

## 実験技術

Whole Body Plethysmograph 法を用いた  
マウスアレルギー性鼻炎モデルにおける抗原特異的即時相、  
遅発相および抗原非特異的鼻過敏性反応の測定宮原 聡子<sup>1)</sup>, 宮原 信明<sup>2)</sup>, 松原 茂樹<sup>3)</sup>

**要約:** アレルギー性鼻炎の動物モデルにおいて、遺伝的背景が明らかなマウスの利用、特に近年の遺伝子改変マウスの利用により、詳しい病態解析が可能になった。しかし、これまでのマウスのアレルギー性鼻炎の評価には、抗原による誘発後 30 分以内のくしゃみおよび鼻かき回数が常用されており、臨床上散見される遅発相反応など長時間に亘る客観的症状観察、あるいは鼻閉の評価は困難であった。そこで我々は、Whole Body Plethysmograph 法における呼吸数の変化を幾つかのパラメータと併せて無麻酔下で測定することにより、鼻腔抵抗上昇を反映した新規アレルギー性鼻炎モデルを作製した。卵白アルブミン感作マウスに無麻酔下で経鼻抗原チャレンジすることにより、吸気および呼気共に延長する上気道閉鎖のパターンを示し、呼吸数が有意に減少した。この抗原によって誘発される呼吸数減少は、麻酔下で測定したマウスの鼻腔抵抗上昇値と良好な相関性を示すことから、本実験モデルにおける呼吸数減少は、間接的に鼻閉を反映することが明らかとなった。感作マウスに抗原チャレンジを繰り返した場合、抗原暴露回数に依存した非特異的過敏性反応、抗原特異的即時相および遅発相反応が認められた。さらに、本モデルにおいて種々遺伝子改変マウスを用いたところ、鼻過敏性反応の成立には抗原特異的 IgE および肥満細胞が、遅発相反応にはインターロイキン-13 の寄与が必須であることが明らかとなった。以上、我々が作製したマウスアレルギー性鼻炎モデルは、長期間に亘る非侵襲的呼吸機能測定が可能であり、鼻反応を誘発した際の呼吸機能変化に対する検出感度が優れていた。そして、本モデルで測定する呼吸数変化はアレルギー性鼻炎患者の鼻閉を反映しており、詳細な病態解析ならびにアレルギー性鼻炎治療薬の薬効評価に有用であると思われる。

## はじめに

アレルギー性鼻炎は、くしゃみ、鼻汁分泌亢進および鼻閉を主症状とするアレルギー疾患であり、近年患者が急増し、現在では、我が国の人口の約 40% が罹患していると推定されている(1)。抗原の繰り返し暴露によって重症化した患者に抗原チャレンジを行うと、3 主徴を伴う即時相反応だけでなく、抗原チャレンジ数時間後に鼻閉を主症状とする遅発相反応が誘起されることがある(2)。この遅発相反応は、持続性の粘膜腫脹が原因であるが、すべてのアレルギー性鼻炎患者に発現するわけではない。また、スギ花粉などによる季節性アレルギー性鼻炎患者の主症状に比べて、ダニなどによる通年性アレルギー性鼻炎の患者は、くしゃみおよび鼻汁よりも慢性の鼻閉を主症状として訴えることが多い。一方、3 主徴に加えて、抗原の繰り返し暴露後に、抗原以外の非特異的刺激に対して鋭敏に反応し、即時性の 3 主徴のいずれかを呈す鼻過敏性を惹起することがある。すなわち、これらの事実は抗原暴露とアレルギー性鼻炎発症までの病態発現メカニズムが極めて複雑であることを示唆しており、アレルギー性鼻炎の成立機序を「抗原と細胞表面上 IgE の結合によって肥満細胞から遊離されるケミカルメディエーターが誘発する即時性の I 型アレルギー」と一括できるほど単純ではないようである。

アレルギー性鼻炎の病態メカニズム解析、および治療薬の薬効評価において、抗原感作と抗原暴露が一定の条件で設定できる動物モデルは大変有用であり、現在までにラットなどのげっ歯類やイヌなどが用いられてきた。特にマウスは遺伝的背景が明瞭であり、さらに近年の遺伝子技術から遺伝子改変マウスが生産され、分子レベルの病態解析が可能になった。加えて、マウスは小型動物であるため、薬効評価に使用する治療薬

キーワード: Whole Body Plethysmography, マウス, アレルギー性鼻炎, 即時相反応, 遅発相反応

<sup>1)</sup> 公立学校共済組合中国中央病院 (〒720-0001 福山市御幸町大字上岩成 148-13) E-mail: miyahara@md.okayama-u.ac.jp

<sup>2)</sup> 岡山大学病院 呼吸器・アレルギー内科 (〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2 丁目 5-1)

<sup>3)</sup> 田辺三菱製薬株式会社 薬理第一研究所 第一部 (〒227-0033 横浜市青葉区鴨志田町 1000)

E-mail: matsubara.shigeki@mu.mt-pharma.co.jp 原稿受領日: 2010 年 11 月 29 日, 依頼原稿

Title: Measurement of early-phase, late-phase, and nonspecific nasal responses in allergic rhinitis mouse by whole body plethysmography. Author: Satoko Miyahara, Nobuaki Miyahara, Shigeki Matsubara

あるいは化合物の必要量が少量で済むことも有用である理由の1つである。しかし、マウスを用いたこれまでのアレルギー性鼻炎モデルにおける評価指標のほとんどは、抗原点鼻による誘発30分以内のくしゃみおよび鼻かき回数であり、鼻閉を反映した指標は見出されていなかった。また、くしゃみおよび鼻かき回数については、その定量が測定者の目視計測に頼る部分が多く、定量性ならびに実験効率の点で課題があった。一方、アレルギー性鼻炎患者の病態生理学的特徴の1つに二相性の鼻閉反応があり、遅発相反応を評価することによってアレルギー性鼻炎の病態を解析することが重要であった。モルモットの場合、麻酔下あるいは覚醒下での鼻腔抵抗測定により遅発相反応を検出した報告(3, 4)があるが、マウスは鼻腔容積が小さく、鼻閉の測定は困難であった。マウスにおける簡便な鼻閉の評価方法が開発されれば、各種遺伝子改変マウスを用いた二相性反応の解析ならびに鼻過敏性反応の研究が可能になり、詳細な病態解明や治療薬開発につながると期待された。

以上のような背景により、我々は鼻閉による呼吸機能変化を指標とするマウスアレルギー性鼻炎モデルの作製を行った。本モデルならびにその利用によって明らかとなった幾つかの知見について紹介する。

## 1. マウスアレルギー性鼻炎モデルの作製

### 1) 感作と抗原チャレンジ

マウスのアレルゲンに対する感作は、マウス喘息モデルで用いられている方法に準じて行った。雌性BALB/cマウスに20  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ の卵白アルブミン(ovalbumin: OVA)液と水酸化アルミニウムゲルを混合して作成した懸濁液を初回1次免疫日(0日目)と14日後の2回、腹腔内投与することにより感作した。抗原チャレンジは28日目から連日、3, 5および12日間、1日1回、リン酸緩衝液(PBS)で希釈したOVA液500  $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}/\text{mouse}$ を、無麻酔下でマウス前鼻孔に少量ずつ滴下して点鼻投与することにより行った。最終抗原チャレンジから24時間後にマウスの鼻腔に同量のOVA液またはブタクサ花粉抗原液(500  $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}/\text{mouse}$ )を投与し、Whole Body Plethysmograph(WBP)法にて呼吸数の変化を観察した。

### 2) WBP法による鼻閉測定手順

実験にはBuxco Electronics社製の無拘束呼吸機能測定装置ならびに本機器に接続するマウス用水平型準拘束タイプのチャンバーを使用した。マウスの呼吸を安定させるために、実験の30分以上前からマウスをチャンバーに収容することによって測定環境に馴化させた。

即時相反応を見る場合は、鼻反応誘発前に3分間ずつ計3回呼吸数を測定し、その最低値をベースライン

の呼吸数とした。鼻反応誘発のためにマウスをチャンバーから取り出した後、無麻酔下で誘発液を点鼻してチャンバーに戻し、点鼻後4, 10, 15, 20, 25, 30および60分後に各3分間呼吸数を測定し、ベースラインの呼吸数からの割合を計算した。遅発相反応を見る場合は、最終点鼻から24時間後のベースラインの呼吸数減少を遅発相反応とした。

呼吸数は、マウスの反転などの体動によって容易に上昇する。測定中可及的安定な静止時呼吸数を得るために、平均呼吸数を6秒ごと3分間記録し、最少呼吸数を除いた少ない方から5回分(30秒間)の呼吸数の平均値を、その測定時の呼吸数とした。

### 3) 下気道の影響が排除されているか?

鼻呼吸しか行わないマウスにおいて鼻腔抵抗の変化は、呼吸変化に直結し、呼吸パターンの変化が生じるのは容易に推測される。しかし、WBP法は、主に喘息モデルにおける下気道の過敏性を検出するために使われてきたため、上気道の閉塞を反映するアレルギー性鼻炎モデルにおける抗原チャレンジ後の呼吸数が、下気道における気道抵抗の影響を受けている可能性を排除しなければならなかった。また、マウス喘息モデルにおいては、マウスを麻酔下で点鼻し、誤嚥によって抗原液を気道に流入させて感作する方法が取られることがある。一方、Saitoらは、無麻酔下でトリパンブルー液を点鼻投与した場合、投与液が下気道へ流入しないことを確認し、次に同様の方法で感作マウスに抗原液点鼻投与を行っても下気道の炎症反応は生じないことを報告した(5)。我々も、無麻酔下で感作マウスに抗原液の点鼻を行い、吸入メサコリンに対する下気道の過敏性および炎症細胞浸潤が認められないことを確認した(6)。すなわち、マウスを麻酔した場合は点鼻液が下気道に到達するが、覚醒下では20  $\mu\text{L}$ の点鼻液は下気道に流入しないことが明らかとなった。加えて、WBPによって鼻反応誘発後の呼吸パラメータを測定し、吸気および呼気時間が延長する上気道閉塞時特有のパターンを示した(6)。一方、下気道閉塞時に見られる呼気時間延長、enhanced pause (Penh)の上昇は認めず、我々のアレルギー性鼻炎モデルでは下気道の影響は無いと考えた(6)。

### 4) WBP法における呼吸数減少と鼻腔抵抗値上昇との相関

上気道および下気道に関わらず、気道抵抗が上昇し、呼吸困難を生じる場合、マウスの呼吸間隔は延長する。我々は、呼吸数減少が、鼻閉(鼻腔抵抗の上昇)によって生じていることを証明するために、抗原チャレンジ後の鼻腔抵抗を直接測定することにした。2000年代前半、閉鎖または半閉鎖空間にピストン運動状の気体を流し、その波動の変化を分析して管内の抵抗を測定する機能を有する呼吸機能測定装置flexiVent

(Scireq) が、新しく開発された。これまでの気道内圧測定法では、鼻腔を密閉空間にする必要があったが、この機器では、前鼻孔または上咽頭孔のどちらかを閉鎖するだけで気道抵抗値の測定が可能である。麻酔下でマウスの気管を切開し、下気道方向を別の人工呼吸器につないで呼吸を確保した後、上咽頭孔にピストン状の気流が出る外筒付きの挿管チューブを挿入した(6)。抗原チャレンジした感作マウスの鼻腔抵抗は、誘発後10分以内に有意に上昇した。また、繰り返し抗原チャレンジを受け、24時間後の呼吸数減少を示したマウスの呼吸数と鼻腔抵抗値の上昇は有意に相関し(6)、この実験モデルにおける呼吸数減少は、間接的に鼻閉を反映することが明らかとなった。

##### 5) WBP 法による抗原誘発即時相、遅発相および非特異的過敏性の検出

OVA 抗原感作、および3回抗原チャレンジしたマウス(感作/惹起)は、抗原チャレンジのみのマウス(非感作/惹起)ならびに無処置マウス(非感作/非惹起)に比べ、OVA点鼻後著明な呼吸数減少を示した(図1)。その減少は、4分後に最大になり、その後徐々に回復していった(図1)。感作後抗原チャレンジを繰り返すと、最終抗原チャレンジから24時間後の呼吸数は、抗原チャレンジ4回以後減少し続け、6回目以降で初回抗原チャレンジ前の呼吸数に比べて有意な減少を示した(図2)。すなわち、抗原を6回以上チャレンジすることにより、遅発相反応を反映した鼻閉が認められた。OVA感作マウスに3、5および12回抗原チャレンジした翌日に、OVA液、あるいは抗原ではないブタクサ花粉液による鼻の反応性を比較すると、3回抗原チャレンジ後は、抗原液および非抗原液間の反応に差がなく、タンパク液の浸入に対する即時的過敏性反応が主体であることが示唆された(図3A)(7)。抗原チャレンジ回数を増やしていくと、抗原によって誘発された反応は、非特異反応から乖離し、5回の抗原チャレンジ後では、4分以内に出現した鼻閉が、一度改善するものの60分後に再び増悪し24時間後も有意に認められた(図3B)。抗原チャレンジを長期間繰り返す(12回)と非特異的過敏性反応は有意に減弱し(図3C)、抗原によって誘発された反応は、鼻閉出現後改善することなく60分まで増悪したが、24時間後には抗原チャレンジ前の呼吸数まで回復した(図3A, B, C)。

以上から感作マウスに対する抗原暴露初期は、即時性の過敏性反応が主体であり、チャレンジの際に用いる点鼻液が抗原であるなしに関わらず、同様の鼻反応を生じることが明らかとなった。しかしながら、抗原暴露をさらに繰り返し行うと抗原特異的な即時相、遅発相の鼻閉が出現し、さらに長期になると持続的な鼻閉が主体となることが明らかとなった。抗原チャレンジ回数が3回の場合、即時相における非特異的過敏性

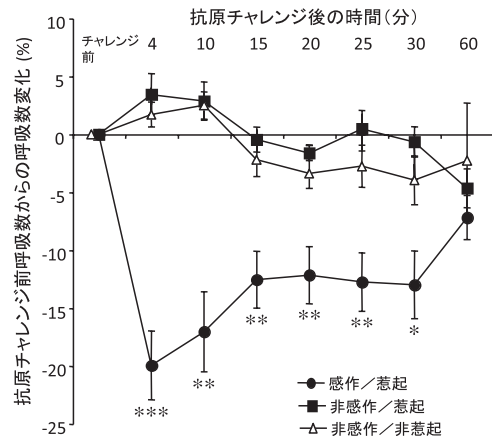


図1 抗原感作およびチャレンジ(惹起)によって生じる呼吸数の低下  
データは、抗原チャレンジ前呼吸数からのパーセント値で表示し、平均±標準誤差(n=8)を示す。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. 非感作/惹起。(文献6より改変)

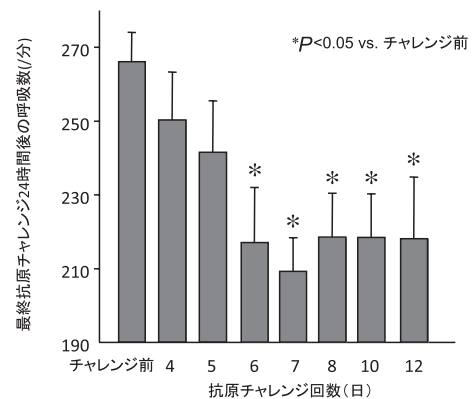


図2 感作マウスに抗原チャレンジを繰り返した時の最終抗原チャレンジから24時間後の呼吸数減少  
データは、平均±標準誤差(n=8)を示す。(文献6より改変)

反応は、抗原感作をしなければ認められないこと、ならびに3回以上の抗原チャレンジが必須であることから、3回の抗原チャレンジ期間中、何らかの抗原特異的免疫応答が関与していると考えられる。この過敏性反応は、抗原チャレンジを中止した後も4日間持続したが、1週間後には消失した(未発表データ)。

## 2. 本モデルによって明らかになった病態メカニズムに関する知見

### 1) マウスアレルギー性鼻炎における鼻腔抵抗上昇へのIgEおよび肥満細胞の関与

近年、様々な遺伝子を欠損させたマウスが作製され、標的遺伝子の生理学的意義の解明や種々疾患における病態解析に利用されている。アレルギー反応においてはIgEと肥満細胞上に発現するその受容体の結合によって、再度生体内に侵入した抗原に対する抗原抗体反

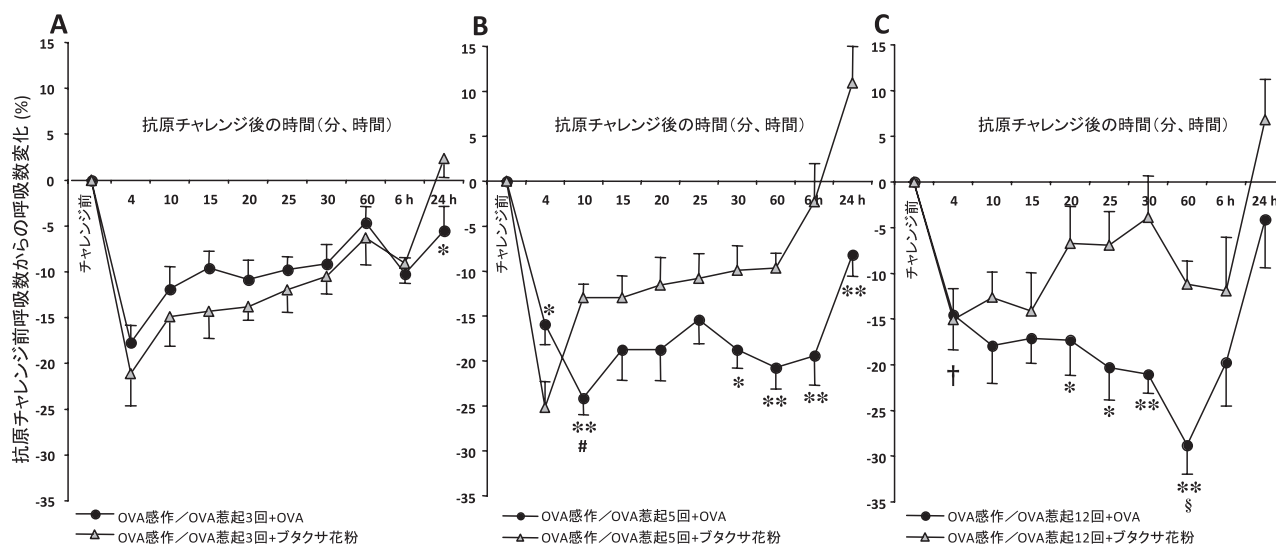


図3 抗原暴露回数に依存した抗原特異的即時相, 反応の出現

卵白アルブミン (OVA) 感作マウスに抗原チャレンジを3 (A), 5 (B), 12 (C) 回繰り返す, その24時間後に OVA (抗原) 液とバクサ花粉 (非抗原) 液によって誘発された鼻反応を比較した。データは, 抗原チャレンジ前呼吸数からのパーセント値で表示し, 平均±標準誤差 (n=8-12) を示す。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs. 各図表におけるバクサ花粉暴露群; # $P<0.05$  vs. OVA 感作/OVA 惹起3回+OVA (10分後); † $P<0.05$  vs. OVA 感作/OVA 惹起5回+バクサ花粉 (4分後); § $P<0.05$  vs. OVA 感作/OVA 惹起12回+OVA (10分後)。 (文献7より改変)

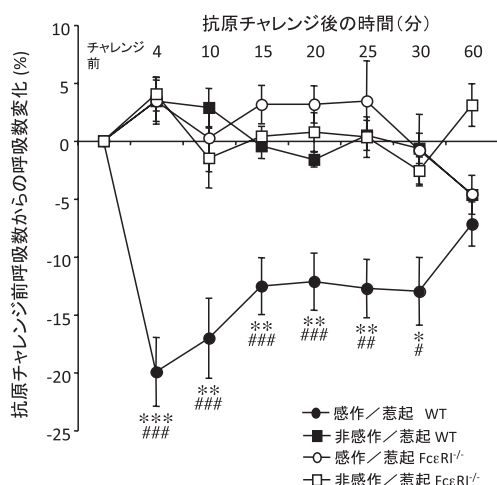


図4  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ マウスにおける即時的過敏性反応の消失

データは, 抗原チャレンジ前呼吸数からのパーセント値で表示し, 平均±標準誤差 (n=8) を示す。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. 非感作/惹起 WT; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  vs. 感作/惹起  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ 。 (文献6より改変)

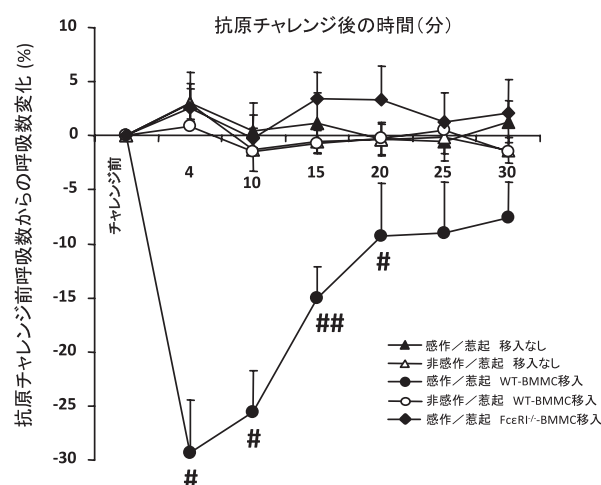


図5  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ マウスにおける骨髓由来肥満細胞 (BMMC) 移入後の即時的過敏性反応

データは, 抗原チャレンジ前呼吸数からのパーセント値で表示し, 平均±標準誤差 (n=8) を示す。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs. 感作/惹起  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ -BMMC 移入。 (文献7より改変)

応が重要であると考えられている。そこで, 我々が作製したアレルギー性鼻炎モデルにおいて高親和性 IgE 受容体欠損マウス ( $Fc\epsilon RI^{-/-}$ マウス) に感作および抗原チャレンジ (感作/惹起  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ ) を行ったところ, 誘発後の即時的過敏性反応は生じなかった (図4)。この  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ マウスに野生型 (WT) マウスから培養した骨髓由来肥満細胞 (BMMC) を移入した後, 感作および抗原チャレンジ (感作/惹起 WT-BMMC 移入) を行うと, 即時的過敏性反応が生じるようになる

が (図5),  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ マウスの BMMC を移入して感作および抗原チャレンジ (感作/惹起  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ -BMMC 移入) を行っても即時的過敏性反応は認められなかった。遅発相反応は, 感作および抗原チャレンジした  $Fc\epsilon RI^{-/-}$ マウスで有意に減弱していたが, WT マウスの BMMC を移入してもこの減弱には影響を及ぼさなかった (7)。以上から, アレルギー性鼻炎の即時的過敏性反応の成立には, 抗原特異性を有する IgE および肥満細胞が重要な役割を果たしていることがわかった。

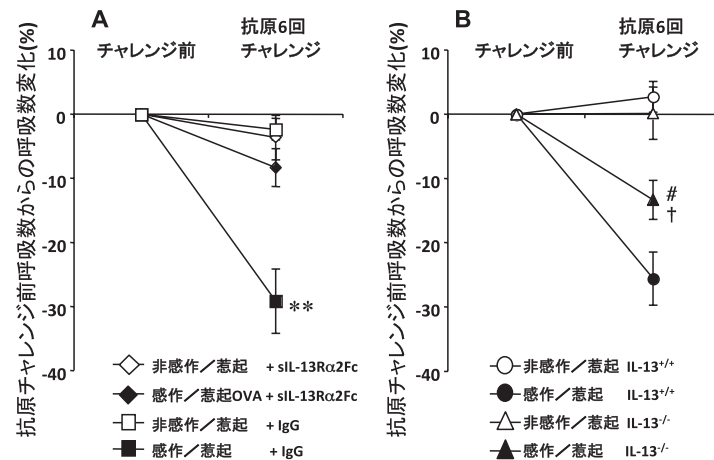


図6 抗原特異的遅発相反応におけるIL-13の関与

データは、抗原チャレンジ前呼吸数からのパーセント値で表示し、平均±標準誤差 (n=6-8) を示す。 \*\* $P<0.01$  vs. 非感作/惹起+IgG； \* $P<0.05$  vs. 非感作/惹起 IL-13<sup>-/-</sup>； † $P<0.05$  vs. 感作/惹起 IL-13<sup>+/+</sup>。(文献10より改変)

一方、遅発相反応にもIgEは重要であるが、肥満細胞以外にFcεRIを有する他の細胞の関与が疑われた。

## 2) マウスアレルギー性鼻炎におけるインターロイキン(IL)-13の関与

これまでにIL-13は、アレルギー性炎症、特に気管支喘息の病態において重要な役割を担っていると報告されてきた(8,9)。我々は、アレルギー性鼻炎におけるIL-13の関与について把握するために、前述のマウスアレルギー性鼻炎モデルにおけるIL-13受容体拮抗薬である可溶性IL-13受容体α2-Fc (sIL-13Rα2-Fc) およびIL-13欠損 (IL-13<sup>-/-</sup>) マウスを使用して検討した(10)。6日間の抗原チャレンジを行うと、最終抗原チャレンジから24時間後の呼吸数が減少するが(図2)、各抗原チャレンジの1時間前にsIL-13Rα2-Fcを投与されたマウスでは、呼吸数減少が有意に抑制された(図6A)。また、IL-13<sup>-/-</sup>マウスでは最終抗原チャレンジ24時間後の呼吸数減少の有意な減弱が認められた(図6B)。すなわち、これらの結果から、IL-13はアレルギー性鼻炎における遅発相反応に寄与していることが判明した。

## 3. WBP法およびマウスアレルギー性鼻炎モデルの有用性

前述のごとく、我々はflexiVentを用いてマウスの鼻腔抵抗を麻酔下で直接測定する方法も確立したが、この方法では麻酔や外科的侵襲の影響を受ける可能性があり、実験効率の点でも課題がある。WBP法の長所は、非侵襲的手法のため、長期間の測定継続が可能な点である。マウスにおいては、これまで困難であった長期間の評価が可能となったことにより、二相性鼻反応および鼻過敏性を検出できるようになり、さらには抗原

チャレンジ回数がそれらに対して影響することが明らかになった。3日間抗原暴露によって検出される即時的過敏性反応と、さらなる抗原暴露後に生じる抗原特異的即時相および遅発相反応は、抗原チャレンジ回数を調整することで区別して誘発できる。即時的過敏性反応の評価に用いたマウスをさらに繰り返し抗原チャレンジを行うことにより、同じマウスで抗原特異的即時相および遅発相反応を検出可能である。また、WBPのチャンバー数を増やせば、多くのマウスの測定結果が同時に自動的に得られるため、麻酔下での鼻腔抵抗値測定やくしゃみおよび鼻かき回数の計測実験に比べ実験効率が向上すると考えられる。

以上、我々が作製したマウスアレルギー性鼻炎モデルによって、それまで困難であったマウスの鼻閉を間接的に捉えること、さらには反応誘発後長時間測定することが可能となった。今後、本モデルにおける免疫・薬理学的評価や種々遺伝子改変マウスの使用などにより、アレルギー性鼻炎の病態解明が一層躍進することが期待される。

## 文 献

- 1) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会(編). 鼻アレルギー診療ガイドライン—通年性鼻炎と花粉症—2009年版, 改訂第6版. ライフ・サイエンス; 2008.
- 2) Naclerio RM, et al. New Engl J Med. 1985;313:65-70.
- 3) Asakura K, et al. Int Arch Allergy Immunol. 1993;102:195-199.
- 4) Nabe T, et al. Inflamm Res. 1998;47:369-374.
- 5) Saito H, et al. Immunology. 2001;104:226-234.
- 6) Miyahara S, et al. J Allergy Clin Immunol. 2005;116:1020-1027.
- 7) Miyahara S, et al. J Allergy Clin Immunol. 2008;121:718-724.
- 8) Wills-Karp M, et al. Science. 1998;282:2258-2261.
- 9) Taube C, et al. J Immunol. 2002;169:6482-6489.
- 10) Miyahara S, et al. J Allergy Clin Immunol. 2006;118:1110-1116.