

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590549

研究課題名（和文） 革新的アレルギー投与技術による高効率な芳香族炭化水素類の気管支喘息誘発能力の解析

研究課題名（英文） Development of new method for allergen sensitization to mice lung.

研究代表者

弘田 量二 (HIROTA RYOJI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：20448385

研究成果の概要（和文）：アレルギー性気管支喘息をマウスに発症させる際に、肺の中に10回以上反復してアレルギーを注入する従来の方法に代わりストレスを軽減させる、アレルギーの1回投与により気管支喘息を発症させる技術の開発を試みた。従来法に比べて症状は弱いながらも、今回の方法で喘息マウスを作ることに成功した。しかしながら、発症のばらつきが大きいことが課題として残った。

研究成果の概要（英文）：We tried to develop the new method for making asthmatic mice which could be done a single instillation of allergen. This method can reduce much stress during instillation of allergen to mice. While mice were shown the asthmatic symptoms and histological changes, these responses were weak. Our method needs to update for this purpose.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：喘息マウスモデル、ダニ抗原、芳香族炭化水素、ストレスフリー、ディーゼル排気ガス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、アレルギーであるダニ抗原とアレルギー促進物質であるディーゼル排気ガス抽出物（以下 DEP）の経皮的・複数回曝露することにより確立される気管支喘息モデルマウスを作製し、DEP はアセチルコリン気道過敏性促進効果をもつこと、肺胞洗浄液中での T 細胞ヘルパー2 型サイトカイン

(Th2)を増加させること、肺への好酸球浸潤を増大させること、アレルギー特異的 IgG1 を上昇させることを明らかにした。また、研究代表者らは動物試験に先立つ in vitro 試験において、DEP は気道炎症部位へ浸潤した好酸球に対して、マクロファージや好中球浸潤を促す役割があることを明らかにした。さらに研究代表者らは、大気中の DEP を除去す

ることにより気管支喘息の発症を予防する特殊フィルターの試作にも成功している。

DEP は芳香族炭化水素類(PAHs)や金属類の化学物質部分と粒子部分から構成され、前者に強いTh2 サイトカイン誘発能力があることが別の研究者らによって明らかにされている。また、DEP 構成要素のひとつであるヒドロキノンやベンゾ(a)ピレンには、マウス気道の気道過敏性を増強させることも別な研究者により明らかにされている。このように DEP および構成要素には、気管支喘息誘発能力があることがわかってきた。

これら DEP 構成要素の喘息誘発能力を理解していく上で、それぞれの要素を単独でマウスに試験していくことは必要不可欠である。現状の投与システムでは、別々のマウスにそれぞれの要素を経気道的に頻回投与していくため、実験者投与手技のばらつき、マウス個体間の投与量のばらつき、マウス拘束時のストレスなど、試験データの質を下げる多くの要因が存在する。

2. 研究の目的

そこで研究代表者らは高度な実験手技を必要とする経気道投与技術について、確実に簡便に行えるよう工夫を重ね、実験者への訓練システムの充実にも尽力してきた。しかしながら一般の研究施設の現状では高度な技術の伝承や訓練に人を割く時間はない。また、投与技術を習得しても週2回定時の投与(生物の体内時計によってホルモン分泌が24時間の周期で制御されており、投与時刻は厳密に守る必要がある)を厳密に実行すること、投与ごとの拘束で動物に多大なストレスを与えること(ストレスという別な要因が実験結果に加わっているはずだが、通常の実験者はその影響を無視している)、というデータの精度の低下を招く要因がいまだに実験を妨げる問題点として存在した。さらに、従来の研究では免疫学的測定法(ELISA)のようなタンパクの測定に関しては高感度化がはかられてきたが、実験動物から得られるデータのばらつきを抑えることにより感度を向上させて新しい知見を得ようという試みはなされてこなかった(ベースラインのばらつきが小さいほど実験で取得したデータとの差違が明確になり、感度の上昇につながる)。従って、本研究の課題は、従来の経気道的投与に代わる高精度かつストレスフリーな投与方法を開発すること、DEP の各要素の喘息誘発能力を精度良く解析することである。

アレルギー促進物質徐放インプラント技術の完成は、**高い精度の投与で、しかも高感度**に PAHs の各要素や金属類について、マウスにおける気管支喘息誘発能力の有無を明らかにすることができる。また、気管支喘息のみならず、すべてのアレルギー性疾患モデル

の作製、高感度が要求される低濃度長期間曝露試験に応用可能な革新的な技術である。

本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義としては、インプラント化したアレルギー物質の1回投与による気管支喘息モデルを作製することにより、投与時の拘束による多大なストレスから解放し、高精度な曝露量コントロールが可能となり、試験データのばらつきを抑える。しかもアレルギー物質を含まない投与(Vehicle)群のデータも精度が高くなるので、両者の有意差を出しやすく動物試験の高感度化が可能となる。これは特に DEP を構成する PAHs や金属類の各要素の気管支喘息誘発能力を要素間で比較するために非常に有効な手段となる。

ところで、PAHs 各要素や金属類に関しては、疫学研究を除くと上述のヒドロキノン、ベンゾ(a)ピレンのマウス気道過敏性向上の報告があるのみで、網羅的かつ体系的に気管支喘息促進効果能力を明らかにした報告はいまだない。本研究が実現した際には、精度良くかつ1回のみアレルギー物質投与(省力化)にて試験動物を作製できるため、再現性の高い、しかも感度のよい動物実験が可能になり実験効率が非常によい。したがって本研究の手法が確立されれば、3年間で50種類程度のPAHs・金属類の気管支喘息促進効果能力を明らかにすることが可能になる。

このことは、従来投与方法では毒性が明瞭でない物質に対しても、動物試験の高感度化によって測定可能となるため、新たな毒性評価指針を作成できることが期待される。

さらに、本研究者がインプラントを投与したアレルギーモデルマウスを他の研究者・研究機関に分与し、その分与先で容易に発症させることが可能になるため、アレルギー研究の推進には大きな武器となる。

本研究では、平成22年度前期には、マウスへ**1回のみ投与により気管支喘息を発症させる**ためのアレルギー物質徐放インプラントを作製する。研究代表者らが行ってきた気管支喘息作製法では、週2回投与、投与期間30日を基本にしているため、マウス肺投与後1ヶ月程度で溶解する生分解性ポリマーの採用で課題を解決する。また、ダニ抗原-DEP(以下アレルギー物質)インプラントのマウスでの投与実験を行い投与条件の最適化を行う。後期には芳香族炭化水素(PAHs)10種類について濃度依存的な気管支喘息誘発能力の解明を行っていく。平成23年度にはPAHs30種類、平成24年度には金属類10種類についてマウスへの気管支喘息誘発能力を解明する。

したがって、完成した投与技術については、学会発表や論文発表を行うとともに商業的な価値もあるので特許申請も行いたい。

3. 研究の方法

はじめに、ゼラチンハイドロゲルベースで生体吸収性が高く、多孔性に優れた生分解性ポリマー(以下 Med)をダニ抗原徐放剤として使い、マウス(品種 BALB/c) オス 6 週令に対して、

- (1) ダニ抗原 25ug + Med
- (2) ダニ抗原 50ug + Med
- (3) ダニ抗原 50ug + 水酸化アルミニウム + Med
- (4) ダニ抗原 100ug + 水酸化アルミニウム + Med
- (5) ダニ + 水酸化アルミニウム
- (6) ダニ抗原 25ug, -DEP + Med
- (7) ダニ抗原 50ug -DEP + Med
- (8) ダニ抗原 50ug -DEP + 水酸化アルミニウム + Med
- (9) ダニ抗原 100ug -DEP + 水酸化アルミニウム + Med
- (10) ダニ -DEP + 水酸化アルミニウム
- (11) 水酸化アルミニウム

の組み合わせで、1 回抗原の投与によりマウス気管支喘息発症を試みた。

コントロール実験として、従来のダニ抗原反復投与(週二回投与、投与期間 30 日)の組み合わせで行った。アレルギーの反応阻害物質として、リモネンおよびプロポリス投与群も作成した。

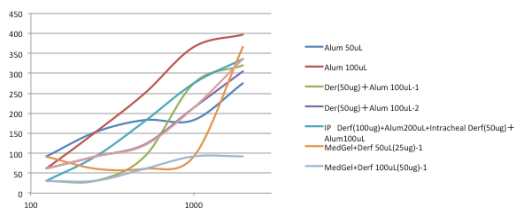
投与後 30 日でマウスの気道抵抗性の測定(喘息症状)、肺胞洗浄液中のサイトカインの種類と濃度や好中球・好酸球などの細胞数、および病理標本の形態的变化を確認した。

4. 研究成果

上記の組み合わせで、1 回抗原の投与によりマウス気管支喘息発症を試みた。

気道抵抗測定結果(実験データの一部を抜粋して示した)では、従来法気管支喘息マウスが最もアセチルコリンへ過敏に反応した。ダニ抗原 25ug + Med の場合において、従来法の約 80% の気道抵抗性が認められ、1 回抗原の投与によりマウス気管支喘息が発症したものと考えられた。肺への水酸化アルミニウムの直接投与では、抗原なしの状況でも気道抵抗性が亢進することから、水酸化アルミニウムの添加は好ましくないことがわかった。

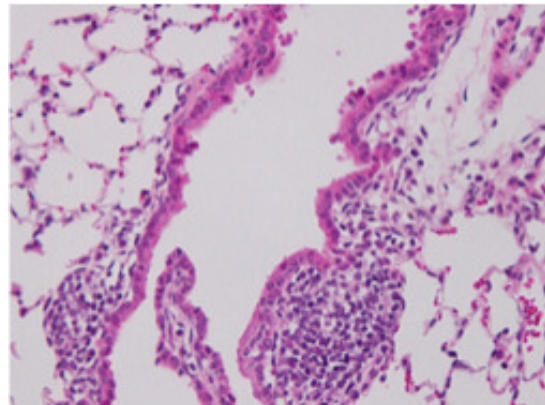
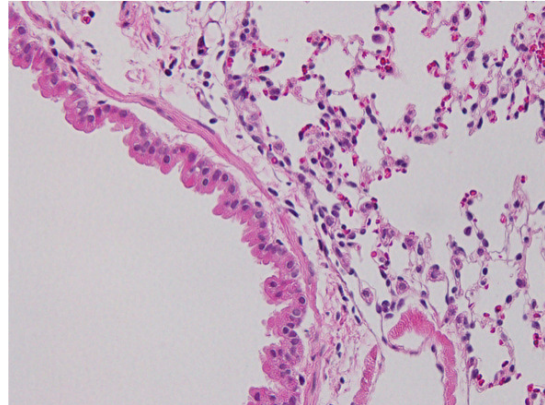
気道抵抗性



肺胞洗浄液中の炎症細胞については、アレルギーの指標である好酸球は、標本中には観察されなかった(データ省略)。

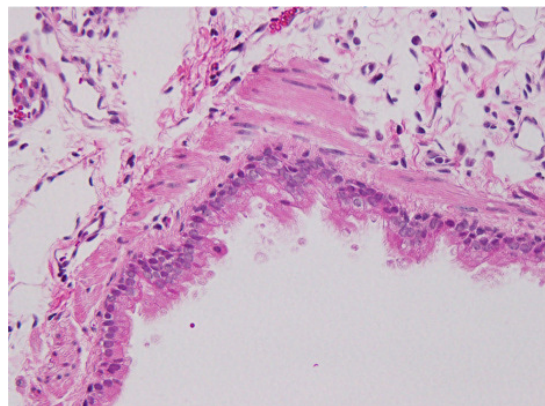
続いて下記に、気道抵抗性を示したマウス肺の病理標本を示す。

(1) ダニ抗原 25ug + Med
H E 染色

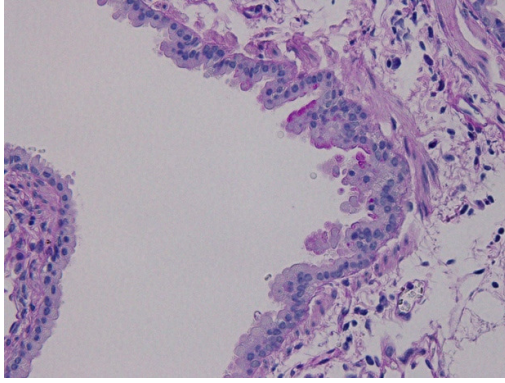


肺胞基底膜下に好酸球の浸潤を認めた。

(2) ダニ抗原 50ug + Med
H E 染色



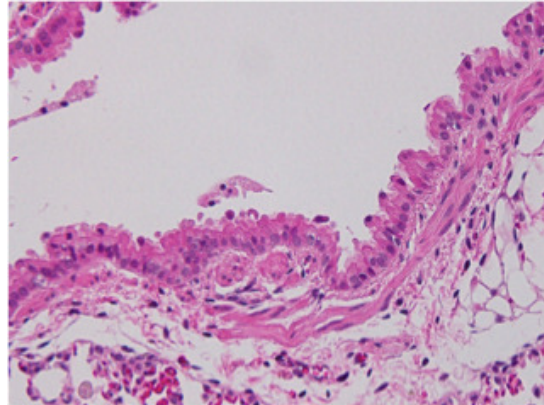
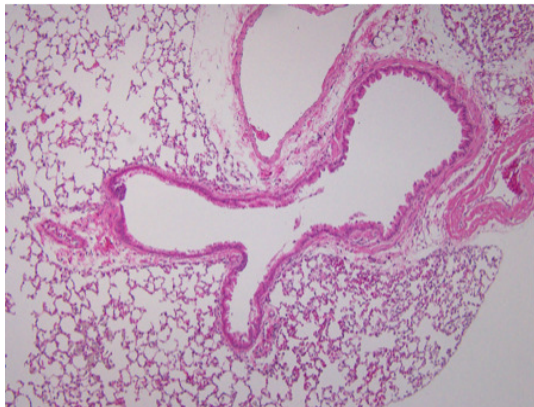
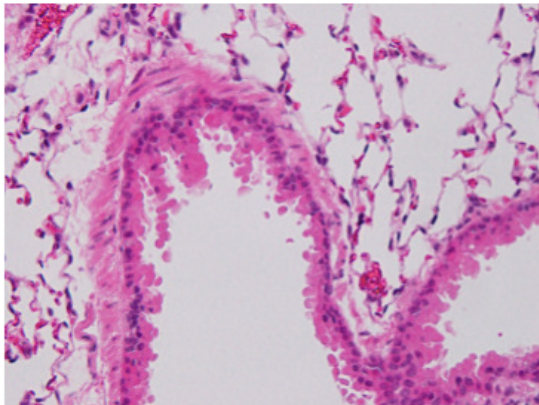
PAS染色



HE染色では多数の好酸球浸潤を認め、PAS染色では、肺胞表面にわずかながら酸性ムコ多糖の蓄積を認めた。

(3) Alumのみ

Alumのみ投与においても肺の炎症は強く出る。従って、Alumとの併用投与はできないと考えられた。



以上の結果は、今回の抗原投与方法を用いることで、わずか1回抗原の投与により、マウスに気管支喘息を発症させることができた、と考えられた。しかしながら、気道抵抗の程度に大きなばらつきが認められたこと、病理標本場の変化が、従来法と比較して弱いこと、が欠点としてあげられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① HIROTA R, NAKAMURA H, Bhatti SA, et al. (9人中1番目) Limonene Inhalation Reduces Allergic Airway Inflammation in *Dermatophagoides farinae*-treated Mice. *Inhalation toxicology*, 2012, 373-381 (査読有り)
- ② HIROTA R, NGATU NR, NAKAMURA H, SUGANUMA N, Propolis Inhalation Reduces Allergic Airway Inflammation in *Dermatophagoides farinae*-treated Mice., *J Prev. Med.*, 2012, 95-102. (査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弘田 量二 (HIROTA RYOJI)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：20448385

(2) 研究分担者

菅沼成文 (SUGANUMA NARUFUMI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：50313747
栄徳 勝光 (EITOKU MASAMITSU)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：50552733