(DE)の1および3 mg/m³ (DEP濃度として)について検討を行った。その結果、JCP感作動物のアレルギー性結膜炎における結膜内色素漏出量は、Air群と比較してDEの1 mg/m³群および3 mg/m³群で色素漏出量の有意な増強が認められた。そこで、本年度はDEの濃度依存性を確認する目的で、DEの0.3 mg/m³ (DEP濃度として)について日本スギ花粉で誘発したアレルギー性結膜炎を増悪させるかどうかをモルモットを用いて検討した。

実験には、Hartley系雄性モルモットを用いた。DEの曝露は、国立環境研究所のAC系曝露チャンバーを用いて行った。清浄空気群、DEP濃度として1 mg/m³のDE曝露群の2群を設定した。アレルギー性結膜炎は、日本スギ花粉の点眼による能動感作および点眼チャレンジにより誘発した。

Air群、DEの0.3 mg/m³群について曝露実験を行った(1群6匹)。炎症スコアを検討した結果、アレルギー性結膜炎の症状に対するスコアならびに結膜内色素漏出量の検討においても、Air群に比較してDEの0.3 mg/m³群で増強傾向がみられたが、統計的に有意な変化ではなかった。以上、スギ花粉感作により誘発したアレルギー性結膜炎に対して、DEの0.3 mg/m³曝露群では有意な影響がみられず、DEの1 mg/m³曝露群からアレルギー性結膜炎を増悪させることが考えられる。

(4) ディーゼル粒子構成成分が鼻アレルギー反応に及ぼす影響の解析

近年、スギ花粉症の罹患率が急激に増加しており、その一因として大気汚染物質、特にDE中の粒子状成分であるDEPが関与していることがいくつかの実験的研究及び疫学調査により示唆されている。そこで本年度は、花粉症の症状としてくしゃみ、鼻漏(鼻汁)を取り上げ、DEP中のどの成分がどのような機序で花粉症様病態の増悪に関与しているのかを検討した。

Hartley系雄性モルモットを用いて実験を行った。DEPは国立環境研究所の希釈トンネル内沈着粒子を採取し、ジクロロメタンで抽出を行った。DEP(12.5mg/ml)残渣である残渣粒子(3.75mg/ml)、ジクロロメタン抽出成分(8.75mg/ml)をそれぞれ抗原となる卵白アルブミン(Ovalbumin:OVA)+PBSまたはPBSのみに溶解した混合液をモルモットに週1回両側鼻腔内に各70 μl/kg、計6回投与し、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。また、対照としてOVA+PBSまたはPBSのみを点鼻投与した。投与開始から6回目の測定終了24時間後に採血し、分取した血清を用いてOVA特異的IgG1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。

対照に比し、くしゃみ回数はDEP+OVA投与群、残渣粒子+OVA投与群、抽出物+OVA投与群において有意な増加が見られた。鼻汁分泌量はDEP+OVA投与群、残渣粒子+OVA投与群、抽出物+OVA投与群において有意な増加が見られた。OVA特異的IgG1抗体価についてはDEP+OVA投与群、残渣粒子+OVA投与群において有意な増加が見られた。好酸球浸潤数は鼻中隔上皮において、DEP+OVA投与群、残渣粒子+OVA投与群に増加傾向が見られた。鼻中隔上皮下においては、DEP+OVA投与群、残渣粒子+OVA投与群に有意な増加が見られた。

これらの結果より、DEP中の残渣粒子、吸着物質である抽出物はともに花粉症様病態を増悪させることが示唆されたが、両者間の影響差は明らかにならなかった。残渣粒子の増悪作用は、OVA特異的IgG1抗体価・好酸球浸潤数の増加による可能性が示唆された。抽出物の増悪作用については実験結果からOVA特異的IgG1抗体価・好酸球浸潤数と関連づける明確な結論は得られなかった。以上のことから、DEPの成分である残渣粒子と吸着物質の花粉症様病態に与える影響に関する機構は異なっていることが示唆された。

(5) ディーゼル排気曝露の鼻アレルギー反応およびアレルギー性結膜炎に及ぼす影響のヒトへの外挿

これまでに300および1,000 μg/m³のDEPを含むDEにモルモットを曝露しながら抗原を点鼻あるいは点眼投与して惹起させるアレルギー性鼻炎様病態およびアレルギー性結膜炎様病態はDEP濃度に依存して増悪することを観察してきた。また、大気汚染物質として重要な二酸化窒素やオゾン曝露がアレルギー性鼻炎様

病態に及ぼす影響について検討を加えてきた。これらの結果を併せて解析し、影響のする閾値の推定を行った。解析には Crump らの統計学的手法を用いて Most Likelyhood Estimate (最尤推定値, MLE)、Benchmark-Concentration(基準濃度, BMC)を算出した。最小毒性量 LOAEL(lowest observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められた最低の投与量)や、無毒性量 NOAEL (no observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められない最高の投与量)も併記した。その結果6回目の抗原投与によるくしゃみ回数と鼻汁量増加の BMC はそれぞれ $102\mu\text{g}/\text{m}^3$ および $12\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、アレルギー性結膜炎様病態を増悪させる(6回目の抗原点眼後の結膜からの血漿の漏出を指標) BMC はそれぞれ $63\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、二酸化窒素がアレルギー性鼻炎様病態に及ぼす影響のくしゃみ回数と鼻汁量増加の BMC はそれぞれ 0.01ppm および 0.03ppm であった。また、オゾン曝露がアレルギー性鼻炎様病態に及ぼす影響のくしゃみ回数と鼻汁量増加の BMC はそれぞれ 0.06ppm および 0.05ppm であった。二酸化窒素の BMC が極めて低い濃度になった要因として濃度反応曲線の形が大きく作用することから今後この点について手法の再検討が必要になる可能性がある。また、今後、曝露実験動物に DE 曝露し観察された生体影響からヒトへの DE 曝露による健康影響の予測をすることが必要となる。