

■本研究の背景

アレルギー性鼻炎はI型アレルギー疾患の代表です。患者数は先進国を中心に増加の一途にあり、本邦では、国民の約40%がアレルギー性鼻炎に罹患しています。しかし、アレルギー性鼻炎の発症機序は未だ不明な点が多く根本的な治療法は確立していません。その理由の1つとして、ヒトの症状と病態を良く反映したアレルギー性鼻炎モデルマウスが確立されていないことが挙げられます。

さらに、従来からのアレルゲンに加え、大気汚染の原因物質とされている浮遊粒子状物質で、直径が2.5 μm 以下の微粒子状物質 (Particulate Matter, PM; PM_{2.5}) のアレルギー性鼻炎への影響が社会的に問題視されています。この環境微粒子は、工場での燃焼による煤塵などからなりますが、ディーゼル排気微粒子 (ディーゼルエンジンの排気ガスに含まれる微粒子) がPM_{2.5}の大部分を占めます。本邦では近年、中国大陸から高濃度のPM_{2.5}が飛来した時期と春のスギ花粉飛散時期が一致し、以前に比較してアレルギー性鼻炎患者数は急激に増加し、症状の悪化を訴える患者が増加しました。さらに、国内の自動車からのディーゼル排気微粒子が原因で、今日も喘息やアレルギー性鼻炎患者はその症状の悪化に悩まされています。しかし、ディーゼル排気微粒子(PM_{2.5})のアレルギー性鼻炎を悪化させるメカニズムは不明であり、それに対する治療・予防方法は全く確立していません。

この様な背景から、ディーゼル排気微粒子 (PM_{2.5}) によるアレルギー性鼻炎増悪メカニズムを明らかにし、その影響の評価法と治療・予防薬のスクリーニング法を開発することが急がれます。

■本研究の内容

私たちは花粉特異的アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて、ディーゼル排気微粒子のアレルギー性鼻炎に対する影響を検討し、以下のような結果を得ました。尚、ディーゼル排気微粒子は国立環境衛生研究所でディーゼルエンジンを燃焼し、排気ガスから精製調節した微粒子状物質 (直径0.4 μm のPM_{2.5}) を使用しました。

1. 正常マウスにブタクサ花粉と水酸化アルミニウムを day0 に、ブタクサ花粉のみを day7 に腹腔内投与し免疫した後、day14 から 4 日間ブタクサ花粉 (1.0mg/20 μL /回) 又はリン酸緩衝液 (PBS : 20 μL /回) を点鼻投与すると、ブタクサ花粉点鼻群はPBS 点鼻群に比較して、点鼻後 10 分間のくしゃみ回数が増進、24 時間後の鼻粘膜への好酸球浸潤、鼻粘膜上皮の多列化とムチン産生の増進を伴い、血清 RW 特異的 IgE 及び頸部リンパ節細胞からの Th2 サイトカイン産生を著明に増強するヒトのアレルギー性鼻炎に類似したモデルマウスを作製できます (*J Allergy Clin Immunol*, 2012)。
2. この鼻炎モデルマウスでは、上記の 1/10 量のブタクサ花粉 (0.1mg/20 μL /回) 点鼻ではくしゃみ回数を増強しません。しかし、ブタクサ花粉とディーゼル排気微粒子 (10 μg /20 μL /回) を 4 日間同時点鼻すると、点鼻後 2 日目から くしゃみ回数は著明に上昇しました。
3. ブタクサ花粉とディーゼル排気微粒子は同時に飛散するとは限りません。そこで、ブタクサ花粉で免疫したマウスにディーゼル排気微粒子を 4 日間点鼻した後にブタクサ花粉を点鼻しました。その結果、ブタクサ花粉の点鼻初日から 著しくくしゃみ回数が増加しました。一方、
4. ディーゼル排気微粒子を同時点鼻しても、Th2 免疫応答 (鼻粘膜好酸球数、血清 IgE 値と頸部リンパ節細胞からの Th2 サイトカイン産生) には影響しませんでした。そこで、
5. ディーゼル排気微粒子の鼻粘膜上皮細胞に対する影響を検討する目的で、ヒト鼻粘膜上皮細胞株にディーゼル排気微粒子 (0~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加・培養し、24 時間後の 1) 上皮細胞間接着構造 (タイトジャンクション) 蛋白質の免疫染色、2) 細胞膜の電気抵抗と 3) FITC 標識したデキストランの上皮細胞透

過性を測定しました。その結果、タイトジャンクションはディーゼル排気微粒子濃度依存的に破壊され、細胞膜の電気抵抗は著明に低下し、FITC 標識したデキストランの上皮細胞透過性は著しく亢進していました。さらに、

6. ディーゼル排気微粒子を4日間単独点鼻したアレルギー性鼻炎モデルマウスでは鼻粘膜上皮細胞のタイトジャンクションは完全に破壊されていました。一方、ブタクサ花粉点鼻はタイトジャンクションに何ら影響しませんでした。次に、
7. ディーゼル排気微粒子によるタイトジャンクションの破壊の程度と鼻炎症状（くしゃみ回数）が相関するかを検討する目的で、ブタクサ花粉で免疫したマウスに day8, day10, day12 と day14 にディーゼル排気微粒子を1回点鼻し、day16 にブタクサ花粉を点鼻しました。その結果、ディーゼル排気微粒子を点鼻してから2日目と4日目（day12 と day14）にブタクサ花粉を点鼻したマウスにのみ、くしゃみ回数は著明に上昇しました。これに相関して、ディーゼル排気微粒子点鼻後4日目までは鼻粘膜上皮細胞のタイトジャンクションは著しく破壊されていましたが、6日目には修復傾向が認められ、8日目には完全に元に修復していました。即ち、ディーゼル排気微粒子による鼻粘膜のバリア破壊の程度と鼻炎症状の重症度は相関しました。最後に、
8. ディーゼル排気微粒子による鼻粘膜のバリア破壊を予防する薬剤を検討しました。従来から、ディーゼル排気微粒子はその構成成分による酸化ストレスを介して気道上皮細胞のバリア機能を低下させることが知られています。そこで、ヒト鼻粘膜上皮細胞株にディーゼル排気微粒子と同時に抗酸化剤N-アセチルシステイン（体内の抗酸化物質であるグルタチオンの前駆物質であるアミノ酸）を添加しました。その結果、N-アセチルシステイン添加群ではタイトジャンクションは保護され、FITC 標識したデキストランの上皮細胞透過性は抑制されました。さらに、
9. ブタクサ花粉で免疫したマウスにブタクサ花粉を点鼻する2日前にディーゼル排気微粒子と同時にN-アセチルシステインを点鼻して前処置すると、マウス鼻粘膜上皮細胞のタイトジャンクションは完全に保護され、花粉を点鼻してもくしゃみ回数の増加は全く認められませんでした。

■本研究の成果

以上、本研究から次の3つの成果が得られました。

- 1) ディーゼル排気微粒子による鼻粘膜上皮細胞のバリア機能の破壊によって花粉アレルギーの上皮細胞への透過性が亢進する結果、それ単独ではなくくしゃみ症状を発症しない少量の花粉でも鼻炎症状を重症化させる可能性があることが明らかになりました。
- 2) おそらくディーゼル排気微粒子に含まれる炭化水素成分、有機物質や硫化塩などによる酸化ストレスによって鼻粘膜上皮細胞のタイトジャンクションは破壊され、抗酸化剤N-アセチルシステインはその作用を完全に予防できることが明らかになりました。
- 3) 本アレルギー性鼻炎モデルマウス (in vivo) または、上皮細胞株 (in vitro) を用いることでディーゼル排気微粒子に対する鼻粘膜上皮タイトジャンクションの破壊を指標として、これを抑制する新規アレルギー性鼻炎治療・予防薬のスクリーニング法を確立することが可能となりました。

ディーゼル排気微粒子(PM_{2.5})による健康被害はアレルギー性鼻炎に留まらず呼吸器疾患（喘息や慢性閉塞性肺疾患など）、皮膚疾患（アトピー性皮膚炎など）、神経疾患や循環器疾患など多岐にわたることが知られています。そのため、上記スクリーニング法によって明らかにされるディーゼル排気微粒子に対する治療・予防薬は、これら疾患に対しても効果が期待されます。