
各種大気汚染物質の抗原吸入に対する
抗原特異的 I g E 抗体産生能への影響

(研究課題番号 01570301)

平成3年度科学研究費補助金(一般研究C)研究成果報告書

平成4年3月

研究代表者 香川 順
(東京女子医科大学医学部・教授)

目 次

はしがき

本研究の目的

研究組織

研究経費

発表業績

研究成果

今後の展望と課題

参考文献

は し か き

近年、花粉症や気管支喘息等のアレルギー疾患の増加が大きな注目を集めるようになってきている。すでにアレルギーは一種の文明病として人口にカインシャされている。これまでに、食生活の変化、精神的ストレスの増加、抗原物質の増大等、いくつかの要因が挙げられているが、その因果関係は未だ明らかではない。

一方、近年の免疫学のめざましい進歩は、アレルギーに関する知見を飛躍的に増大していることもまた事実である。その中で、アレルギー性疾患の診断および感作抗原の推定に既に不可欠となっている特異的抗体の半定量法が果たしている役割は多大なるものがある。今後は、この手法を用いた発症機構や、抗体産生調節機構の解明を目的とする研究が盛んに行われることが期待される。

本研究はアレルギー疾患増加の最も可能性の高い原因の一つである、大気汚染物質吸入がアレルギー発症にどのような修飾を行うかを研究するものであり、その手段の一つとして特異抗体半定量法を用いることを試みたものである。

本報告は平成元年から平成3年度の3年度にわたり科学研究費補助金（一般研究C、課題番号01570301）によって実施した研究の結果報告である。

研究組織

研究代表者：香川 順（東京女子医科大学医学部衛生学公衆衛生学教室 教授）

研究分担者 佐藤 敏彦（東京女子医科大学医学部衛生学公衆衛生学教室 助手）
 山野 優子（ 同 助手）

研究協力者 中館 俊夫（ 同 助教授）
 石原 陽子（ 同 専任講師）
 森信 茂（ 同 助手）

研究経費

平成元年度	1, 0 0 0 千円
平成2年度	6 0 0 千円
平成3年度	6 0 0 千円

計	2, 2 0 0 千円
---	-------------

研究発表

I 学会誌等

- 1)Sato, T. Kagawa, J. et al. Effects of 2.5ppm NO₂ exposure on allergic sensitization in the guinea pig. J.Allergy Clin.Immunol. (投稿予定)
- 2)Sato, T. Kagawa, J. et al. Timecourse of allergic reaction during continuous allergen exposure in the guinea pig. Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. (投稿予定)

研究成果

アレルギー発現におけるNO₂吸入曝露の影響について

はじめに

これまでに、二酸化窒素、二酸化硫黄、ディーゼル排気粒子などの大気汚染物質がアレルギー物質の感作を増強させるという幾つかの動物実験結果が報告されている。しかしながら、これらは何れも、アレルゲン、汚染物質とも非常に高濃度の曝露条件下で行ったものであり、これらの結果を直ちに我々ヒトの実際の現象に外挿させることには無理がある。我々は、より現実的な曝露条件のもとにおいても、大気汚染物質がアレルギー発現の修飾因子として作用するかどうかを調べることを目的として本実験を行った。

1. 方法

(1) 対象および曝露スケジュール

曝露開始時10週齢の雄性Hatrey系モルモット（（株）日本エスエルシーより購入）を使用した（曝露開始時体重550-650g）。曝露実験は以下のように全部で3系列施行したが、1回の曝露実験ではそれぞれ20匹、計60匹を用いた。

- ① 25mg/m³ OA 単独曝露
- ② 5mg/m³ OA 単独曝露
- ③ 5mg/m³ OA + 2.5ppm NO₂ 混合曝露

曝露はそれぞれ1日4時間／週5日／4週間とし、③のNO₂曝露はOA（卵白アルブミン）と同時に混合曝露として行なった。

(2) 曝露システム

曝露チャンバーとして容積500リットルの縦層流式の角錐型チャンバーを使用した。このチャンバーにはヘパフィルター、活性炭フィルターで濾過した温湿度一定の清浄空気を毎分150リットルで供給した。O A エロゾール及びNO₂はそれぞれ、超音波ネブライザー（オムロン社製NE-U10B）、1%NO₂標準ガスボンベより発生させ、ヘパフィルター、活性炭フィルターで濾過した温湿度一定の毎分150リットルの清浄空気に予め混合希釈し、曝露チャンバー内に供給した。曝露チャンバー内には4つのケージにそれぞれ5匹ずつのモルモットを入れて同時に20匹の曝露を行なうものとした。

O A エロゾールは卵白アルブミン（Ovalbumin, シグマ社製グレードV）を1%生理食塩水溶液として、上記のように超音波ネブライザー（UN）にて発生させたが、発生量調節のためにUNを一部改造して使用した。即ち、UNの薬槽への送気にミニポンプを用い、送気量を調節することにより行なうようにした。また、エロゾール粒径を均一にするために、ダクトにより1.5m程上方に一旦引き上げた後に清浄空気と混合するよう工夫した。これにより比較的大粒径のエロゾールは下方に落下することが期待された。O A エロゾール濃度はチャンバー内に設置した光散乱を原理とするデジタル粉塵計（PCD-1, 柴田科学）を用いて連続的にモニタリングしながら調節を行なった。

ガスボンベより発生させた1%NO₂標準ガスは、フローコントロールバルブ（CF121, 大倉電気）を用いて調節、希釈を行なった。チャンバー内NO₂濃度は化学発光式窒素酸化物自動測定機（MODEL-265SR, 紀本電子）を用いて連続的にモニタリングした。

(3) 呼吸抵抗およびヒスタミン吸入テスト

1週間のうち月、水、金の3回、曝露直前直後にオシレーション法によりモルモットの呼吸抵抗（R_{rs}）を測定した。オシレーション法は、体外から一定の周波数の圧波を負荷し、それによって生ずる気流から呼吸器系のインピーダンスを測定するものである。測定装置は香川の方法（1967）によった。曝露直後の測定はチャンバーより順次1匹ずつ取り出し、O A 曝露終了5分以内に測定を行なうこととした。

1群20匹中の半数の10匹に対し、4週間の曝露終了の翌日（土曜日）にヒスタミン吸入による気道反応性テストを行なった。すなわち、まず2分間R_{rs}を測定して、その平均をベースライン値とし、次にジェットネブライザーにより発

生させた生理食塩水エロゾールを10呼吸吸入させ、直後の2分間のRrsを測定、続いて0.0625、0.125、0.25・・・と順次2倍の濃度のヒスタミンエロゾールを吸入させ、同様に直後2分間のRrsが2倍以上になる濃度を測定した。

(4) 免疫学的検査

1群20匹のうち半数の10匹については最終曝露日の曝露後呼吸抵抗測定後直ちに、心臓採血およびBAL（気管支肺胞洗浄）を行なった。また、残りの10匹については上記のとおり翌日にヒスタミン吸入反応試験を行なった後に心臓採血のみを行なった。これらにより得られた、血清およびBALF（気管支肺胞洗浄液）中の全IgG、IgG1、およびOA特異的IgG、IgG1をELISAを用いて測定を行なう。

2. 結果（実験③については第3週終了時まで）

（1）O A エロゾール濃度および粒形

表1に①、②、③の各実験における、デジタル粉塵計により10秒毎に測定、記録されたO A エロゾールの濃度を示す。4時間曝露中の時間荷重平均濃度（TWA）は、設定濃度 $25\text{mg}/\text{m}^3$ においても、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ においても、ほぼ達成され、NO₂曝露群と非曝露群においても差は認められなかった。

表1 O A エロゾール曝露濃度

単位： mg/m^3

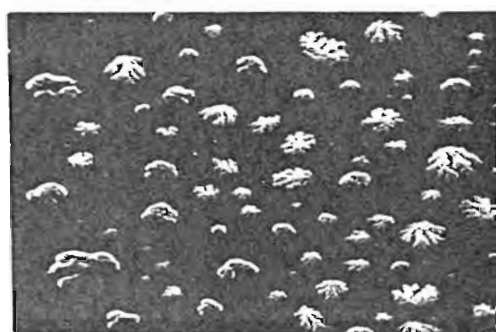
	1日のTWA			瞬間*	
	平均値	最大値	最小値	最大値	最小値
① (n=20)	25.1	27.1	23.8	29.5	20.5
② (n=20)	5.1	5.3	4.8	6.0	4.4
③ (n=15)	5.0	5.4	4.8	5.9	4.2

* 4時間×20日（15日）のうちに1分間以上にわたり測定された値

図1、2に、それぞれ② $5\text{mg}/\text{m}^3$ O A 単独、③ $5\text{mg}/\text{m}^3$ O A + NO₂曝露におけるマイクロポアメンブレン上に採取したO A エロゾールの走査電子顕微鏡像を示した。像は食塩粒子を核とするO A を示しているものと考えられるが、何れもほぼ同様の大きさ、形を示しており、気道沈着に対する状況はほぼ同様と思われる。

（2）NO₂濃度

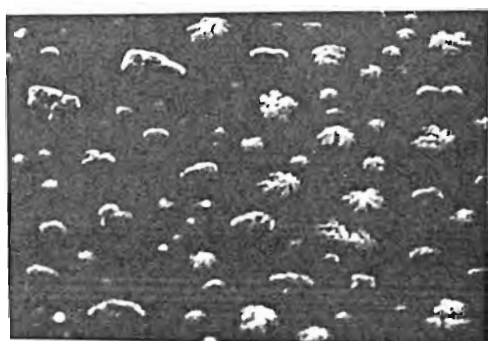
3週間め終了時までのNO₂濃度の4時間の時間荷重平均値は2.47～2.52 ppm 設定濃度に達した後の最小値は、2.38ppm、最大値は2.70ppmであった。



10μm



図1 O A エロゾール電子顕微鏡像 (②単独曝露)



10μm



図2 O A エロゾール電子顕微鏡像 (③+N02)

(3) 曝露チャンバー内温湿度

各クールにおいて曝露中に測定された温湿度はそれぞれ次のとおりであった。

- ① 温度24.5～26.0℃、湿度54～67%
- ② 温度23.5～25.5℃、湿度46～55%
- ③ 温度24.0～26.0℃、湿度44～54%

25mg/m³ O₃ A 曝露において、やや湿度が高くなる傾向があるものの、温湿度条件は、ほぼ同一と考えられる。

(4) 呼吸抵抗変化

図3に①25mg/m³ O₃ A 曝露における呼吸抵抗変化を示す。一つの図にはそれぞれ各ケージ5匹ずつを表わした。呼吸抵抗変化は曝露前の値に較べたO₃ A 曝露直後の値の増加をパーセンテージで表わしている。即ち100%は曝露後の呼吸抵抗値が曝露前のそれに較べ2倍になったことを示す。また、日数は曝露開始日より実際に経過した日数を示した。同様にして図4に②、図5に③における呼吸抵抗変化を示した(但し図5は第3週終了時まで)。

図3より曝露開始10日目に、急激な変化が起こっていることがわかる。20匹中8匹において呼吸抵抗100%以上の増加が認められた(但し1匹は曝露中に死亡したため400%とした)。しかしながら、このような変化はそのまま曝露期間中持続するわけではなく、ほぼ元の状態に戻ってしまうものもあった。また、経時的な変動については特に一定のパターンを示さなかった。

図4の5mg/m³ O₃ A 単独曝露の場合には、図3に較べ、全体的に呼吸抵抗の変化が小さいことがわかる。呼吸抵抗の上昇は12日目に顕著であった。

図5のNO₂同時曝露においては、更に呼吸抵抗変化が小さい傾向が認められる。但し、曝露開始8日目に数匹のモルモットに軽度の呼吸抵抗上昇が認められた。しかしながら、この上昇は同一モルモットにおいて再び観察されなかった。

表2、4、6に①、②、③の曝露後の呼吸抵抗変化が2倍以上となったものを示した。記号A B C Dはケージを表しており各5匹ずつであり、1行に1匹を表している。すなわち、例えば表2のケージAの一番上の行のモルモットは10日目と17日目と22日目に2倍以上になったことを示している。

これらの表から、曝露期間中一度でも呼吸抵抗が2倍以上になったモルモット数は、①が20匹中16匹(死亡1匹含む)、②が9匹(但し3週まででは5匹)、③が5匹(3週終了時まで)となる。

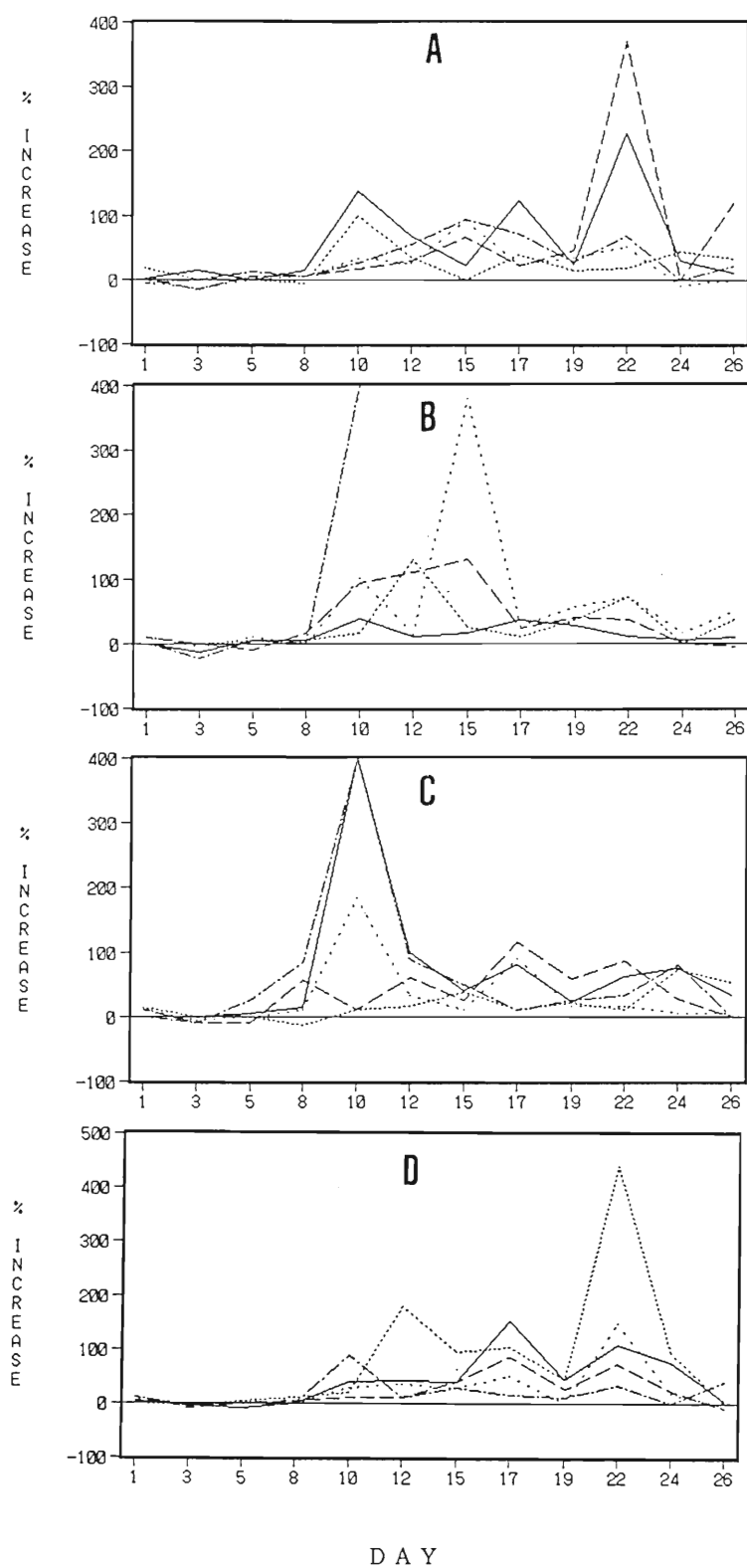


図3 O A 4 時間曝露直後呼吸抵抗 ①

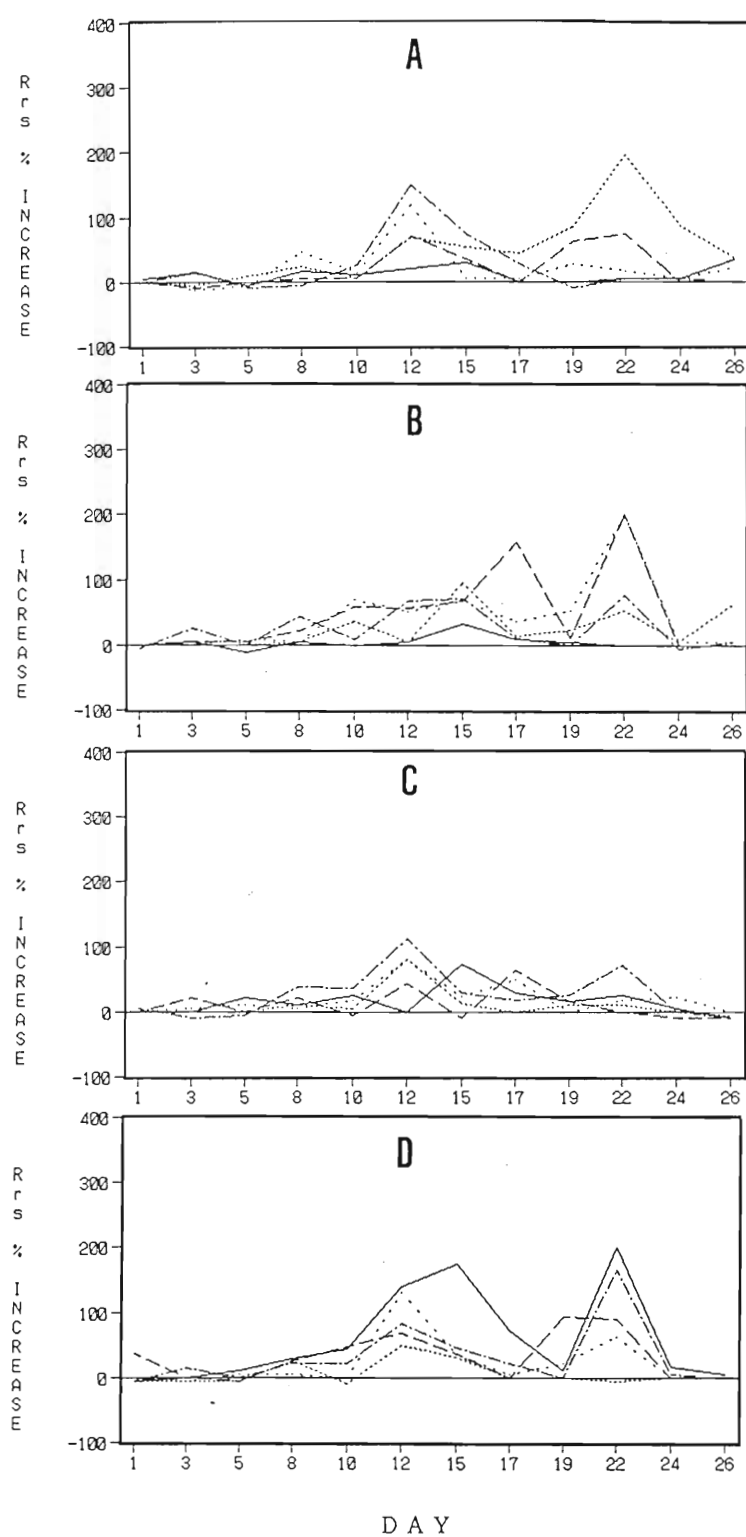


図4 ○ A 4時間曝露直後呼吸抵抗 ②

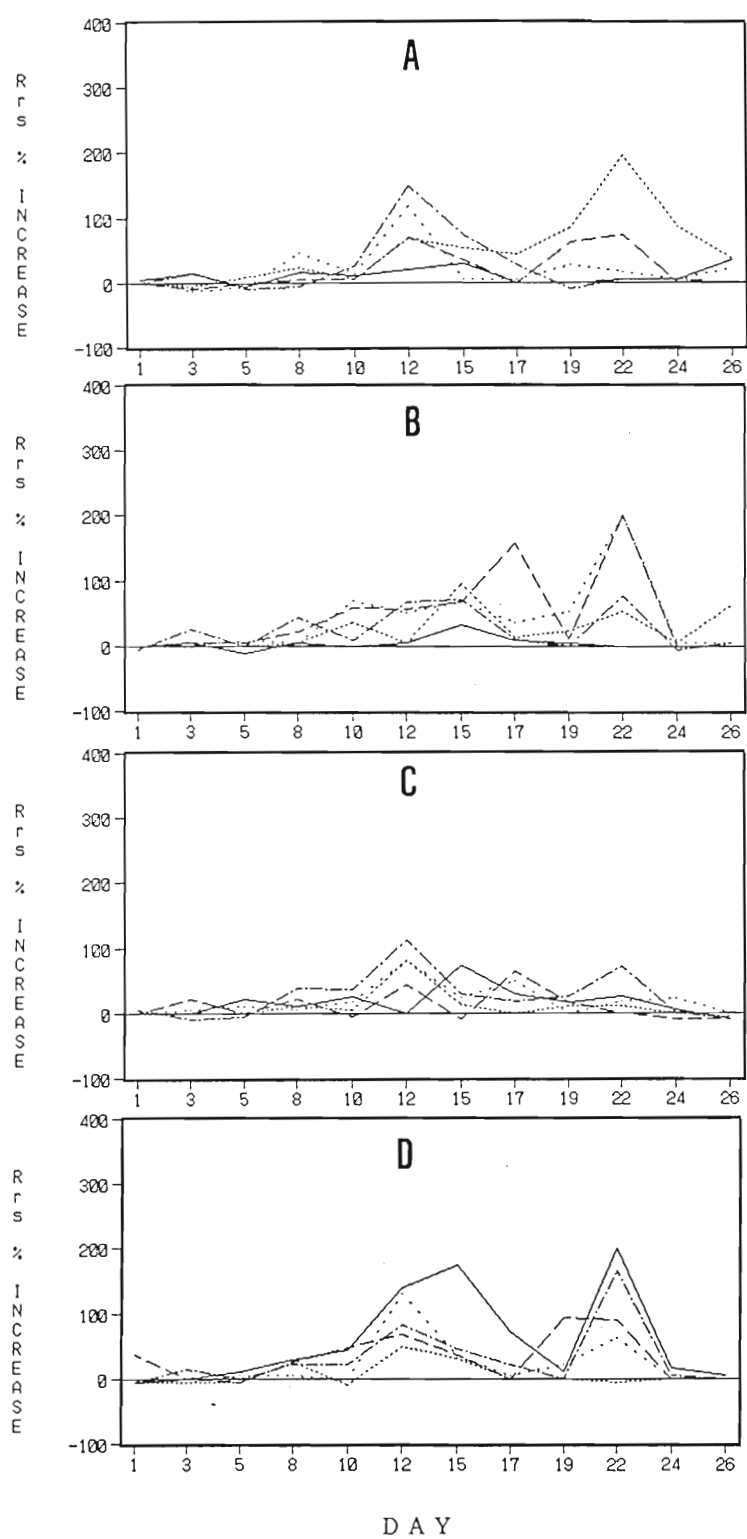


図4 ○ A 4時間曝露直後呼吸抵抗 ②

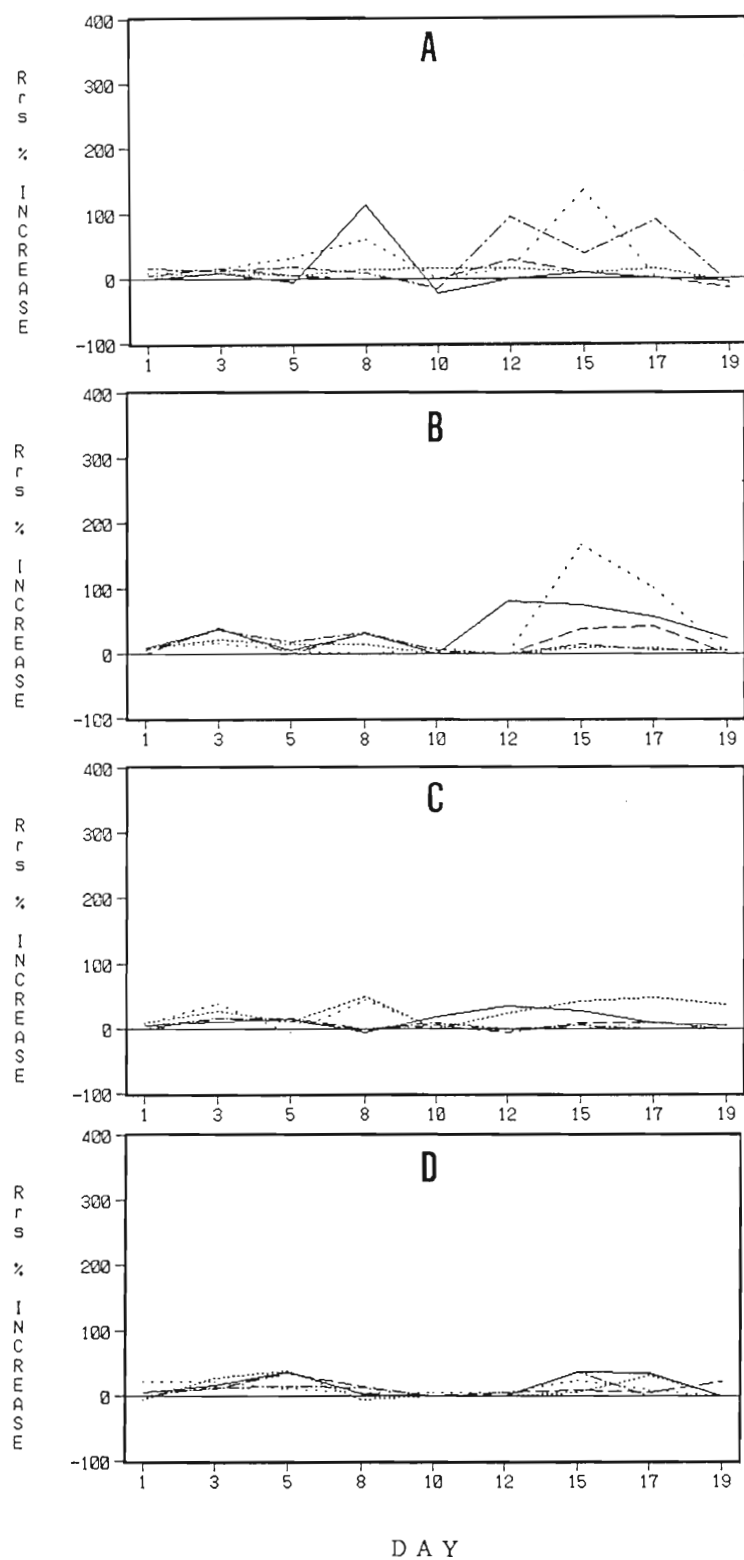


図5 O A 4時間曝露直後呼吸抵抗 ③

表 2 曝露後呼吸抵抗が曝露前の 2 倍以上になったケース：実験①

	1	3	5	8	D 10	A 12	Y 15	17	19	22	24	26
A					+			+		+		
					+							
							+					
							+					
											+	
												+
B					++	DIED						
					+		+					
					+	+	+					
						+						
C					+	+						
					+	+						
					+							
								+		+		
D						+	+			+	+	
								+		+		
										+		

表 3 曝露中観察された異常呼吸の有無：実験①

	1	3	5	8	D 10	A 12	Y 15	17	19	22	24	26
A					++	+	+	+		+		
					++					+		
					++		+			+		
					++			+				
					++	+	+	+		+		+
B					+++	DIED						
					++		+					
					++	+	+					
					++	+	+					
					++	+	+					
C					++					+		
					++	+				+		
					++			+				
					++		+			+		
					++		+			+		+
D					++		+			+		
					++			+		+		
					++	+	+	+		+		
					++					+		

表 6 曝露後呼吸抵抗が曝露前の 2 倍以上になったケース：実験③

	D A Y												
	1	3	5	8	10	12	15	17	19		22	24	26
A				+			+						
						+		+					
B							+	+					
C													
							+						
D													

表 7 曝露中観察された異常呼吸の有無：実験③

	D A Y												
	1	3	5	8	10	12	15	17	19		22	24	26
A				+	+								
				+									
B						+							
C				+		+							
				+									
D					+	+							
				+	+								

(5) 異常呼吸観察結果

○A曝露中のモルモットの観察によって認められた異常呼吸の有無を表3、5、7に示した。表中の「+」は努力性呼吸、「++」はけいれん発作を示す。これによると、これらの頻度は(4)の呼吸抵抗の上昇頻度に較べ極めて高く、①においては、曝露10日目に全例においてけいれん発作を認めている。しかしながら、これらの発作は曝露開始10分から60分間程度の中に認められ、時間が経つにつれ正常に戻る傾向があった。②、③においてはそれぞれ20匹中15匹、14匹のモルモットに少なくとも1回の異常呼吸が認められたが、最初に認められるまでの日数は、③の5日目(1匹)8日目(7匹)と③が一番早かった。

(6) ヒスタミン吸入試験

PC200(呼吸抵抗が2倍となるヒスタミン濃度)を、①、②それぞれ10匹ずつにつき求めたが、両者に有意差はなかった。次に、①、②の計20匹を、呼吸抵抗変化2倍以上になったものと、そうでないものとに分けて、両者を比較したが、これも両者に差は認められなかった。

3. 考察

(1) O A 曝露条件設定

今回われわれは抗原物質として卵白アルブミンを用いたが、これは実際には吸入抗原となることは考えられない。しかしながら、これまでモルモット実験喘息モデル作成に広く用いられており、比較が容易のためこれを用いた。このように卵白アルブミンをモルモットに吸入させた実験は数多くあるものの、今回の実験は次の2点においてその曝露条件が大きく異なるものである。1) O A 曝露量をエロゾル濃度で規定したこと。2) 1日4時間連続曝露。すなわち1) に関して言えば、これまでの実験はほとんど全て、ネブライザーより直接エロゾルをモルモットの鼻先に曝露したものであり、粒径にはばらつきがあり、しかも今回の濃度とは比較にならないほどの高濃度であることが予想される(おそらく数100mg/m³)。2) について言えば、これまでの実験では一度の曝露では10分から長くても数10分というものが多かった。すなわち、これまでのものは感作させることを目的とした高濃度短時間曝露型であったが、今回の曝露では、より現実のアレルゲン曝露形態ということを考え、低濃度連続曝露による感作を試みた。

NO₂曝露によるO A 吸入曝露に対するアレルギー反応をみるためには、O A 吸入曝露によるアレルギー反応の大きさが、差を検出するために適度なものでなければならない。

(2) ①25mg/m³ O A 単独曝露と②5mg/m³ O A 単独曝露の比較

①25mg/m³曝露と②5mg/m³曝露を比較すると、曝露10日目に両者とも異常呼吸が観察されたことより、その感作成立に要した日数はほぼ同じと考えることができるだろう。但し、①では全例にけいれん発作が認められ、曝露後の呼吸抵抗も前値に比べ2倍以上となっていたものが8匹に認められたのに対し、②では20匹中12匹に努力性呼吸のみが認められ、呼吸抵抗測定では前値の2倍以上となったものはなく、感作成立の完全性、反応の大きさ、持続性は曝露濃度に依存していることがわかる。

(3) 経日変動

興味深い点として、1度感作が成立したと思われるモルモットが、それ以後、

アレルギー（O A）に曝露しても必ずしも反応を起こさないことである。①では連続して呼吸抵抗が2倍になったものは4匹、②ではわずか1匹である。この現象が脱感作の機構と関係するの否かは不明であるが、今後特異抗体の経日変動と併せて検討したい。

（4）経時変動

これまでのO A曝露実験では短時間チャレンジ後の呼吸抵抗を長時間にわたって測定したものはあるものの、今回のように曝露を継続して、開始4時間後に測定したものはなかった。短時間チャレンジでは、数分から10分後にいわゆる即時型反応(IAR)が起こり、長くても60分後には元に戻り、場合によっては、早くても4時間後、普通は6、7時間後位にいわゆる遅発型反応(LAR)が起こる場合があるとされている。今回の実験の観察結果でも、曝露開始数分から数10分の間に異常呼吸が観察され始め、2時間後にはほとんど正常にみえるまでに回復するというパターンが多くみられた。しかしながら、第22日目に多くのモルモットの4時間曝露後呼吸抵抗上昇が認められているように、曝露終了近くになって異常呼吸を示す例が観察により認められた。これがLARであるかどうかは、この結果だけでは断言できないが、最終曝露終了後に施行したBALF中の好酸球および好中球が著増している点からもその可能性は十分に考えられるだろう。

（5）ヒスタミン吸入試験

上述したように、感作が成立したと思われるモルモットとそうでないものの間に気道過敏性の差は認められなかった。このことは、これまでの知見、特にLARが起こっているとするならば、矛盾する点であるが、モルモットの個体間のばらつきが大きいことも予想されるために今回の結果だけでは何とも言えないだろう。

（6）2.5ppm N O₂曝露による影響

3週間曝露終了時までの結果では、N O₂曝露により、反応性の増大は誘発されることはなく、むしろ抑制される傾向がある。異常呼吸観察が、N O₂曝露群は非曝露群に較べて2日程早く認められているが、この事実は感作の成立がN O₂曝露によって早まったことを示すのかもしれない。

今後の展望と課題

これまでの研究により、アレルゲンの用量を規定しながらモルモットに感作を起こすことに成功し、さらに2.5ppmのNO₂を曝露した際のアレルギー反応への修飾を検討した。その結果、行った条件下においてはNO₂曝露によるアレルギー感作の増強を認めなかった。今後はアレルゲンの曝露濃度をさらに低くしてみるなど、条件設定を変更して検討する必要があるだろう。さらに、呼吸抵抗、特異抗体の経時変動を捉えることにより、感作の成立機序、抗体抗体産生機序への関わりにまで言及することができるかもしれない。

アレルギー疾患の増大の要因とされて挙げられているものは勿論NO₂だけではなく、その他の大気汚染物質、食事内容、精神的ストレス等、様々である。今回の実験を一つのモデルとして、さらに発展させて行けば、今後これらの要因についてそれぞれ検討していくことが可能であり、これを継続することはアレルギー疾患の機序解明の上でも非常に重要であると考えられる。

参考文献

Ito, K., Yamauchi, N. et al. (1985) Preparation of Antibodies to Guinea Pig IgE and Its Use for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of IgE Antibodies. *Int Archs Allergy appl Immunol* 77:438-444

Sakaguchi, M., Inoue, S. et al. (1989) Measurement of antigen-specific mouse IgE by a fluorometric reverse (IgE-capture) ELISA. *J of Immunological Methods* 116:181-187

Ishii, A., Ito, K. et al. (1990) Anti IgE-induced asthma in guinea pig; A new model for asthma. *Jpn J Allergol* 39:502-508

Riedel, F., Kramer, M. et al. (1988) Effects of SO₂ exposure on allergic sensitization in the guinea pig. *J of Allergy clin Immunol* 82(4):527-534

美濃口健治、小林英樹ら(1991)モルモットOvalbumin感作モデルにおける即時型気道反応後の気道反応性亢進のメカニズムについて *アレルギー* 40(2):164-167

須甲松伸、越野健ら(1990)マウスの呼吸抵抗測定装置を用いたメサコリンによる気道過敏性の検討. *アレルギー* 39(12):1629-1632

青木栄、塚越秀男ら(1991)能動感作モルモットを用いた抗原チャレンジ後の気道反応性亢進モデル作成に関する基礎的検討. *アレルギー* 40(5):538-543

伊藤幸治、石井彰ら(1986)Meadの装置を使用した抗IgE惹起モルモット喘息の観察とdisodium cromoglycateの効果検討への応用. *日胸疾会誌* 24(11):1240-6

藤沢隆夫、井口光正ら(1986)硫酸ミスト曝露がモルモット実験喘息惹起に及ぼす影響. *アレルギー* 35(2):137-144

寺師義典、湯川龍雄ら(1988)モルモット気道アレルギーにおける遅発型反応の出現とその発症因子に関する基礎的研究 I. *アレルギー* 37:980-991

鈴木修二、村中正治ら(1991)スギ花粉アレルギーと大気汚染. *アレルギーの臨床* 11(3):179-182

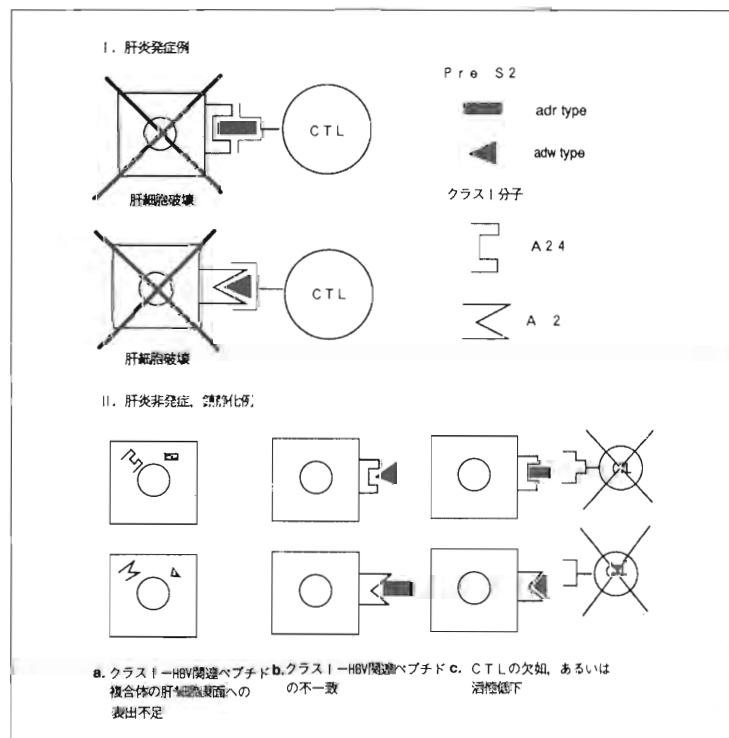


図-5 B型肝炎発症機序(仮説)