

## 課題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

小林隆弘 (国立環境研究所 環境健康研究領域)  
篠原律子 (東邦大学)

### 研究要旨

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、特にディーゼル排気(Diesel exhaust:DE)中の粒子状成分であるディーゼル排出粒子(Diesel exhaust particles: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。そこで本研究では、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することを目的とした。

Hartley系雄性モルモットを用いて実験を行った。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 $\mu$ l/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、コントロールとして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。

コントロールに比し、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。

実験の結果より、DEP中の残渣粒子、吸着物質である抽出物と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。

### 背景・目的

花粉症は日本において以前は稀な病気とされていたが、1961年にブタクサによるものが、1964年にはスギによるものが報告され、それ以来年々、患者数は増加傾向にある。現在、スギ花粉症については国民の15~30%が感作され、有症率は10数%に達すると推定されている<sup>1,2)</sup>。日本におけるスギ花粉症患者急増の一義的な要因は第二次世界大戦後の拡大造林政策のもと、全国の針葉樹人工林面積の約45%がスギで占められるようになり、アレルゲンとしての花粉飛散量が増加したことがあげられる。またそれと同時に花粉症は大気汚染、生活空間の気密化、食習慣の欧米化、化学物質の体内への取り込みなど生活環境の変化が複合的にもたらしたヒトの免疫機制と特定の植物の花粉が結びついて増加してきたと考えられる。

花粉症の発症もしくは症状の増悪に大気汚染が関与している可能性がいくつかの疫学調査から示唆されている。花粉症の一つの症状であるアレルギー性鼻炎と大気汚染との関係について、慈恵医大のグループは東京都の大気汚染地域と岩手県の非大気汚染地域の児童などのアレルギー性鼻炎の罹患率を比較した。その結果、大気汚染地域は29%、非大気汚染地域は7%であった。また大都市、工業都市、小都市及び農業地区におけるアレルギー性鼻炎の調査においては、その有病率は大都市>工業都市>

小都市 > 農業地区の順に高かった<sup>3)</sup>。さらに日光・今市地区におけるスギ花粉症に関する問診調査から、スギ飛散数が同程度であっても、自動車交通量の少ない小来川地区住民より交通量が多い日光杉並木周辺住民の方が花粉症の有症率が高いことが示されている<sup>4)</sup>。これらの疫学調査は大気汚染地域のほうが非大気汚染地域よりもアレルギー性鼻炎を発症しやすいということを示唆している。

国内の自動車の普及台数は平成 16 年度の段階で約 7800 万台に達し、特に自動車の多い大都市部を中心に大気汚染が深刻となっている。その主要な汚染源は自動車保有台数の約 16%を占めるディーゼル車である。このディーゼル車から排出されるディーゼル排気粒子 (Diesel Exhaust Particulate ; DEP) は近年、深刻な問題となっている粒子状物質 (Particulate Matter ; PM) による大気汚染の主要な要因である。ディーゼル車が急増した 1970 年代後半以降、年々自動車由来の PM が増加し、1994 年度の関東地方自動車排出局による PM の発生源は平均で自動車が 43%、工場・事業場が 18%、自然界からの発生が 17.7%、残りはその他、不明分であった。粒径が 10 μm 以下の PM を浮遊粒子状物質 (Suspended Particulate Matter ; SPM) としているが、SPM はその発生状況によって工場や火力発電所、焼却炉などの煙突、自動車のエンジンの排気筒の中で既に粒子状になっているもの、煙突や排気筒から大気中に放出された高温のガス状物質が急速に冷やされて生成されるもの、大気中のガス状物質から二次的に生成されるものなどに分けられる。自動車の排出する SPM のうち、ガソリン自動車の排出する割合はごくわずかで、ほぼ 100%がディーゼル車からの排出物である。SPM については環境基準 (1 時間値の 1 日平均値が 0.10mg/m<sup>3</sup> 以下であり、かつ、1 時間平均が 0.20mg/m<sup>3</sup> 以下であること) が設定されており、SPM による大気汚染の状況は経年変化でみると横這いから緩やかな改善の傾向がある。しかしながら 2002 年度の環境基準達成率は、自動車排出ガス測定局で 34.3%、一般環境大気測定局で 52.6%と依然として厳しい状態にある<sup>5)</sup>。

DEP はディーゼル自動車が窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>)、硫黄酸化物 (SO<sub>x</sub>) などのガス状成分とともに排出する黒煙中に含まれている<sup>6)</sup>。この黒煙はディーゼル車の燃料である軽油が高温で燃焼した時にエンジンの排気筒から噴き出る一種の煤である。ディーゼル排気中にある DEP は直径が 0.5 μm くらいの微粒子であり、酸性で刺激性がある。炭素分子をコアとして、未燃燃料、潤滑油、不完全燃焼生成物及び熱分解生成物である多環芳香族炭化水素、ニトロ芳香族炭化水素、複素環式化合物、キノン、アルデヒド、脂肪族炭化水素などの数千種もの有機化合物が吸着したものである<sup>7-9)</sup>。また DEP には鉄、銅、クロム、ニッケルなどの金属も含まれている<sup>10)</sup>。

動物を用いた実験の立場から DEP の生体影響について検討が進められてきており、これまでに DEP と花粉症をはじめとするアレルギー疾患との関連を示唆する結果が報告されている。DEP は抗原特異的 IgE 抗体産生を亢進させるアジュバント効果があること<sup>11,12,16)</sup>、鼻粘膜への好酸球の浸潤や気道過敏性を惹起して花粉症の発症を増加させること<sup>13-16)</sup>などがわかっている。しかし DEP 中のどの成分が花粉症様病態の増悪に寄与しているかについてはまだ明らかになっていない。花粉症の予防法や原因対策に繋がる結論を得るためには、DEP 中のどのような性質をもつ構成成分が影響を及ぼしているのかを明らかにすることやより詳細な増悪の機構についての検討が必要とされる。

そこで本研究では DEP を有機溶媒により抽出し、カーボンコア粒子と吸着している有機成分に分け、卵白アルブミン (OVA) を抗原とした鼻アレルギー様病態モデルを用いて、カーボンコア粒子と有機成分の両方の影響を検討した。病態の指標として、抗原投与後に誘発されるくしゃみ回数及び鼻汁量、IgG1 抗体価の測定、鼻中隔上皮及び上皮下の組織学的観察を行った。また DEP から抽出した有機成分を酸化による生成物が多く含まれると推定される極性画分と無極性画分に分画し、各分画の鼻アレルギー様病態に及ぼす影響を同様の方法で検討した。

## 材料と方法

### 1. 動物

雄性ハートレイ系モルモット (ハムリー) を 5 週齢で日本 SLC 株式会社 (浜松) より購入した。動物は、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) を使用し、餌・滅菌水とともに自由摂取させた。動物は一週間の

馴化期間後、6週齢で実験に使用した。

## 2. 試薬

抗原として卵白アルブミン（5回再結晶）は生化学工業（東京）製を使用した。リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline；PBS）はリン酸緩衝塩（Phosphate buffered salts、タカラバイオ株式会社、大津）を蒸留水によって溶解し、オートクレーブを用いて120℃、20分間滅菌したものを使用した。脱灰液（Decalcifying Soln.B）、Poli-L-Lysinはナカライテスク株式会社（京都）製を使用した。ジクロロメタン、ヘキサン、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）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）製を使用した。

## 3. 実験計画

### (1) DEP 構成成分の鼻アレルギー様病態に及ぼす影響の検討

ディーゼル排出粒子（DEP）をジクロロメタンにより抽出を行い、残渣粒子と有機成分である抽出物を分取した。抗原として卵白アルブミン（Ovalbumin；OVA）を、溶媒としてリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline；PBS）を用いて、DEP 粒子全体（wholeDEP）、残渣粒子、抽出物とそれぞれ混合液を調製した。

モルモットは DEP + OVA 投与、DEP 投与、残渣粒子 + OVA 投与、残渣粒子投与、抽出物 + OVA 投与、抽出物投与、OVA 投与、PBS のみ投与の 8 群に分けた。抗原投与群では 1 群 8 匹、抗原非投与群では 1 群 7 匹を使用した（図 2）。一週間に 1 回、計 6 回、5 週間にわたって、調整した混合液をモルモットの両側鼻腔に注入し、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。6 回目の測定終了 24 時間後に採取した血清を用いて、OVA 特異的 IgG1 抗体価を測定した。また 6 回目の測定終了 24 時間後に鼻部を摘出し、切片を作成し鼻中隔上皮及び上皮下の組織学的観察を行った（図 1）。

### (2) 有機成分のヘキサン抽出における各画分の影響の検討

ジクロロメタン抽出物を用いてさらにヘキサン抽出を行い、ヘキサン可溶画分（normal-hexane soluble fraction；n-HSF）とヘキサン不溶画分（normal-hexane insoluble fraction；n-HISF）に分画した。抗原として OVA を、溶媒として PBS を用いて、抽出物、n-HSF、n-HISF とそれぞれ混合液を調製した。

モルモットは抽出物投与+OVA 投与、抽出物投与、n-HSF + OVA 投与、n-HSF 投与、n-HISF + OVA 投与、n-HISF 投与、OVA 投与、PBS のみ投与の 8 群に分けた。抗原投与群では 1 群 8 匹、抗原非投与群では 1 群 7 匹を使用した（図 2）。以下、(1) と同様の方法で影響を検討した。

## 4. DEP の抽出、試料収集

1.(1) の実験では国立環境研究所のディーゼル排気希釈トンネル内より採取した DEP をソックスレー抽出器でジクロロメタン抽出を 18 時間行った。その後、分取した抽出物と残渣をそれぞれエバポレーター、真空ポンプを用いて、有機溶媒を完全に蒸発させ、-4℃で保存した。このとき使用した DEP 構成比は残渣粒子が 30.8%、抽出物が 69.2%であった。またこの DEP のジクロロメタン抽出を行った際に、溶出される有機成分は、DEP 中の全有機成分に対して 87.7%であった。以下、本研究においてジクロロメタン抽出物は DEP 抽出物と定義する。

1.(2) の実験では国立環境研究所のディーゼル排気吸入装置より硝子フィルターで捕集した DEP をソックスレー抽出器でジクロロメタン抽出を 6 時間行った。得られた有機成分をさらにヘキサンで抽出を行い、n-HSF と n-HISF に分離した。その後、エバポレーター、真空ポンプで有機溶媒を完全に蒸発させ、-4℃で保存した。この実験で使用した DEP 抽出物の重量構成比は n-HSF が 89.5%、n-HISF が 10.5%であった。

## 5. 点鼻投与

DEP、残渣粒子、抽出物各成分をジメチルスルホキシド (Dimethylsulfoxide : DMSO、和光純薬工業株式会社、大阪市) で溶解した後、超音波で攪拌した。さらに 1%OVA - 滅菌 PBS を加えて、各物質の最終濃度を DEP の構成比に基づき、それぞれ 12.5mg/ml、3.75mg/ml、8.75mg/ml となるように調製した。また DMSO の最終濃度は 0.25% になるように調製した。この溶液を針の付いていない 1ml シリンジ (SS-01、テルモ株式会社、東京) を用い、各投与群において仰向けに固定したモルモットの両側鼻腔内に 70  $\mu$ l / kg 投与した。DEP、残渣粒子、抽出物の鼻粘膜への反応性について検討するため、上記の各成分を DMSO で溶解、超音波攪拌し、滅菌 PBS のみを加えて、DMSO の最終濃度を 0.25% にした混合液を同様に投与した。また対照として滅菌 PBS に溶解した OVA 溶液、または滅菌 PBS に全容量の 0.25% の DMSO を加え、同様に投与した。

1.(2) の実験においても、上記の方法と同様に行った。抽出物、n-HSF、n-HISF の混合液の最終濃度は DEP 抽出物の構成比に基づき、それぞれ 8.75mg/ml、7.875mg/ml、0.875mg/ml となるように調製した。

点鼻投与を行う際に物理的刺激を最小限にするために、37  $^{\circ}$ C に設定したウォーターバス (tai-tec taiyo incubator personal、大洋科学工業株式会社、東京) を用いて点鼻投与物質をセラムチューブ (住友ベークライト株式会社、東京) に入れて暖め、体温に近い状態で用いた。

## 6. くしゃみ回数の測定

点鼻投与後、20 分間に誘発されるくしゃみ回数を測定した。くしゃみ回数は、モルモットを無麻酔下で首かせ式保定器によって固定し、くしゃみをした時の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 (図 3)。

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、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 (CFDD77、ソニー株式会社、東京) により拡声し、くしゃみの音声を確認した。

## 7. 鼻汁量測定

点鼻投与終了後、20 分間に鼻孔外に放出された鼻汁量を測定した。鼻汁はキムワイプ (S-200、十條キンバリー株式会社、東京) を用いて採取し、はかり (AK160、Mettler Instrument、Lausanne、Switzerland) で計量した。

## 8. 抗体価の測定

6 回目の抗原投与 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、卵白アルブミン特異的モルモット IgG1 測定キット (株式会社森永生科学研究所、横浜市) を用いて、IgG1 抗体価を測定した。

## 9. 組織学的検討

6 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 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  $\mu$ m の厚さの薄片切片を、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、大阪) 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) を用いてビデオマク

ロメーター(オリパス)により、鼻中隔上皮及び上皮下(図 4b)の単位面積あたりの数を計測した。

## 10. 統計学処理

値は平均値±標準誤差で示した。OVA 抗原投与群において DEP 投与群と PBS 投与群の有意差比較検討は、Student の t 検定を用いて解析した。p<0.1、0.05 をそれぞれ傾向および有意差とした。

## 結果

### 1. DEP 中の構成成分の花粉症様病態に及ぼす影響

#### 1-1 DEP 中の構成成分の抗原併用投与または PBS 併用投与によるくしゃみ回数に及ぼす影響

DEP 中の構成成分の抗原併用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。wholeDEP 投与群の 2、4、6 回目の抗原投与後、残渣粒子投与群の 4 回目の抗原投与後、抽出物投与群の 4、5、6 回目の抗原投与後にくしゃみ回数の有意な増加が見い出された。

DEP 中の構成成分の PBS 併用投与がくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を図 6 に示した。wholeDEP 投与群の 3、5 回目の抗原投与後、抽出物投与群の 3 回目の抗原投与後にくしゃみ回数の有意な増加が見い出された。

#### 1-2 DEP 中の構成成分の抗原併用投与または PBS 併用投与による鼻汁量に及ぼす影響

DEP 中の構成成分の抗原併用投与が鼻汁量に及ぼす影響を検討した結果を図 7 に示した。wholeDEP 投与群の 2、4、5、6 回目の抗原投与後、残渣粒子投与群の 4、5、6 回目の抗原投与後、抽出物投与群の 4、5 回目の抗原投与後に鼻汁量の有意な増加が見い出された。

DEP 中の構成成分の PBS 併用投与が鼻汁量に及ぼす影響を検討した結果を図 8 に示した。コントロールに比し、wholeDEP 投与群の 3 回目の抗原投与後に鼻汁量の有意な増加が見られた。

#### 1-3 DEP 中の構成成分の抗原併用投与または PBS 併用投与が抗原特異的 IgG1 抗体産生に及ぼす影響

DEP 中の構成成分の抗原併用投与が抗原特異的 IgG1 抗体産生に及ぼす影響を検討した結果を図 9 に示した。コントロールに比し、wholeDEP 投与群及び残渣粒子投与群に IgG1 抗体価の有意な増加が見られた。また、抽出物投与群に対し、残渣粒子投与群において有意な増加が見られた。

DEP 中の構成成分の PBS 併用投与が抗原特異的 IgG1 抗体産生に及ぼす影響を検討した結果を図 10 に示した。コントロールに対し、wholeDEP 投与群、残渣粒子投与群、抽出物投与群のいずれにおいても有意差は認められなかった。

#### 1-4 DEP 中の構成成分の抗原併用投与または PBS 併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響

DEP 中の構成成分の抗原併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を図 11 に示した。鼻中隔上皮において、コントロールに比し、wholeDEP 投与群及び残渣粒子投与群で好酸球浸潤数の増加傾向が見られた。鼻中隔上皮下においては、コントロールに比し、wholeDEP 投与群及び残渣粒子投与群で有意な増加が見られた。また抽出物投与群と比較したところ、wholeDEP 投与群、残渣粒子投与群において有意な増加が見られた。

DEP 中の構成成分の PBS 併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を図 12 に示した。コントロールに比し、wholeDEP 投与群、残渣粒子投与群、抽出物投与群のいずれにおいても好酸球浸潤数に有意差は認められなかった。

#### 1-5 DEP 中の構成成分が鼻粘膜組織に及ぼす影響

DEP 中の構成成分の抗原併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響については図 13 に示した。wholeDEP、残渣粒子、抽出物のいずれの投与群においても鼻粘膜上皮の損傷が見られた。またその損傷の度合いは抽出物投与群と比較し、wholeDEP 投与群及び残渣粒子投与群のほうが大きい傾向が見られた。

DEP 中の構成成分の PBS 併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響については図 14 に示した。wholeDEP

及び残渣粒子投与群において鼻粘膜上皮の損傷が見られた。

## 2. DEP 中の有機成分が花粉症様病態に及ぼす影響

### 2-1 DEP 中の有機成分の抗原併用投与または PBS 併用投与によるくしゃみ回数に及ぼす影響

DEP 中の有機成分の抗原併用投与がくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を図 15 に示した。抽出物投与群の 2、6 回目抗原投与後、n-HISF 投与群の 2 回目の抗原投与後に有意な増加が見いだされた。

DEP 中の有機成分の PBS 併用投与がくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を図 16 に示した。コントロールに比し、DEP 中の有機成分によるくしゃみ回数の有意な増加は認められなかった。

### 2-2 DEP 中の有機成分の抗原併用投与または PBS 併用投与による鼻汁量に及ぼす影響

DEP 中の有機成分の抗原併用投与が鼻汁量に及ぼす影響を検討した結果を図 17 に示した。コントロールに比し、抽出物投与群の 5、6 回目の抗原投与後に鼻汁量の有意な増加が見られた。また n-HSF 投与群に比し、抽出物投与群の 5、6 回目の抗原投与後に鼻汁量の有意な増加が見られた。

DEP 中の有機成分の PBS 併用投与が鼻汁量に及ぼす影響を検討した結果を図 18 に示した。コントロールに比し、wholeDEP、残渣粒子投与群、抽出物投与群のいずれにおいても鼻汁量の有意な増加は認められなかった。

### 2-3 DEP 中の有機成分の抗原併用投与または PBS 併用投与が抗原特異的 IgG1 に及ぼす影響

DEP 中の有機成分の抗原併用投与が抗原特異的 IgG1 に及ぼす影響を検討した結果を図 19 に示した。コントロールに比し、wholeDEP、残渣粒子、抽出物のいずれの投与群においても抗原特異的 IgG1 抗体価に有意差は見られなかった。

DEP 中の有機成分の PBS 併用投与が抗原特異的 IgG1 に及ぼす影響を検討した結果を図 20 に示した。コントロールに比し、抗原特異的 IgG1 抗体価に有意な差は見られなかった。

### 2-4 DEP 中の有機成分の抗原併用または PBS 併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響

DEP 中の有機成分の抗原併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を図 21 に示した。鼻中隔上皮において、コントロールに比し、抽出物投与群において好酸球浸潤数の増加傾向が、n-HISF 投与群で好酸球浸潤数の有意な増加が見られた。また n-HSF 投与群に比し、抽出物投与群において増加傾向が、n-HISF 投与群で有意な増加が見られた。鼻中隔上皮下においては、コントロールに比し、抽出物投与群で好酸球浸潤数の増加傾向が見られた。また n-HSF 投与群に対し、抽出物投与群で有意な増加が見られた。

DEP 中の有機成分の PBS 併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を図 22 に示した。コントロールに比し、wholeDEP、残渣粒子、抽出物のいずれの投与群においても好酸球浸潤数に有意な差は認められなかった。

### 2-5 DEP 中の有機成分が鼻粘膜組織に及ぼす影響

DEP 中の有機成分の抗原併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響については図 23 に示した。抽出物、n-HSF、n-HISF の全ての投与群において損傷が見られた。その損傷の度合いは n-HSF 投与群より、抽出物、n-HISF 投与群のほうが大きい傾向がみられた。抽出物投与群と n-HISF 投与群の両者は同程度の損傷であった。

DEP 中の有機成分の PBS 併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響については図 24 に示した。コントロールと比較し、抽出物投与群、n-HSF 投与群、n-HISF 投与群のいずれにおいても損傷の増加は見られなかった。

## 考察

DEP の構成成分である残渣粒子及び有機成分の鼻アレルギー反応に及ぼす影響について検討した。高濃度の wholeDEP、残渣粒子、抽出物の各物質の鼻腔内投与は、抗原により誘発されるくしゃみ回数(図 5) 及び鼻汁量(図 7) を有意に増加させたことから、wholeDEP、残渣粒子、抽出物のいずれにも鼻アレルギー反応を増悪させる作用があることが示唆された。しかしながら、wholeDEP、残渣粒子、抽出物の各物質の投与群間における影響差は認められなかった。

鼻アレルギー反応の増悪作用について、鼻粘膜の過敏性の亢進、抗原特異的抗体価の上昇、炎症細胞の浸潤、鼻粘膜上皮の透過性の増加等が要因になっていると考えられる。そこで各投与物質の鼻アレルギー様病態の増悪作用の機構について検討を行った。

DEP が鼻粘膜の反応性に及ぼす影響については、PBS 投与後のくしゃみ回数及び鼻汁分泌量を指標に検討した。コントロールと比較し、wholeDEP 投与群において、くしゃみ回数及び鼻汁量の有意な増加が見られた。また抽出物投与群においては、くしゃみ回数の有意な増加、鼻汁量の増加傾向がみられた(図 6,8)。一方、残渣粒子投与群では、いずれのタイミングにおいても、くしゃみ回数及び鼻汁量の誘発作用は認められなかった。これまでのモルモットを用いた研究において、DEP と同じ炭素で形成されている活性炭の鼻腔内投与では鼻閉(鼻腔内圧の増加)やくしゃみ回数の増加が見られず、活性炭のような物理的刺激では鼻粘膜の反応性は亢進されないという報告がある<sup>13)</sup>。これらのことから、ジクロロメタンにより抽出される DEP 中の有機成分の方が鼻粘膜の過敏性の亢進に關与している可能性が示唆された。

ヒトでは鼻アレルギー反応のような I 型アレルギーに關与する主な抗体は IgE 抗体であるが、モルモットではこの反応を担うのは IgG 抗体である<sup>17)</sup>。よって本研究では、抗体価は OVA 特異的 IgG1 抗体価について検討した。抗原を同時に投与した場合、wholeDEP、残渣粒子投与群において抗原特異的 IgG1 抗体産生の有意な増加が見られた。一方、抽出物投与群では有意な増加は認められなかった。また抽出物投与群と比較して、残渣粒子投与群において抗原特異的 IgG1 抗体産生の有意な増加が見出された(図 9)。また DEP の PBS 併用投与群では抗体価の有意差は認められなかった(図 10)。これらのことより、残渣粒子のほうが抽出物より抗原特異的抗体産生の上昇への寄与が大きいことが示唆された。この理由として粒子は抗原をその表面に吸着し、抗原が細胞内に取り込まれる効率を上昇させる、もしくは抗原が細胞内に放出される速度を低下させ、より持続的に抗原刺激させるようなアジュバントとして働く可能性等が考えられる。

これまでに DEP 構成成分のアジュバント作用に関するいくつかの研究が行われている。マウスを用いた実験では、OVA+残渣粒子を投与すると、OVA+抽出物を注射したときより OVA 特異的 IgE 及び IgG1 抗体産生が亢進されるという報告がある<sup>18)</sup>。さらに DEP の炭素核のモデルとなるカーボンブラックによっても抗原特異的 IgE 抗体産生が亢進されるということがわかっている<sup>19-21)</sup>。これらの研究報告は残渣粒子が抽出物より抗原特異的抗体価を上昇させるとする上記の考察を支持するものである。

抗原が IgE 抗体を架橋するとマスト細胞や好塩基球が活性化されて、その分泌顆粒に蓄えられていたケミカルメディエーターが脱顆粒により放出され、好酸球や好中球などの炎症細胞の浸潤を引き起こされる<sup>22,23)</sup>。好酸球は骨髄由来の顆粒球で、その顆粒中には、主要塩基性タンパク質、好酸球産生タンパク質などを含んでいる。これらのタンパク質はアレルギー反応において組織傷害を引き起こし、アレルギー反応の重要な要因となっている。<sup>24,25)</sup>

炎症細胞の浸潤については鼻中隔組織における好酸球浸潤数を指標とした。抗原併用群では、コントロールに比し wholeDEP、残渣粒子投与群における好酸球の浸潤数で鼻中隔上皮において好酸球の浸潤数に増加傾向が、鼻中隔上皮下において有意な増加が見られた(図 11)。wholeDEP と残渣粒子投与群の好酸球の浸潤数は抽出物投与群と比較しても有意な増加が見られた(図 11)。抗原単独投与群では、鼻中隔上皮における好酸球の浸潤数に有意差は見られなかった(図 12)。これらのことから残渣粒子による鼻アレルギー反応の増悪に抗原抗体反応を介した好酸球の浸潤が關与していることが示唆された。

DEP 中の各成分と抗原の併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響を光学顕微鏡による観察にて検討した。wholeDEP 投与群、残渣粒子投与群、抽出物投与群のいずれにおいてもコントロールと比較し、鼻粘膜

上皮の損傷がみられ、その損傷の度合いは抽出物投与群より wholeDEP 投与群及び残渣粒子投与群のほうが大きい傾向が見られた。また抗原併用群に比べるとレベルは低い、wholeDEP 又は残渣粒子の PBS 併用投与でも鼻粘膜上皮の損傷がみられたことから、wholeDEP 又は残渣粒子自身に鼻粘膜組織の損傷を引き起こす作用があることを示唆している。wholeDEP 及び残渣粒子の投与で鼻粘膜上皮が損傷を受けると、鼻粘膜上皮の透過性を上昇させると考えられる。このため、抗原が wholeDEP 及び残渣粒子と同時に投与された場合、抗原が鼻粘膜上皮を通過しやすくなり、抗原特異的な抗体産生の亢進に引き続き、好酸球の浸潤・傷害性タンパク質の放出が起こり、さらに損傷を悪化させる可能性が示唆された。

さらに、DEP 抽出物をヘキサンにより分画し、各分画の鼻アレルギー反応に与える影響について検討した。この実験に用いた DEP は前述の実験で用いた DEP と捕集法が異なるため、構成成分の比率も異なり、影響のパターンにもやや違いは認められたが、抽出物投与群ではくしゃみ回数と鼻汁量を有意に増加させた。n-HISF 投与群においてもくしゃみ回数の有意な増加が見られた。また n-HSF 投与群に対し、抽出物投与群のくしゃみ回数、鼻汁量に増加傾向が、n-HISF 投与群の鼻汁量に増加傾向が認められた。(図 15,17)。これらのことより、n-HISF に含有される極性成分の方が、n-HSF 中の無極性成分より鼻アレルギー様病態を増悪させる可能性が高いことが示唆された。

分画した DEP 抽出物が鼻粘膜の反応性に及ぼす影響については、PBS 投与後のくしゃみ回数、鼻汁量への影響を指標に検討した。しかしながら、各投与群間において有意な差は見られなかった(図 16,18)ことから、この実験で用いた抽出物の各分画はいずれも鼻粘膜の反応性には影響を及ぼさないことが示唆された。

また抽出物投与群、n-HSF 投与群、n-HISF 投与群のいずれも抗原特異的 IgG1 抗体産生を増加させなかった(図 19,20)ことから、増悪作用に抗原特異的 IgG1 抗体産生の増加は寄与していないことが示唆された。

さらに鼻粘膜組織における好酸球の浸潤については、抗原併用投与群において、鼻中隔上皮では、n-HISF 投与群の鼻中隔上皮の好酸球浸潤数に有意な増加が見られた。また n-HISF 投与群では n-HSF 投与群に対しても、有意な増加が見られた(図 21)。これらのことより、n-HISF 中の極性成分の方が、n-HSF 中の無極性成分より好酸球浸潤を亢進させる活性が強いことが示唆された。

本研究の結果から次の増悪機構が推察される。DEP の粒子成分は、鼻粘膜に損傷を与え、透過性を増加させる。それにより、侵入する抗原量を増加させる。さらに粒子はその性状により、抗原を細胞内に効率的に取り込ませ、Th2 経路を活性化しやすくする。そのため抗体産生量の増加、好酸球の浸潤などが引き起こされる。また DEP 中の有機成分は単独でも鼻粘膜の過敏性を亢進させ、くしゃみ、鼻汁分泌を誘発させる可能性がある。さらに、有機成分中の極性物質に鼻アレルギー反応を増悪させる作用があることが示唆された。

## 結論

DEP 中の残渣粒子及び有機成分はいずれも花粉症様病態を増悪させることが明らかとなった。その機構としては、残渣粒子による抗原特異的な抗体産生と好酸球浸潤の増加及び有機成分による過敏性の亢進等が挙げられる。さらに有機成分中の極性分画に活性が強いことも見いだされた。DEP は粒子と有機成分の異なる作用により、アレルギー反応を増悪させる可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Okuda M. (2003) : Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. Ann .Allergy Asthma Immunol. ,91(3),288-296.
- 2) Nakamura A, Asai T, Yoshida K, Baba K, Nakae K. (2002) Allergic rhinitis epidemiology in Japan. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho, 105(3),215-224.
- 3) 兼子順男, 樋崎 享, 横山康夫, 太宰昌文, 荒井和夫, 佐久間正, 堀内博人, 遠藤朝彦, 佐野真一, 若山邦



久,堤 昌美,小笠原行喜(1979):大気汚染地域と非大気汚染地域下に於ける学童生徒の鼻疾患罹患状態およびわが国の鼻疾患の変遷について. 耳鼻咽喉科展望, 22:247-295.

4) Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E.(1987): Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy*, 58, 265-270.

5) 大気環境等の現状:環境省総合環境政策局, 編, 環境白書 平成16年度版

6) Lies KH, Hartung A, Postulka A, Gring H, Schulze J.(1986): Composition of diesel exhaust with particular reference to particle bound organics including formation of artifacts. *Dev Toxicol Environ Sci.*,13, 65-82.

7) Schuetzle D, Lee FS, Prater TJ(1981): The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extracts. *Int J Environ Anal Chem*, 9(2), 93-144

8) Schuetzle D(1983): Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. *Environ Health Perspect*, 47, 65-80.

9) Draper W.M.(1986): Quantitation of nitro and dinitro polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particulate matter. *Chemosphere*, 15,437-447.

10) Vouk VB, Piver WT(1983): Metallic elements in fossil fuel combustion products: Amount and form of emissions and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity. *Environ Health Perspect*, 47,201-225.

11) Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikemori R, Tokiwa H.(1986): Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J. Allergy Clin. Immunol*, 77,616-623.

12) Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, Muranaka M. (1987): Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J. Allergy Clin Immunol*, 79,639-645.

13) Kobayashi T, Ito T(1995): Diesel exhaust particulates induce nasal mucosal hyperresponsiveness to inhaled histamine aerosol. *Fundam Appl Toxicol*, 27,195-202.

14) Kobayashi T, Ikeue T, Ito T, Ikeda A, Murakami M, Kato A, Maejima K, Nakajima T, Suzuki T (1997): Short-term exposure to diesel exhaust induces nasal mucosal hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. *FUNDAMENTAL AND APPLIED TOXICOLOGY* 38: 166-172.

15) Kobayashi T, Ikeue T, Ikeda A (1998): Four-week exposure to diesel exhaust induces nasal mucosal hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 45, 106-112.

16) Kobayashi T (2000): Exposure to diesel exhaust aggravates nasal allergic reaction in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 352-356.

17) al-Laith M, Weyer A, Havet N, Dumarey C, Vargaftig BB, Bachelet M. (1993): Immunoglobulin-G-DEPENDENT stimulation of guinea pig lung mast cells and macrophages. *Allergy*, 48,608-614.

18) Heo Y, Saxon A, Hankinson O. (2001): Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology*, 159,143-158.

19) Lovik M, Hogseth AK, Gaarder PI, Hagemann R, Eide I.(1997): Diesel exhaust particles and carbon black have adjuvant activity on the local lymph node response and systemic IgE production to ovalbumin. *Toxicology*, 121(2),165-178.

20) van Zijverden M, van der Pijl A, Bol M, van Pinxteren FA, de Haar C, Penninks AH, van Loveren H, Pieters R.(2000): Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 168(2),131-139.

21) Nilsen A, Hagemann R, Eide I.(1997): The adjuvant activity of diesel exhaust particles and carbon black on systemic IgE production to ovalbumin in mice after intranasal instillation.

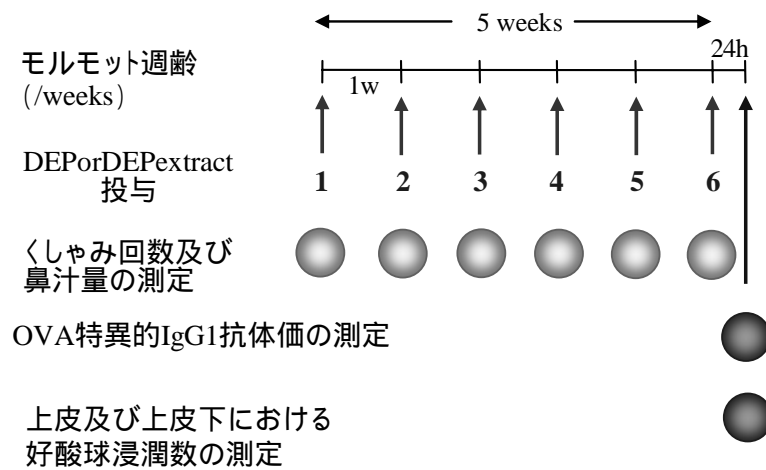
Toxicology, 124(3),225-232.

2 2 ) Beaven MA, Metzger H. (1993) : Signal transduction by Fc receptors: the Fc RI case. Immunol Today, 14,222-226.

2 3 ) Sutton BJ, Gould HJ. (1993) : The human IgE network. Nature, 366,421-428.

2 4 ) Gouni AS, Lamkhoused B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M. (1994) : High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. Nature ,367,183-186.

2 5 ) Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. (1993) : The biology of the eosinophilic leukocyte. Annu Rev Med, 44,85-101.



**図1 実験計画**

一週間ごとに計6回、抗原として卵白アルブミン (OVA) または生理食塩水を両側鼻腔に各 50  $\mu$  l/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。6回目の測定終了24時間後に採取した血清を用いて、皮内反応によってOVAに特異的なIgG1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。

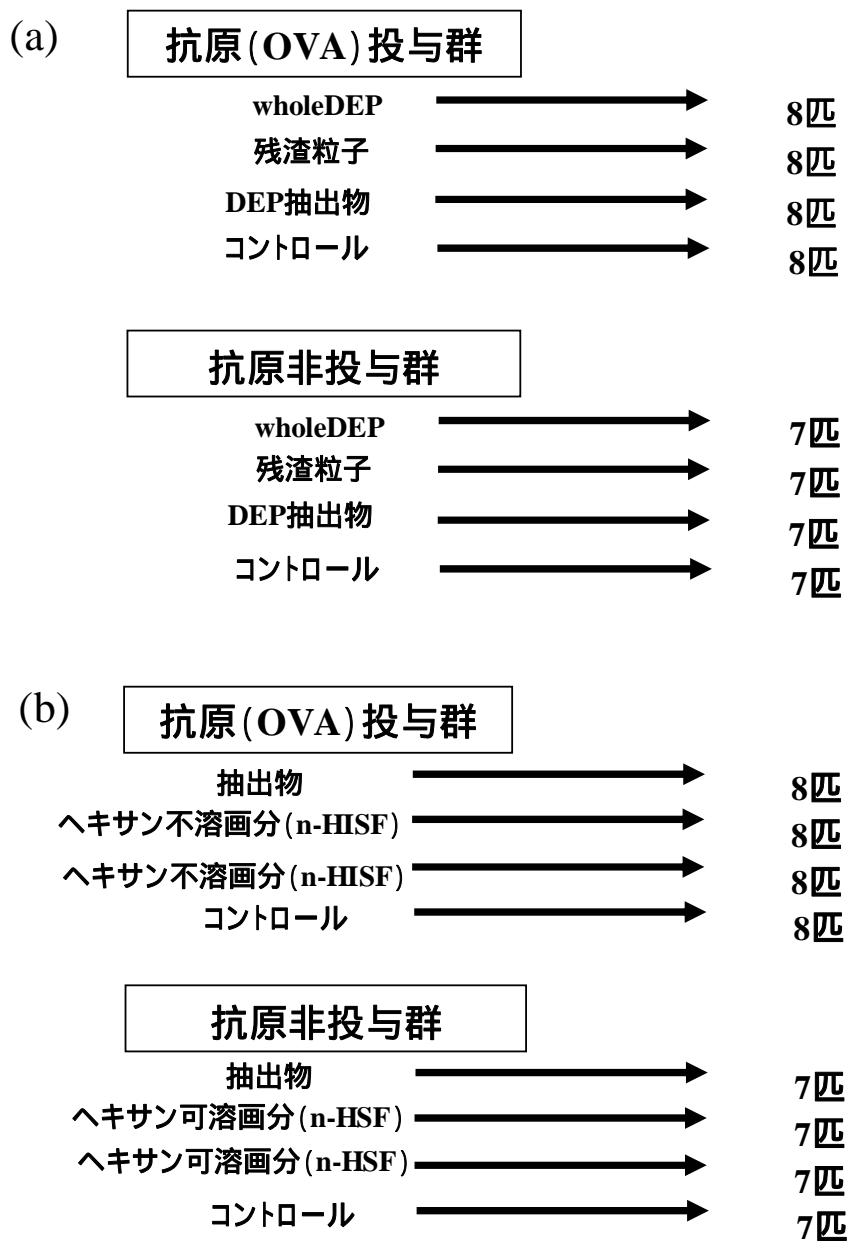


図2 実験群とそのモルモット使用匹数

(a)抗原投与群については、wholeDEP、残渣粒子、抽出物、コントロール各8匹、抗原非投与群では、wholeDEP投与群、残渣粒子投与群、抽出物投与群、コントロールにおいて各7匹を使用した。

(b)抗原投与群については、抽出物投与群、ヘキサン可溶画分投与群、ヘキサン不溶画分投与群、コントロールにおいて各8匹、抗原非投与群では、抽出物投与群、ヘキサン可溶画分投与群、ヘキサン不溶画分投与群、コントロールにおいて各7匹を使用した。

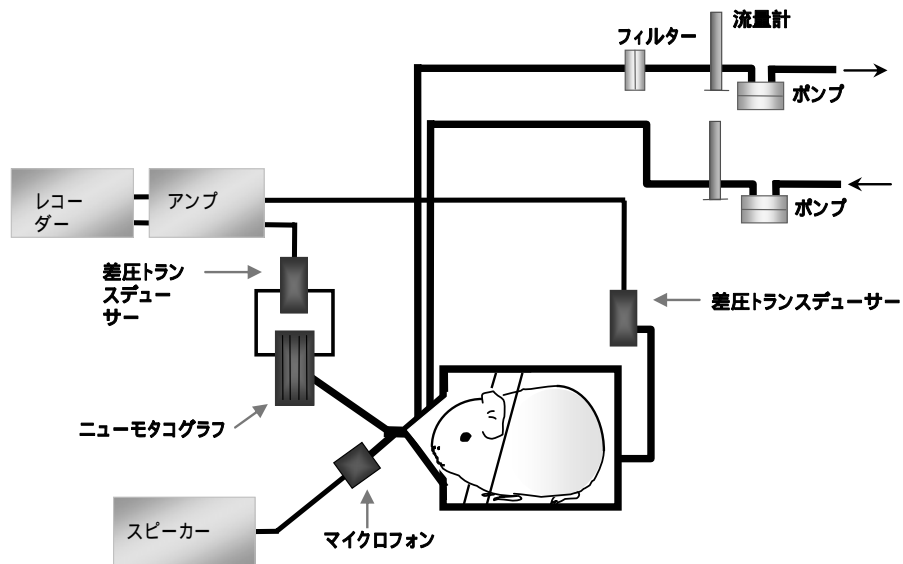


図3 くしゃみ反応測定装置

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

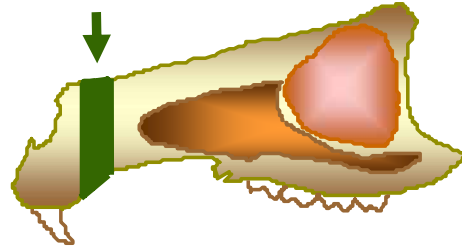
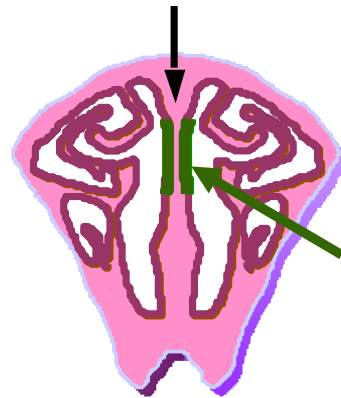


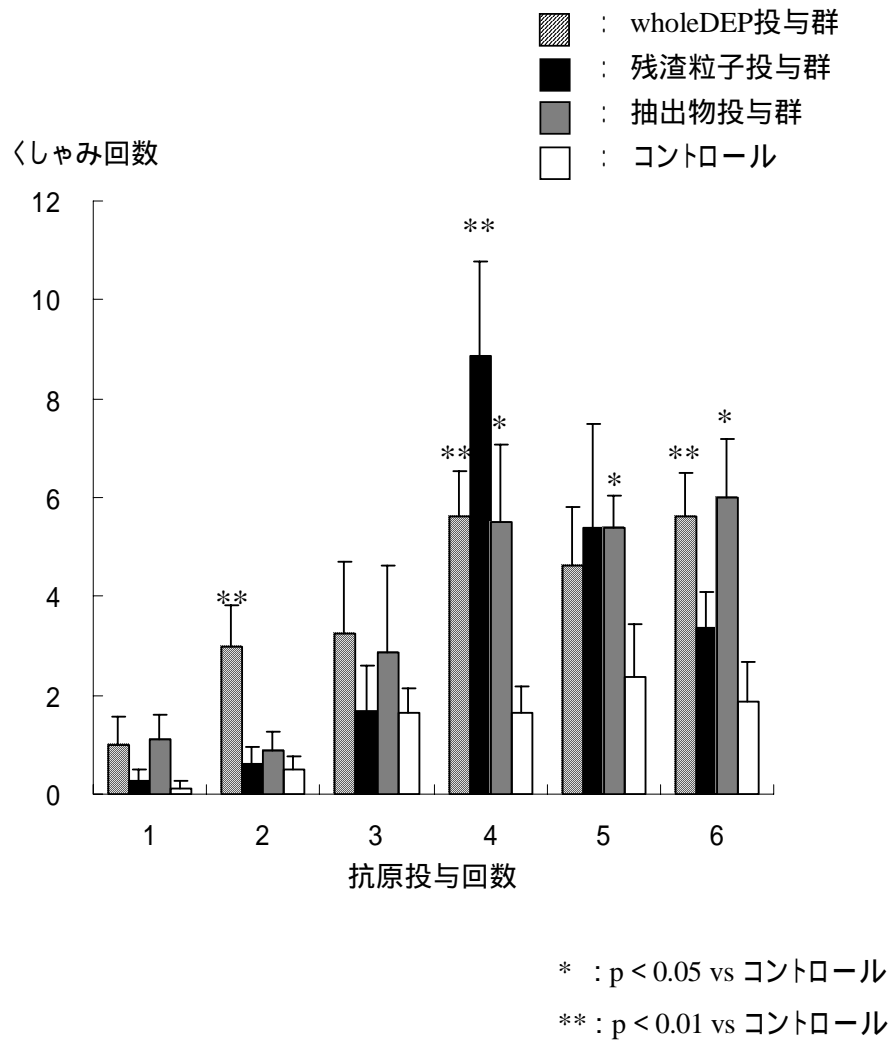
図4a モルモット上部頭蓋骨

鼻中隔



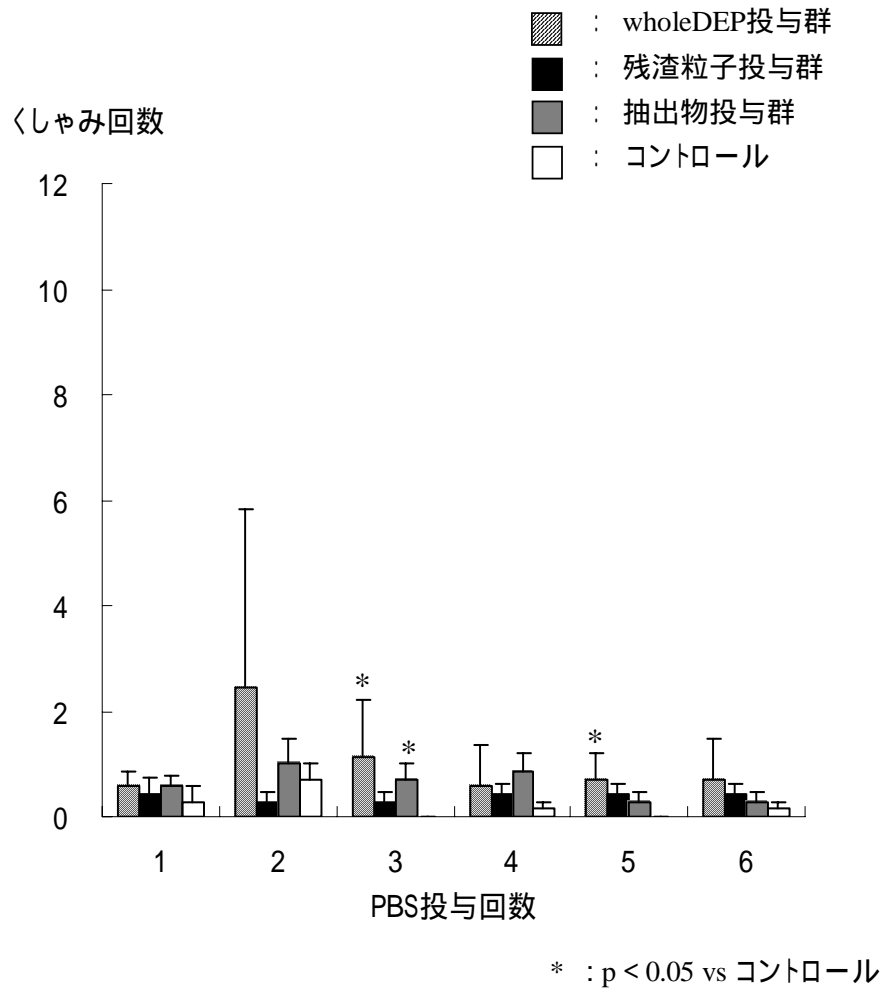
好酸球浸潤数測定部位

図4b 組織切片図



**図5 DEP中の構成成分の抗原併用投与がくしゃみ回数に及ぼす影響**

DEP及び吸着物質が抗原投与によるくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値±標準誤差で示した。\*及び\*\*は対照との間の有意差を示した。



**図6 DEP中の構成成分のPBS併用投与がくしゃみ回数に及ぼす影響**

DEP及び吸着物質がPBS投与によるくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。



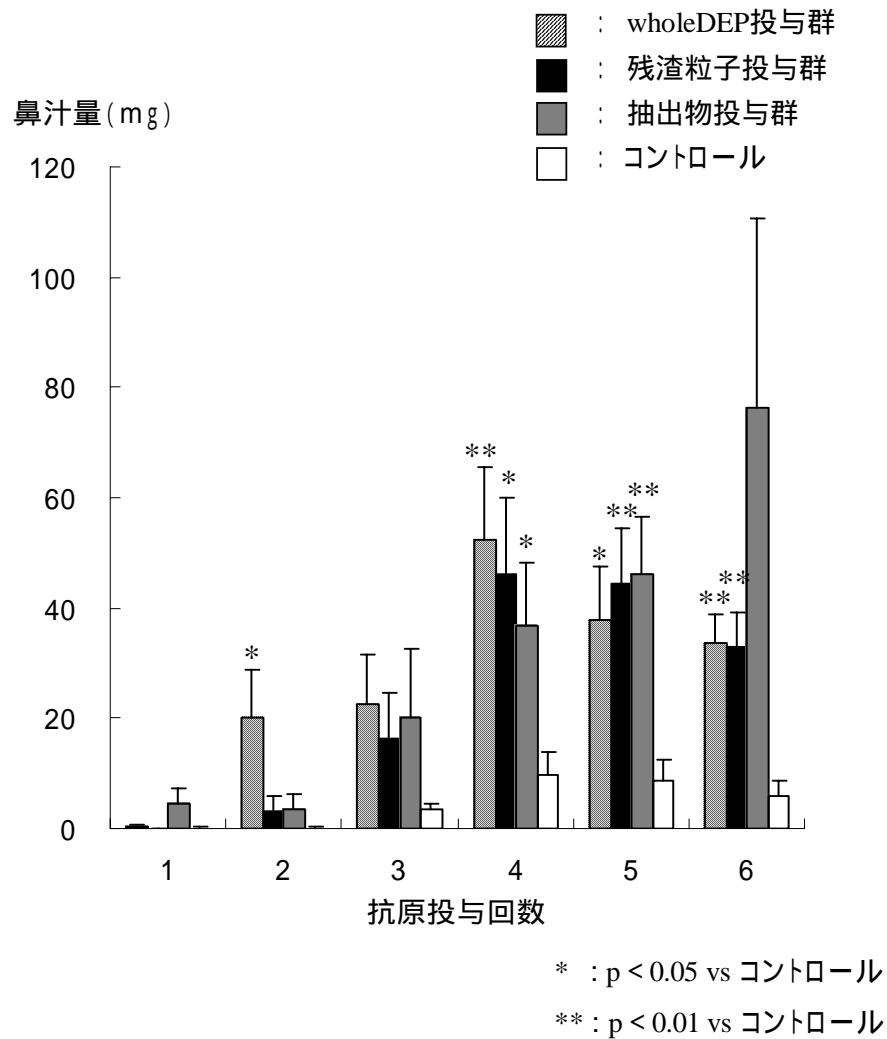
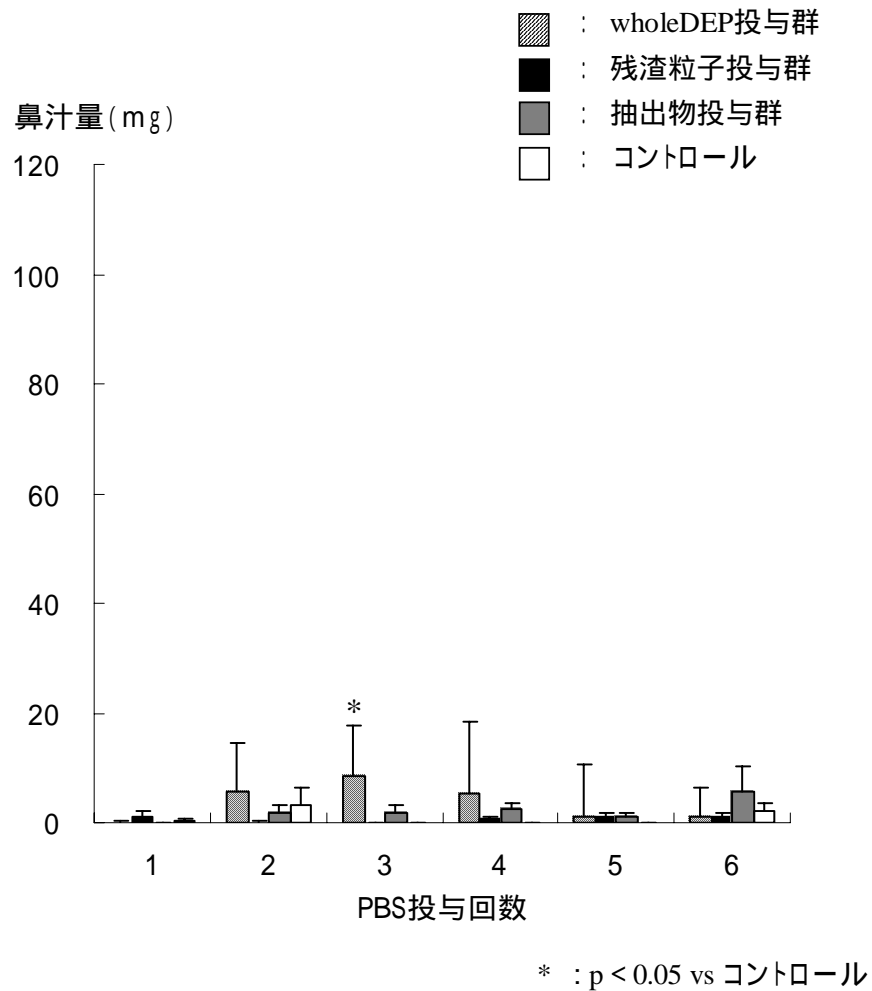


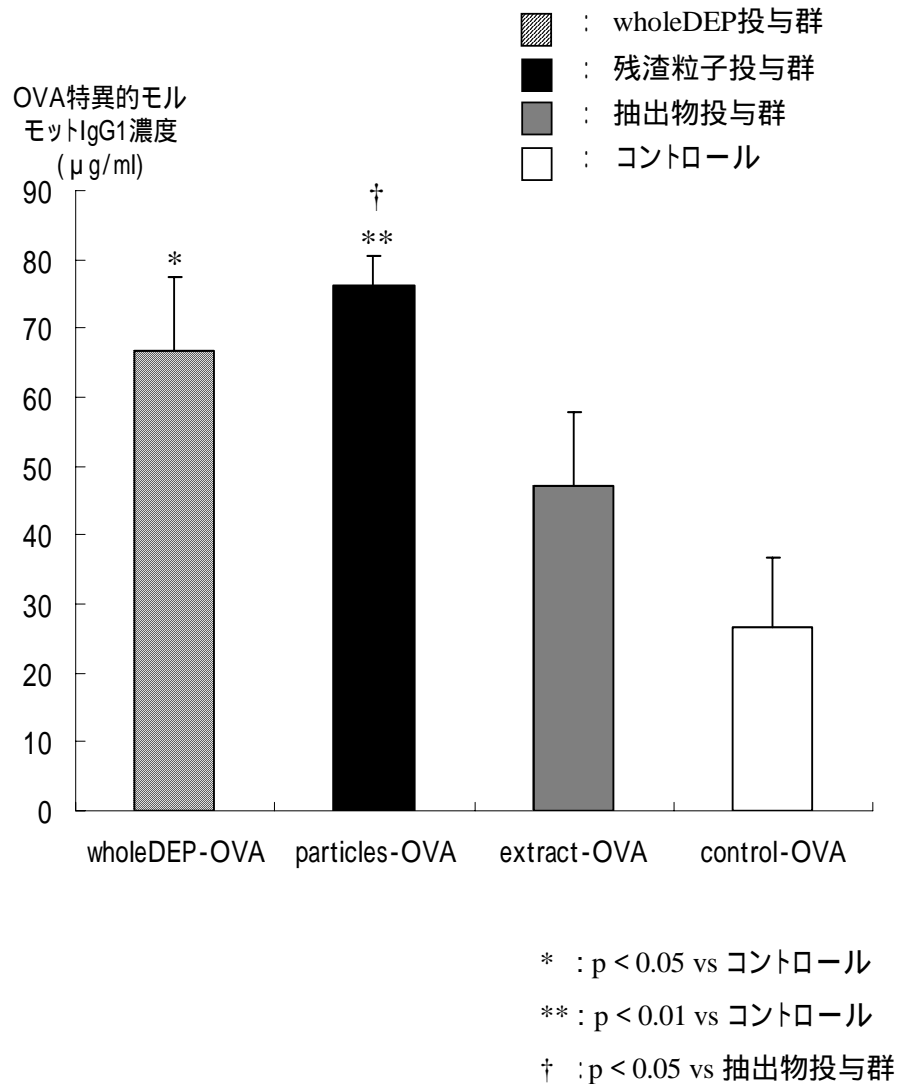
図7 DEP中の構成成分の抗原併用投与が鼻汁量に及ぼす影響

DEP及び吸着物質が抗原投与による鼻汁量に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。\*及び\*\*は対照との間の有意差を示した。



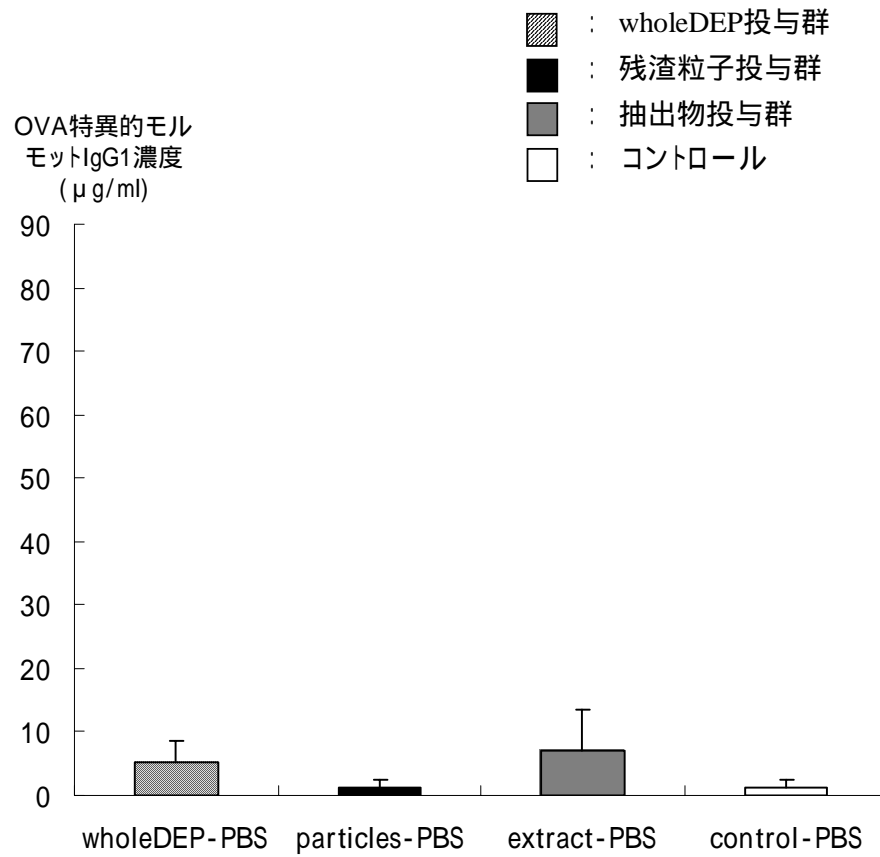
**図8 DEP中の構成成分のPBS併用投与が鼻汁量に及ぼす影響**

DEP及び吸着物質がPBS投与による鼻汁量に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。



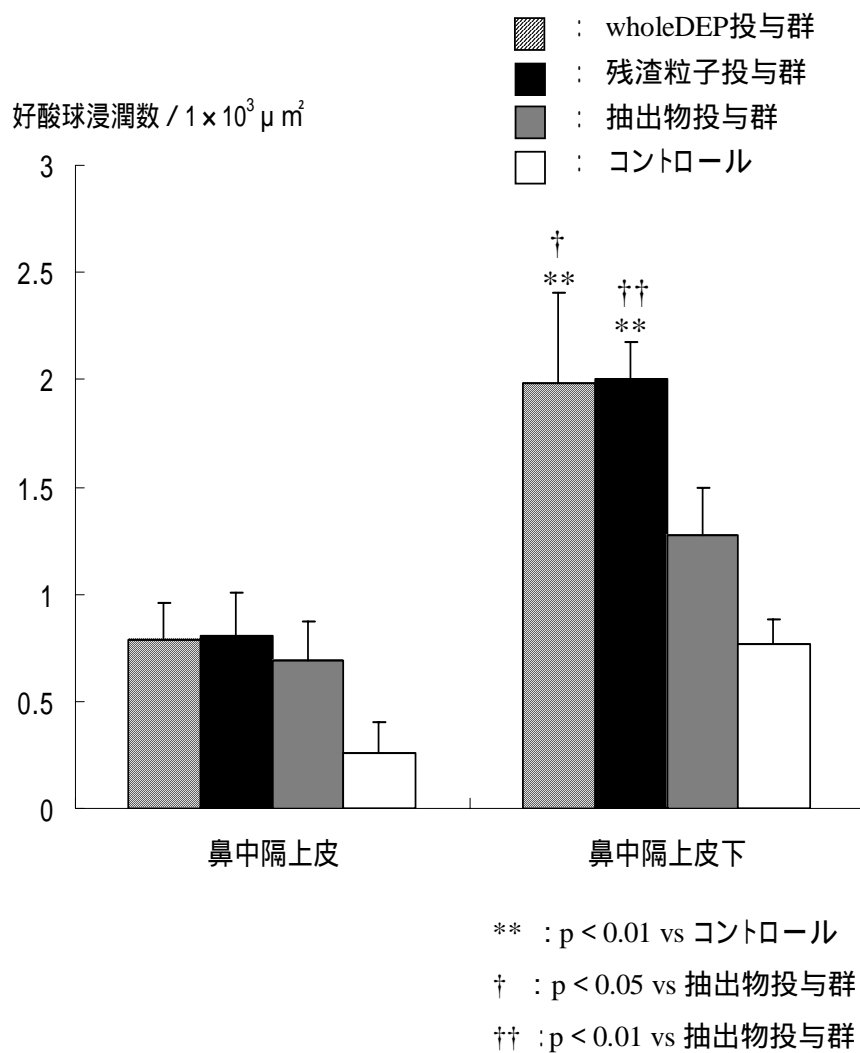
**図9 DEP中の構成成分の抗原併用投与が抗原投特異的Ig G1抗体産生に及ぼす影響**

DEP及び吸着物質が抗原投与による抗原特異的抗体価に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。\*及び\*\*は対照との間の有意差を示した。



**図10 DEP中の構成成分のPBS併用投与が抗原特異的IgG1抗体産生に及ぼす影響**

DEP及び吸着物質がPBS投与による抗原特異的抗体価に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。



**図11 DEP中の構成成分の抗原併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響**

DEP及び吸着物質が抗原投与による好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。\*\*、†、††は対照との間の有意差を示した。

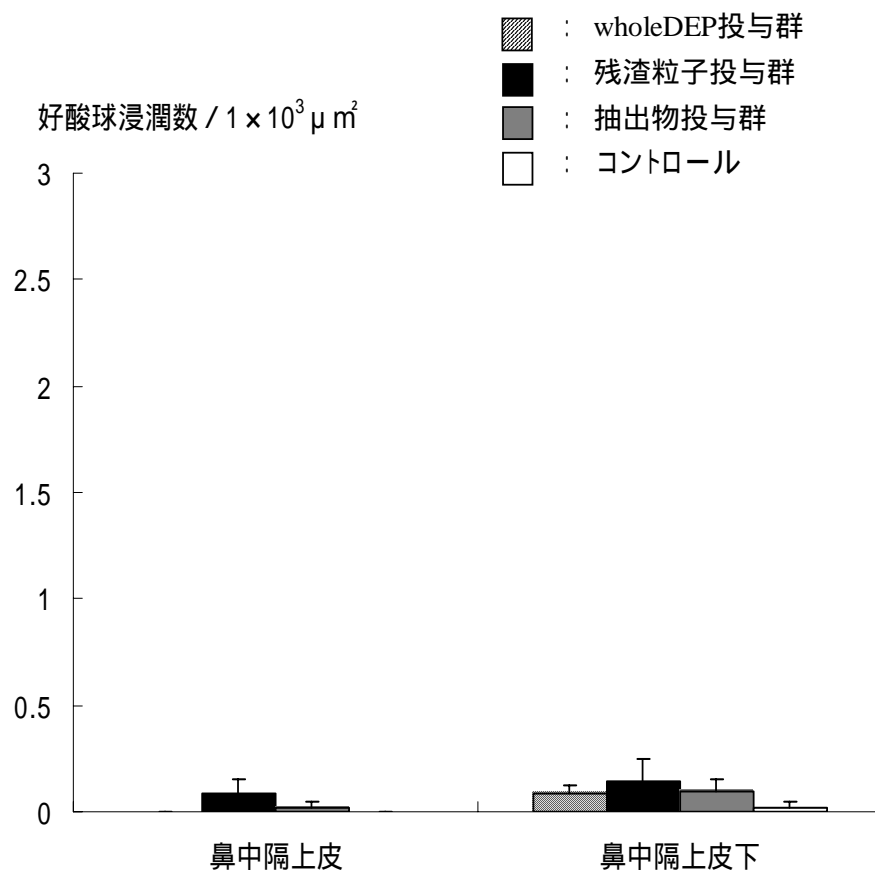
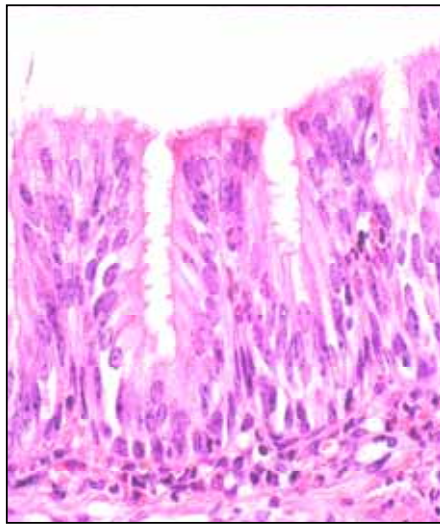
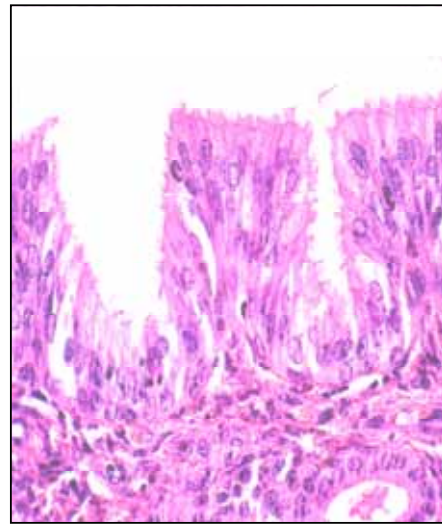


図12 DEP中の構成成分のPBS併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響

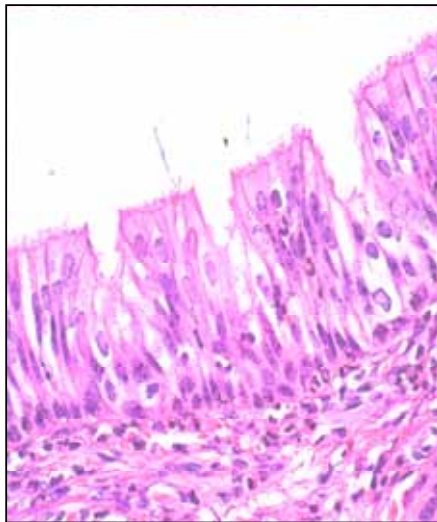
DEP及び吸着物質がPBS投与による好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。



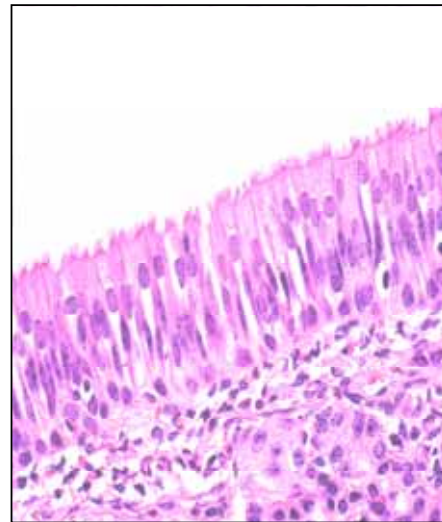
wholeDEP+OVA



残渣粒子+OVA

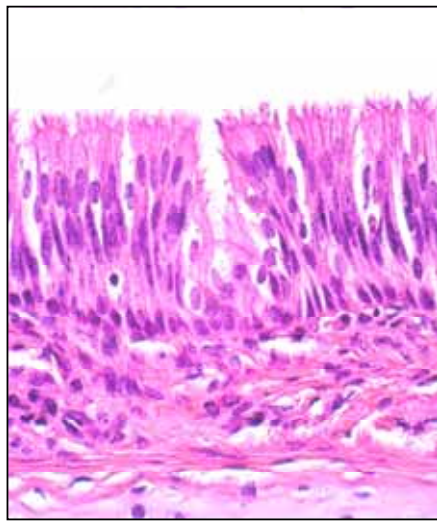


抽出物+OVA

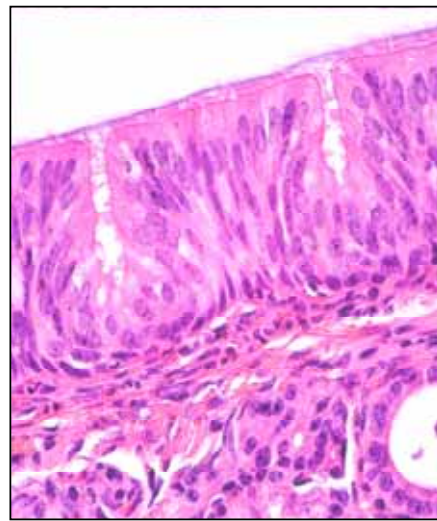


OVAのみ

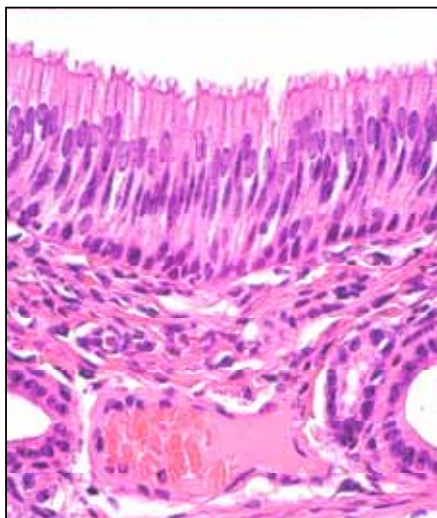
図13 DEP中の構成成分の抗原併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響



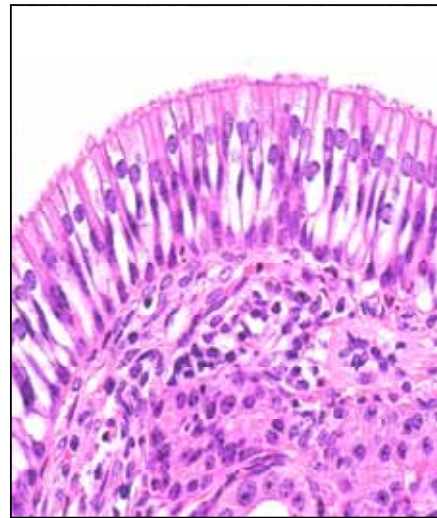
wholeDEP+PBS



残渣粒子+PBS



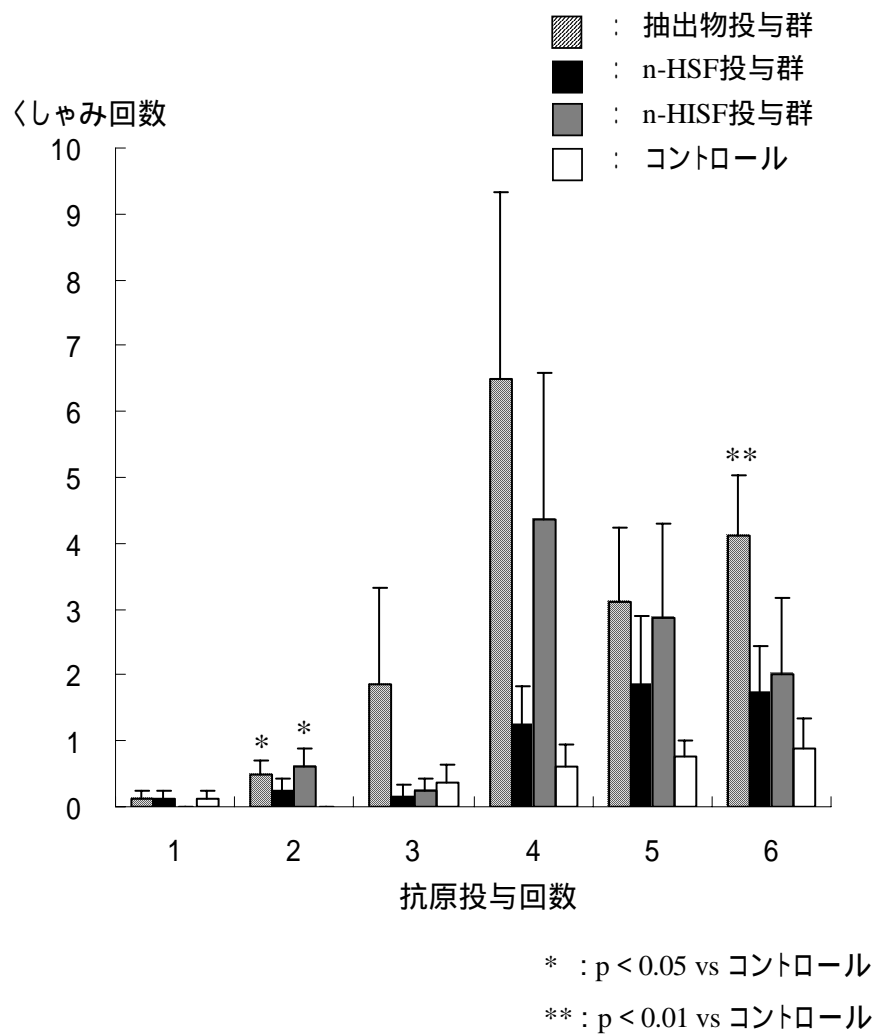
抽出物+PBS



PBSのみ

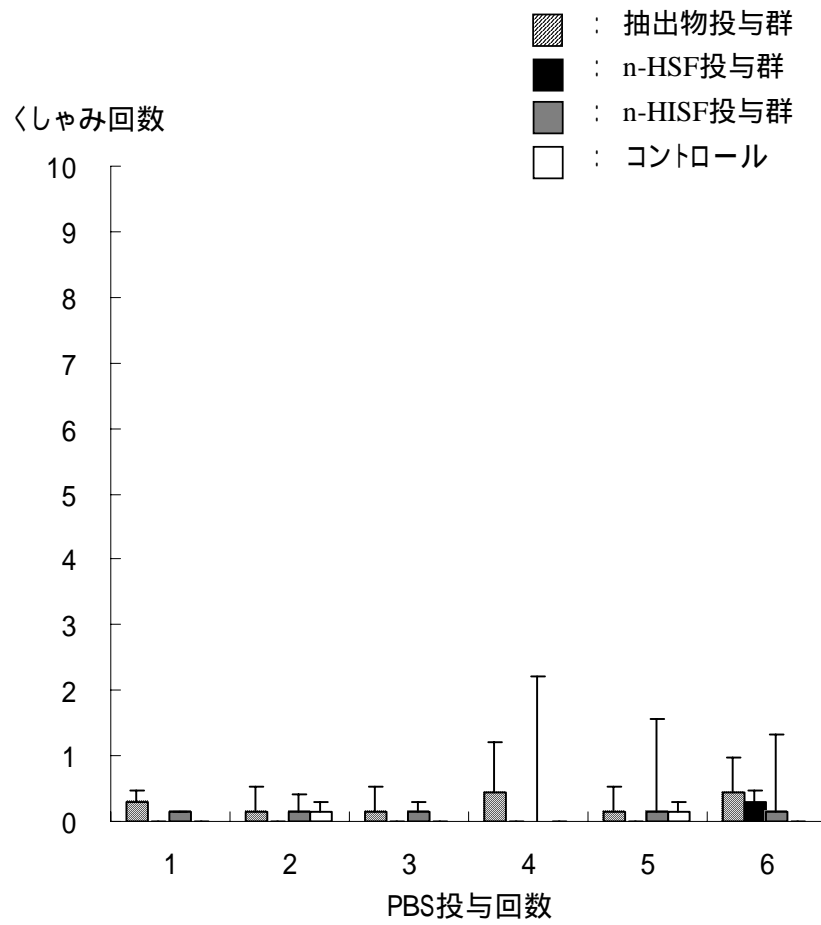
図14 DEP中の構成成分PBS併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響





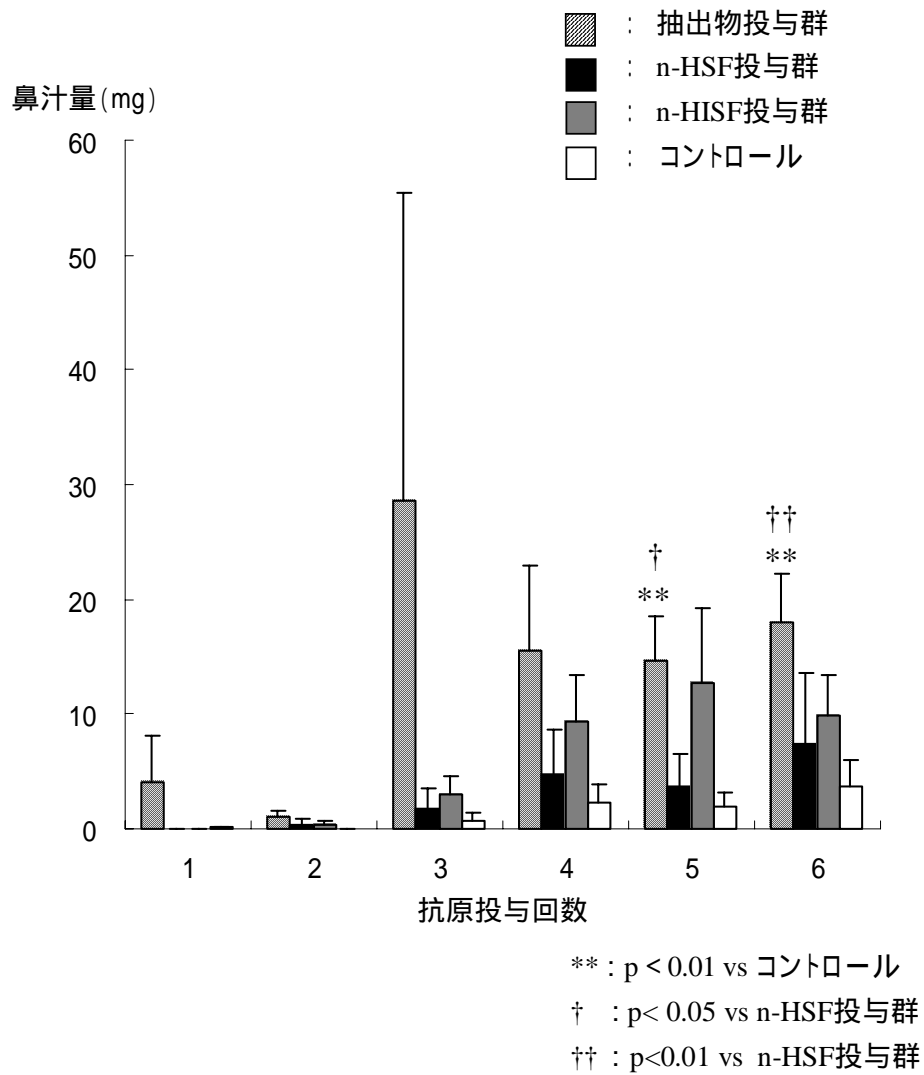
**図15 DEPの有機成分分画の抗原併用投与がくしゃみ回数に及ぼす影響**

DEP中の有機成分が抗原投与によるくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。\*及び\*\*は対照との間の有意差を示した。



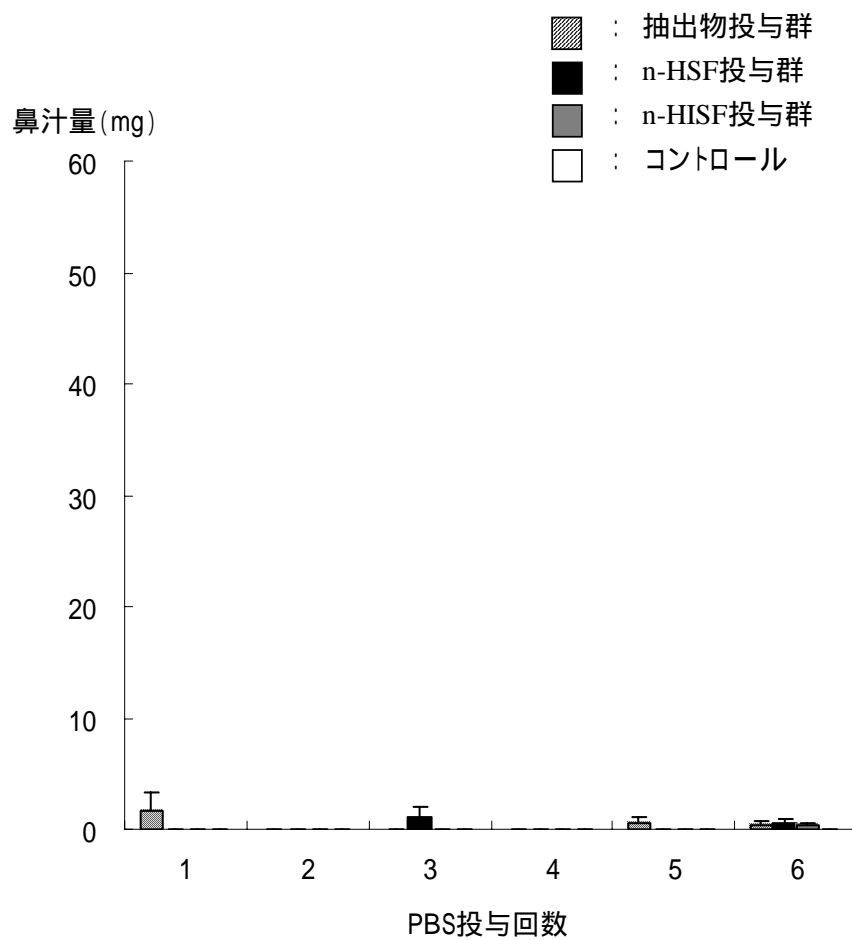
**図16 DEPの有機成分分画のPBS併用投与がくしゃみ回数に及ぼす影響**

DEP中の有機成分がPBS投与によるくしゃみ回数に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。



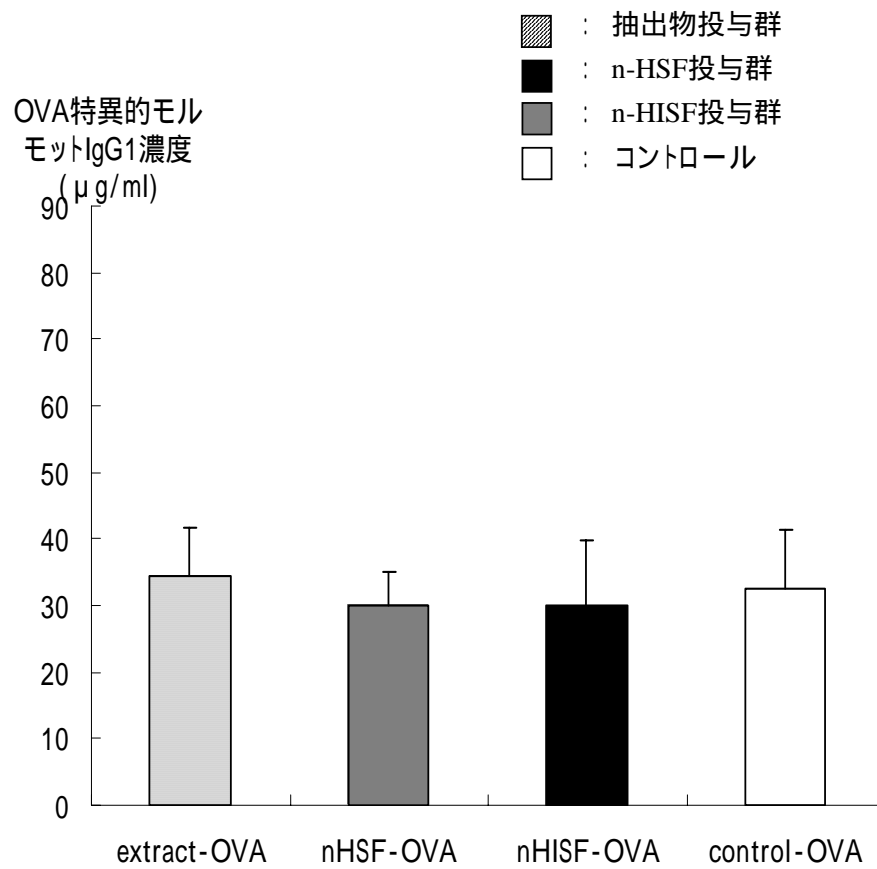
**図17 DEPの有機成分分画の抗原併用投与が鼻汁量に及ぼす影響**

DEP中の有機成分が抗原投与による抗原特異的抗体価に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。\*\*、†、††は対照との間の有意差を示した。



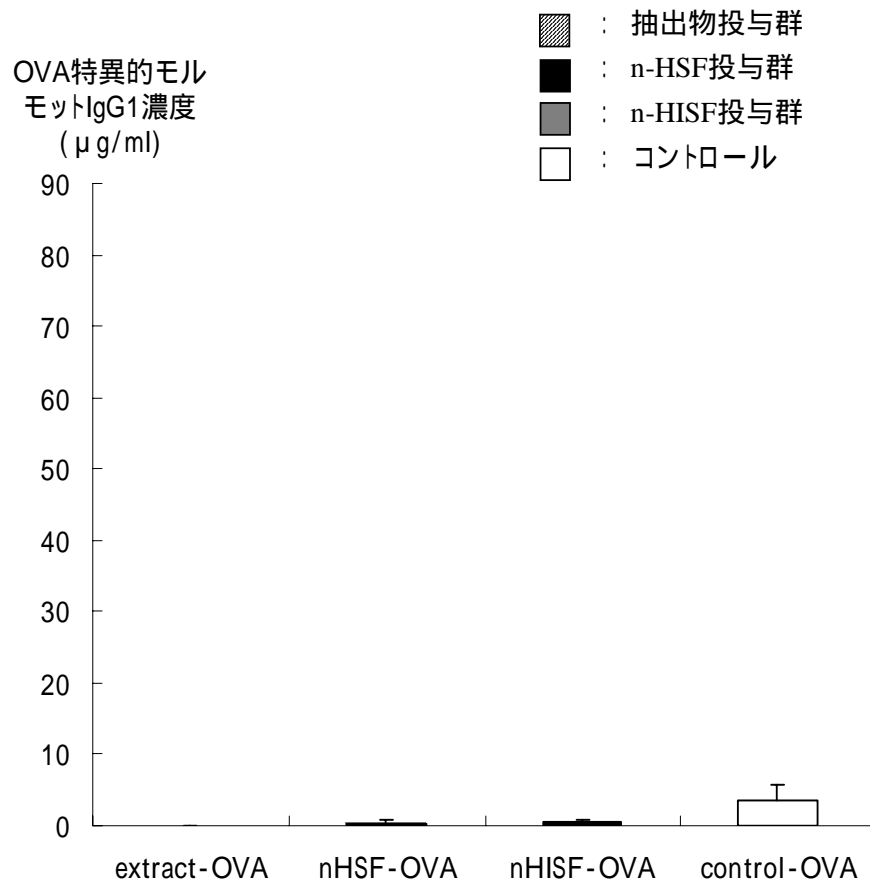
**図18 DEPの有機成分分画のPBS併用投与が鼻汁量に及ぼす影響**

DEP中の有機成分がPBS投与による鼻汁量に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。



**図19 DEPの有機成分分画の抗原併用投与が抗原特異的IgG1抗体産生に及ぼす影響**

DEP中の有機成分が抗原投与による抗原特異的抗体価に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。



**図20 DEPの有機成分分画のPBS併用投与が抗原特異的IgG1抗体産生に及ぼす影響**

DEP中の有機成分がPBS投与による抗原特異的抗体価に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

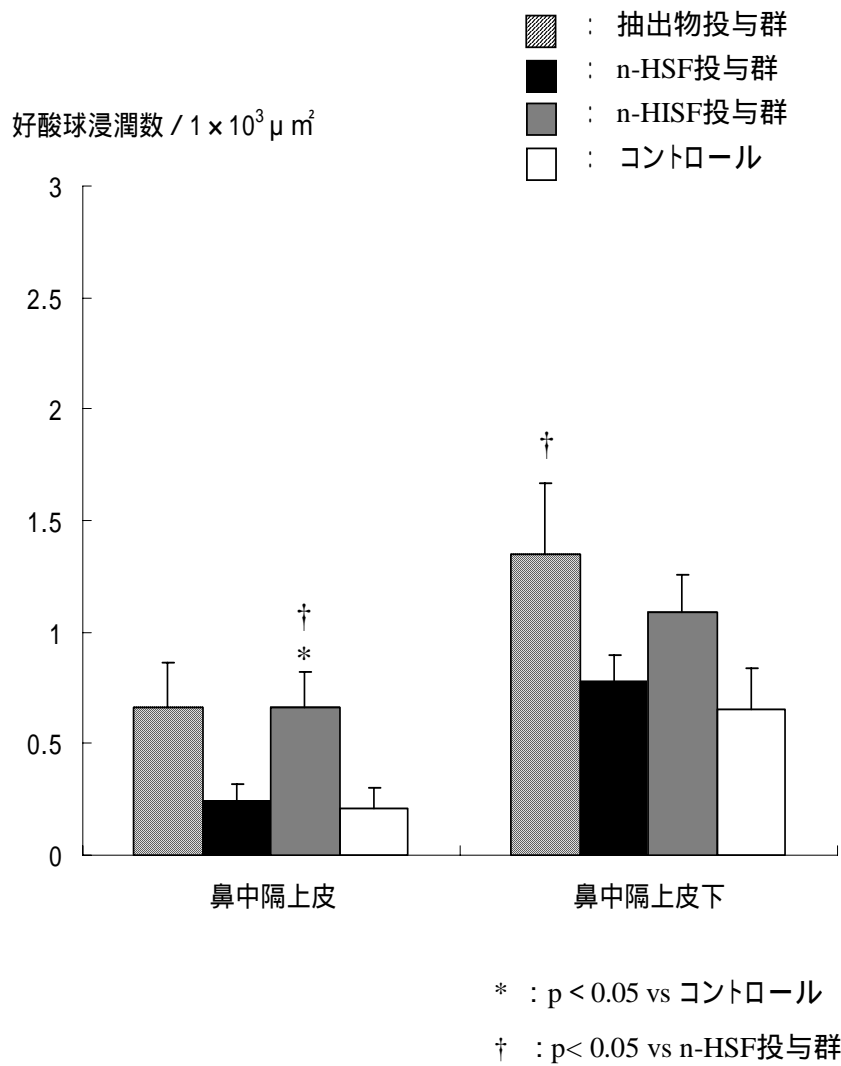


図21 DEPの有機成分分画の抗原併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響

DEP中の有機成分が抗原投与による好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。\*及び†は対照との間の有意差を示した。

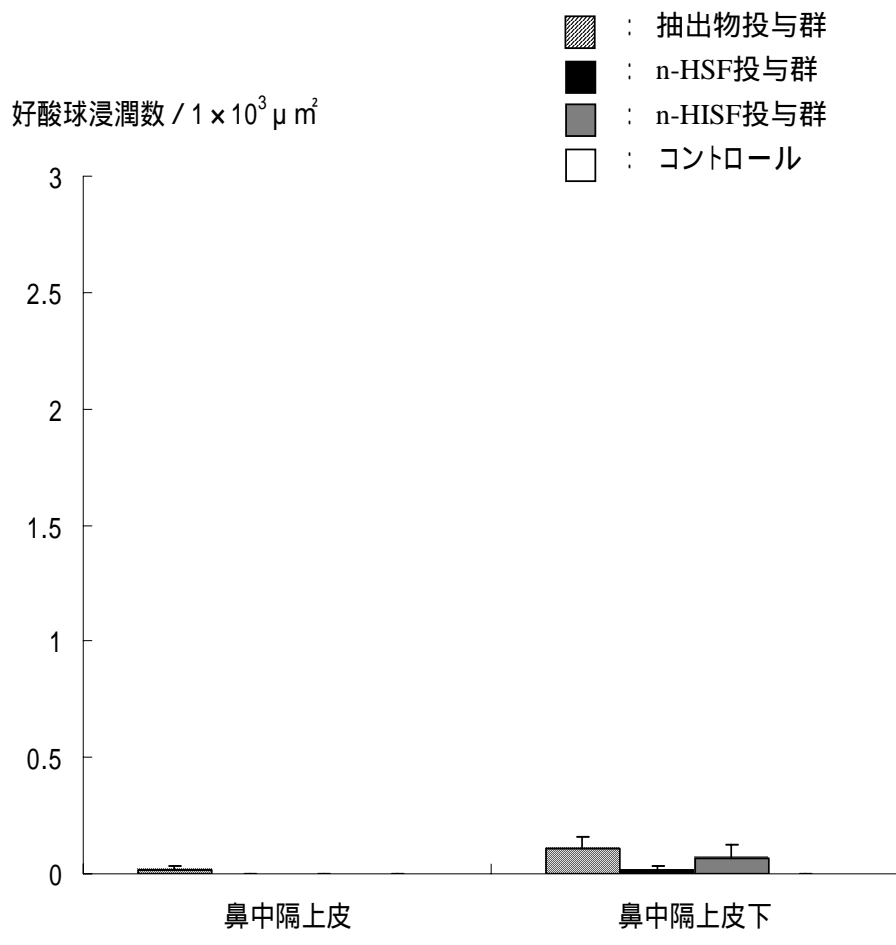
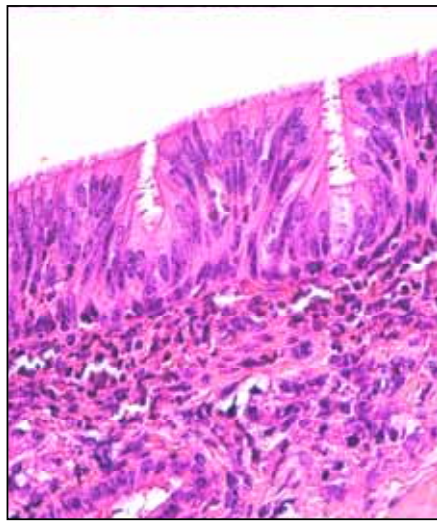


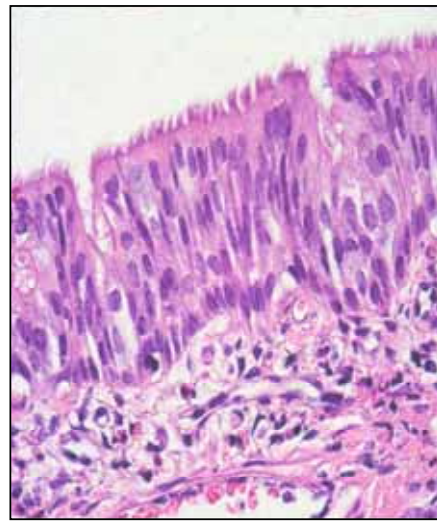
図22 DEPの有機成分分画のPBS併用投与が好酸球浸潤に及ぼす影響

DEP中の有機成分がPBS投与による好酸球浸潤に及ぼす影響を検討した結果を示した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した。

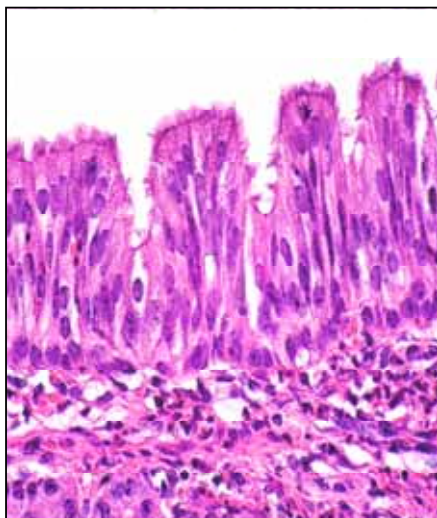




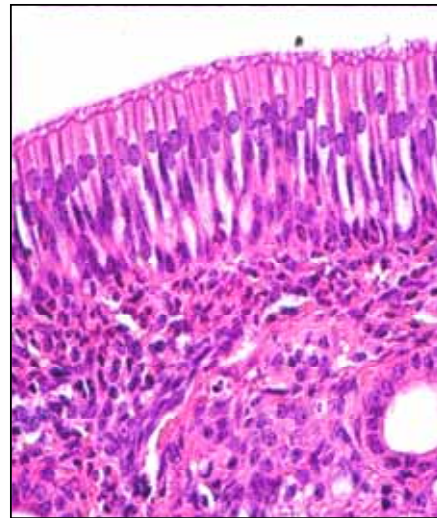
抽出物+OVA



n-HSF+OVA

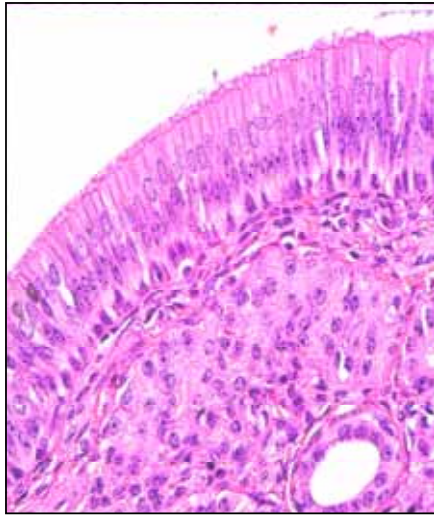


n-HISF+OVA

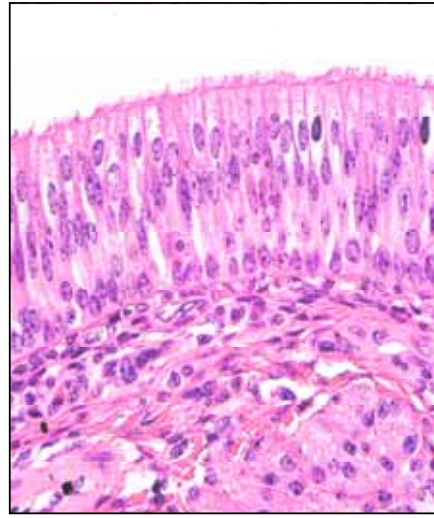


OVAのみ

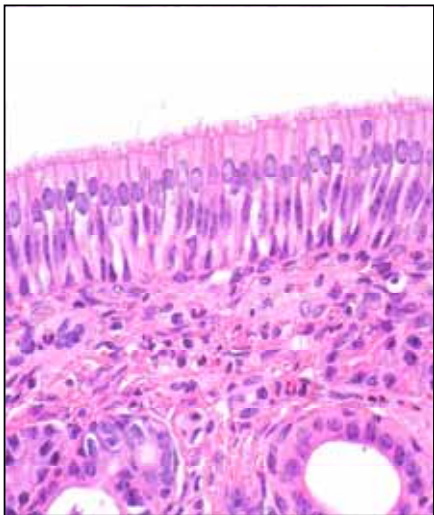
図23 DEPの有機成分分画の抗原併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響



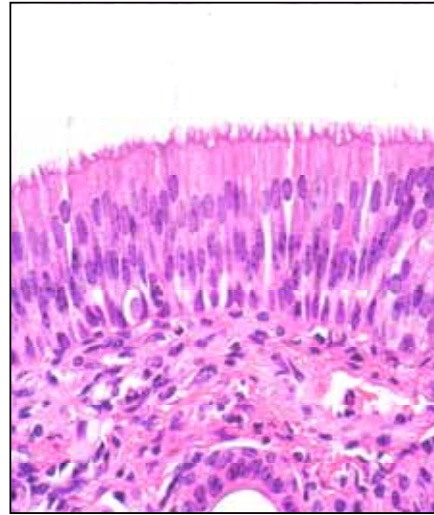
抽出物+PBS



n-HSF+PBS



n-HISF+PBS



PBSのみ

図24 DEPの有機成分分画のPBS併用投与が鼻粘膜組織に及ぼす影響