

鼻アレルギーマウスモデル作成の試み

札幌医科大学医学部耳鼻咽喉科学教室

渡辺雅子 朝倉光司 斎藤博子 形浦昭克

鼻アレルギーマウスモデル作成の試みとして BALB/c 系マウスを 4 群に分け全身感作, 局所感作を行いその症状, 鼻粘膜浸潤好酸球, 及び PCA titer について検討した. ovalbumin (OA) と alum の腹腔注射による全身感作と OA 局所投与を繰り返し行った群において著明な抗原によって誘発される鼻症状, 鼻粘膜好酸球浸潤, 及び PCA にて特異的 IgE 抗体価の上昇を認めた. また, ヒスタミン感受性についても過敏性の亢進を認めた. このモデルはヒトの鼻アレルギーに対応する 3 条件を備え今後の鼻アレルギー研究に有用な動物モデルであると思われた.

Key words: animal model — histamine sensitivity — mucosal eosinophilia — nasal allergy — PCA

はじめに

I 型アレルギーの実験を行う上で, 動物モデルは必要不可欠のものとなっており, モルモット¹⁾⁻³⁾, ラット⁴⁾⁵⁾, イヌ⁶⁾, サル⁷⁾等で気管支喘息モデル, アトピー性皮膚炎モデルおよび鼻アレルギーモデルなどが様々な施設で考案され用いられてきた. 現在までのところ鼻アレルギーモデルとして考案され実際に動物実験として使用されているのはモルモット及びラットの 2 種である. 実験的鼻アレルギーモデルとしてなるべくヒトに近いものを求めるならば自然発症に鼻アレルギーが認められる動物が最も望ましいが, 現在ブタクサ花粉症のイヌ⁸⁾⁹⁾とスギ花粉症のニホンザル¹⁰⁾の二つの報告があるのみでどちらも実験室レベルで使用されるには到っていない. また, どの動物においても系統発生的に鼻アレルギーを発症するものはまだ考案されていない.

これらの動物モデルの作成に当たっては簡単に疾患を再現でき, かつ動物の扱いが簡便であるものが望ましい. また現在, 免疫学的, 分子生物学的および遺伝子学的実験手技の多様化により, 多種のリコンビナント蛋白や抗体が商業ベースに乗っており遺伝子の DNA 配列が知られているものが望ましいと思われる.

る. 今回我々は, この条件に沿うものとして, マウスを用いた鼻アレルギーモデルの作成を試みたので報告する.

方 法

4 週齢の雄の BALB/c マウスを使用した. 当教室の相馬らのモルモットの感作¹¹⁾及び斎藤らのラットの感作の方法⁵⁾を参考とし, 6 匹ずつ各 4 群に分け, 全身感作のみの群 (GS: general sensitized 群), 局所感作のみの群 (LS: local sensitized 群), 全身+局所感作群 (GLS: general & local sensitized 群), 局所+局所感作群 (LLS: local & local sensitized 群) とした. Fig. 1 に示すスケジュールで各群の感作を行った. 感作抗原としては ovalbumin (OA) を用いた.

1) 鼻症状

GS・LS 群は day 28 に抗原を点鼻し, GLS・LLS 群は day 34 の点鼻終了後, 10 分間のくしゃみ, 鼻搔き回

	Day 1, 5, 21	Day 28-34
GS group	Intraperitoneal injection OA 1 μ g+alum 100 μ g/body	—
LS group	Nasal dripping OA 0.4 μ g+alum 40 μ g/body	—
GLS group	Intraperitoneal injection OA 1 μ g+alum 100 μ g/body	Nasal dripping OA 400 μ g/body
LLS group	Nasal dripping OA 0.4 μ g+alum 40 μ g/body	Nasal dripping OA 400 μ g/body

Fig. 1. Schedule of mice sensitization.
Each groups has six BALB/c mice.

Received: October 16, 1995

Accepted: July 25, 1996

Abbreviations: OA ovalbumin; GS general sensitized; LS local sensitized; GLS general and local sensitized; LLS local and local sensitized; PCA passive cutaneous anaphylaxis

数を観察し、抗原によって誘発される鼻アレルギー症状の指標とした。

2) 鼻粘膜浸潤好酸球数および組織中好塩基性細胞数の算定

抗原点鼻24時間後のマウスをペントバルビタール腹腔注射にて (1.5mg/body) 麻酔した後、心腔穿刺により脱血死させた。採取した鼻組織は迅速凍結し、厚さ6 μ mの切片に作成し、ハンセル染色にて鼻中隔に浸潤する好酸球数および好塩基性細胞数をカウントした。

3) 抗原特異的8日間PCA抗体価測定法

IgE抗体価の指標として8日間PCA抗体価を用いた。既述した心腔穿刺により得られた血清は-80°C保存とした後2倍希釈系列とし8日間PCA抗体価を測定した。ラット背部に血清を皮内注射後、8日目に大腿静脈より1%エバンスブルー0.5mlとOA 10mg/mlを0.5ml注射し、30分後に注射部位の色素斑直径5mm以上を陽性とした¹²⁾。

4) ヒスタミン過敏性の測定

感作を行っていないマウスに対しヒスタミンの10倍希釈系列水溶液を点鼻し、点鼻後10分のくしゃみ、鼻掻き回数をプロットし、感作後のマウスに同様にヒスタミンを点鼻し、ヒスタミンに対する鼻症状に変化があるかを調べた。

測定値は全て平均 $\pm$ 標準誤差で表し、統計処理は全てマン-ホイットニーUテストによった。

結 果

1) 抗原点鼻後の鼻症状を検討した結果、1日のみのOAの点鼻を行った群では最初の感作の方法にかかわらず鼻症状はほとんど示さなかった。鼻掻き症状についてはGLS群はGS群LS群に対して有意に増加していた (GLS群 35.8 ± 15.9 , GS群 12.3 ± 4.6 , LS群 8.8 ± 4.5 , $p < 0.01$, Fig. 2-1)。LLS群では鼻掻き回数の増加を認めるが、くしゃみ症状ではGLS群は他の3群に比し有意なくしゃみ回数の増加を認めた (GLS群 38.2 ± 16.4 , LLS群 8.2 ± 3.9 , GS群 0 ± 0 , LS群 0 ± 0 , $p < 0.05$, Fig. 2-2)。

2) 抗原点鼻24時間後の鼻中隔浸潤好酸球数を測定した結果、他の3群に比してGLS群に有意に高い好酸球数の浸潤を認めた (GLS群 140.8 ± 21.8 , LLS群 4.3 ± 1.2 , GS群 1.0 ± 0.4 , LS群 1.7 ± 0.9 , $p < 0.01$, Fig. 3-1)。また好塩基性細胞もGLS群に多い傾向が

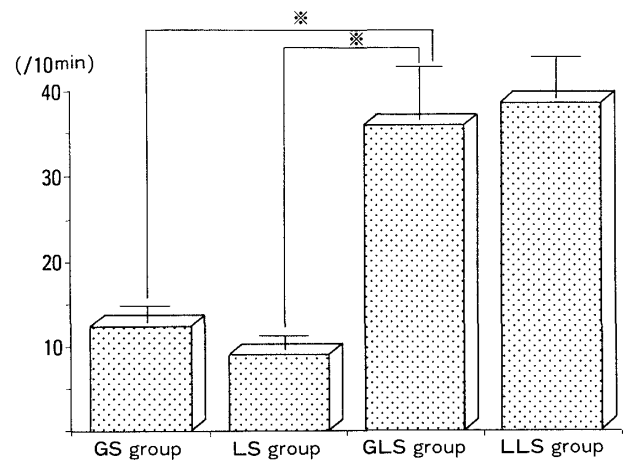


Fig. 2-1. Nasal rubbing.

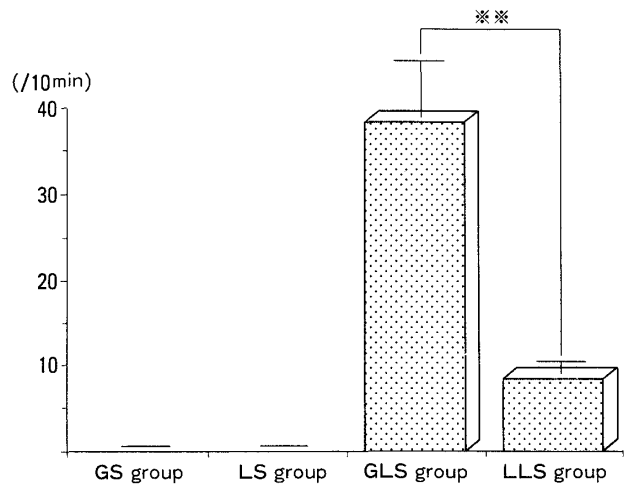


Fig. 2-2. Sneezing.

Fig. 2. Nasal symptoms after antigen nasal challenge.

Fig. 2-1: Nasal rubbing, Fig. 2-2: Sneezing.

Each symptoms were counted in 10 minutes after antigen challenge. Values are mean $\pm$ SE.

※: $p < 0.05$, ※※: $p < 0.01$

あった。(GLS群 18.3 ± 3.4 , LLS群 12.0 ± 2.5 , GS群 4.5 ± 1.5 , LS群 9.7 ± 2.6 , Fig. 3-2)。

3) 8日間PCA titerによる抗原特異的IgE抗体価を測定した結果、LS群では抗体価の上昇は全く認めなかった。GLS群は他の3群に対して有意差をもって抗体価は上昇していた ($p < 0.01$, Fig. 4)。

4) 感作を行っていないコントロール群のマウスにヒスタミン溶液を鼻腔投与した時の症状について検討した。1ng/mlより1 μ g/mlまでの10倍希釈系列を点鼻し、その後10分間のアレルギー症状をカウントした。鼻掻き回数はほぼdose-dependentに上昇するがく

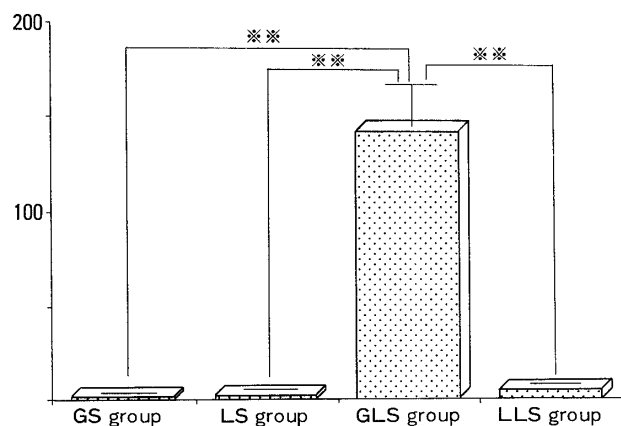


Fig. 3-1. Number of Eosinophils.

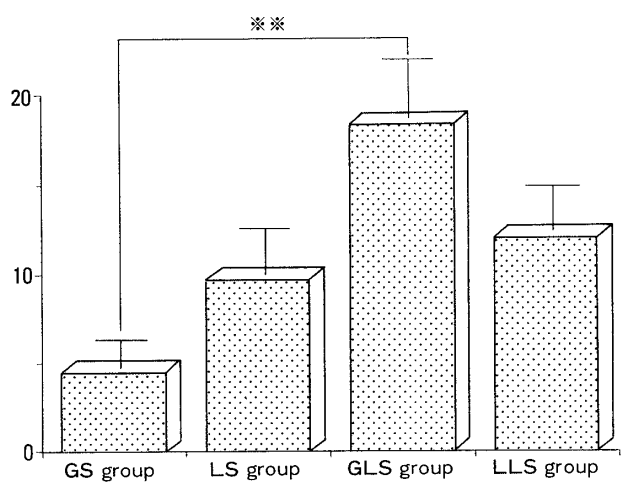


Fig. 3-2. Number of basophilic cells.

Fig. 3-1. Number of Eosinophils

Fig. 3-2. Number of basophilic cells

All cells in nasal septum were counted by Hansel stain.

Values are means ± SE. **: $p < 0.01$

しゃみは $1\mu\text{g/ml}$ より出現するためこのときの $M+2SD$ よりくしゃみ回数6回/10min以上をヒスタミンに反応する鼻症状の閾値と定めた (Fig. 5).

ヒスタミン過敏性はGLS群とLLS群に施行した。両群ともにコントロール群に比して有意にヒスタミン閾値は低下していたが ($p < 0.01$) GLS群はLLS群に比しても有意に閾値の低下を認めた ($p < 0.01$, Fig. 6).

考 察

ヒトの鼻アレルギーの診断に関しては、1) 抗原に

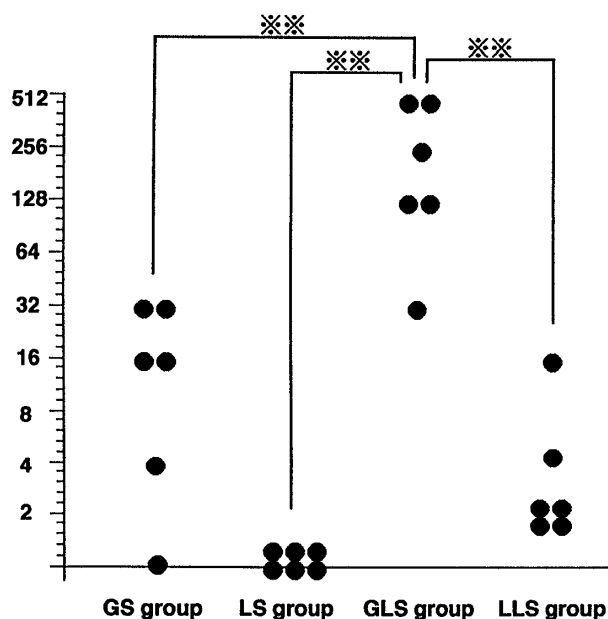


Fig. 4. The 8 days PCA titer of each group.

**: $p < 0.01$.

よって誘発される鼻症状があること、2) 血中抗原特異性 IgE 抗体の存在、および 3) 鼻汁中の好酸球の存在の3条件を要することは“鼻アレルギー診断の指標”にも述べられている¹³⁾。今回、我々が行ったマウス鼻アレルギーモデル作成の試みにおいて上に述べた各群間の比較の結果、全身感作後、局所抗原投与を繰り返したGLS群において抗原点鼻後の鼻搔き、くしゃみ症状の出現、PCA titerの上昇、鼻粘膜中の好酸球浸潤を認め鼻アレルギーの診断に必要な項目を満たしており鼻アレルギーモデルとして最も適していると考えられた。感作中に喘息様発作及びアナフィラキシーを起こしたものは全群を通して認めなかった。受動感作は一度に多数匹の感作が一樣に短時間にできるという長所を持つが、受動感作して得られたモルモットモデルは能動感作とは非特異的過敏性や抗原に対する組織の反応も異なるという報告もあり¹⁴⁾¹⁵⁾、実際のアレルギーの病態に即したモデルは能動感作で得られたものであると考える。LLS群はくしゃみ症状はあまり認めなかったが、鼻搔き回数はGLS群とはほぼ同様に増えており、ヒスタミン閾値も低下していた。またPCA titerもわずかながら上昇してきており、実際ヒトの鼻アレルギー発症の病態から考えるとこのような局所感作の繰り返しがきわめて重要であり、本来さらに局所感作を繰り返して行ったLLS群がよりヒトの鼻アレルギー、鼻過敏症に近いのではないかとと思われるが、時

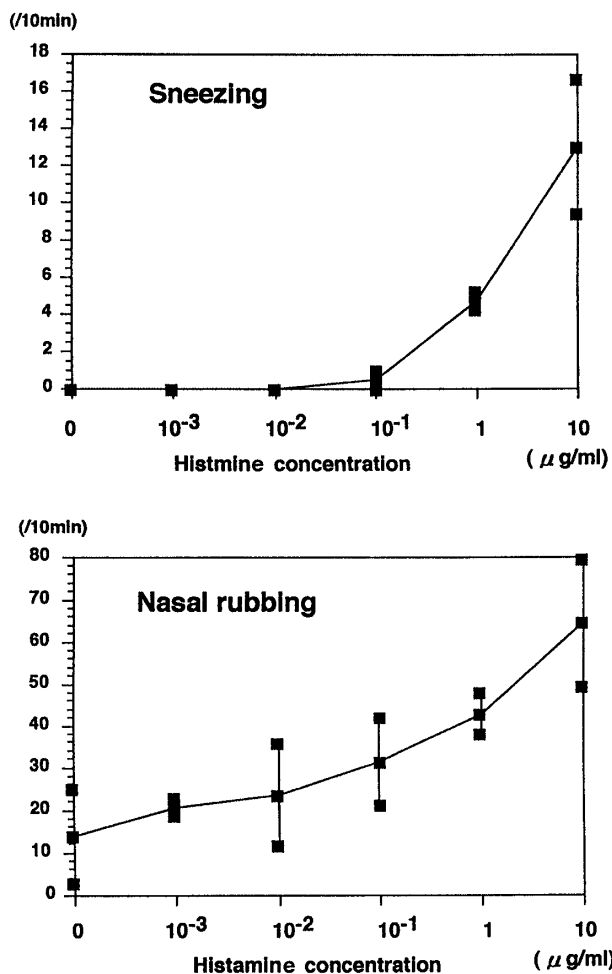


Fig. 5. Nasal symptoms against histamine nasal dripping on non-sensitized 4 mice. Number of nasal rubbing increased by dose-dependent. Sneezing could not be observed at low histamine concentration ($<10^{-1}\mu\text{g/ml}$).

間がかかりすぎるため実験モデルとしては理想的でない。いずれにしてもアレルギー症状の発現のためには局所における繰り返す抗原刺激が必須であると思われる。

実際に使用されている鼻アレルギーモデル動物は全て人為的、後天的に作成されたものであり、現在使用されているのは主にモルモットとラットである¹⁾⁻⁶⁾。伊藤、無江ら¹⁶⁾¹⁷⁾によるとモルモットは感作されやすく鼻アレルギーモデルとしても最頻用されているが、もともとアセチルコリンやヒスタミンに対し気道過敏性を有しアナフィラキシーを起こしやすく、そうなる短時間のうちに死亡するため鼻アレルギーの症状の観察には不适当であるとされている。ラットはモルモットよりも報告は少ないが今後増えてくると考えら

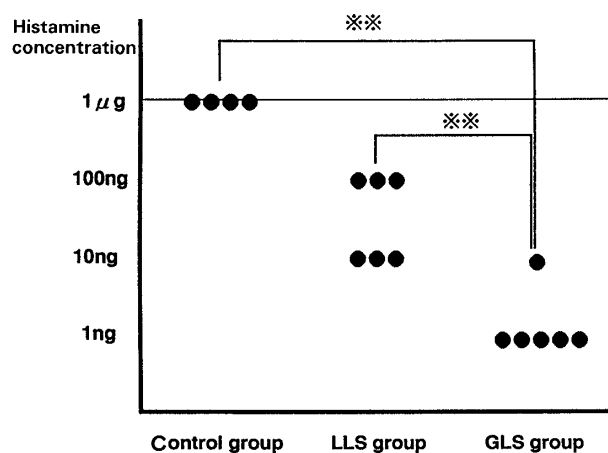


Fig. 6. Change of histamine sensitivity on LLS & GLS group. **: $p < 0.01$.

れるが、気道過敏性をつくるのは困難であるとされている¹⁶⁾¹⁷⁾。

マウスモデルの利点としては、安価であり取り扱い易いことがあげられる。欠点としては即時反応の症状を観察する場合、ある程度の熟練を要すること、鼻汁の採取が困難であり、遅発型反応である鼻呼吸抵抗の増大を観察するのが現時点では不可能であるということである。ただし acoustic rhinometry などの測定機器の進歩によりこの点は改善が期待される。

ヒスタミン過敏性の亢進は鼻アレルギーの患者についてはかねてから報告されており¹⁸⁾⁻²⁰⁾、正常人が症状を起こす $1/100\sim 1/1000$ のヒスタミン濃度で同様の症状を起こすとされている。今回の我々の実験結果ではマウスについても同様のヒスタミン過敏性の亢進が生じ、ヒトと同じく通常閾値のほぼ $1/1000$ 倍濃度のヒスタミンに反応することがわかった。ヒスタミン過敏性の亢進がみられなかった群のマウスでは症状もあまり観察されず、アレルギー反応とヒスタミン過敏性の間には密接な関連性が推察される。

マウスは商業ベースで販売されている抗体、リコンビナント蛋白の数が多く、また塩基配列もヒトとほぼ同程度に判明している。従ってマウスの鼻アレルギーモデルは、今後の分子生物学的実験手段として有用であると思われる。

最後に、症状及び IgE 抗体価の上昇を兼ね備えたモデルであっても、自然発症する人間の鼻アレルギーと全く同じではないことを研究者は理解しなくてはならない。さらに動物実験を行う上で倫理的側面も忘れてはならない問題であることを明記しておく必要がある

う²¹⁾²²⁾.

結 語

1) マウス鼻アレルギーモデル作製について検討した。

2) 全身感作を行った後抗原の局所投与を繰り返したマウスは鼻アレルギーモデルとして有用であると思われた。

文 献

- 1) 齊藤洋三, 堀口申作, 荒田節夫, 他: 花粉症の研究 (その6) —実験的花粉アレルギー—. 日本耳鼻咽喉学会誌 6, 67-68, 1967.
- 2) 原田重俊: 鼻アレルギーの臨床病理組織学的研究. 日耳鼻 74, 938-953, 1971.
- 3) 白崎英明, 小島 正, 朝倉光司, 形浦昭克: 実験的鼻アレルギーモルモットにおける chemical mediator 放出に関する検討. 日耳鼻 91, 1049-1053, 1988.
- 4) 奥田 稔: 鼻アレルギーの基礎と臨床. 耳鼻 20, 297-344, 1974.
- 5) 斎藤博子, 朝倉光司, 形浦昭克: ラット鼻アレルギーモデルに対する抗細胞接着分子抗体投与の試み. アレルギー 43, 579-584, 1984.
- 6) Patterson, R.: Investigation of Spontaneous hypersensitivity of the dog. *J. Allergy* 31, 351-363, 1960.
- 7) Wegner, C.D., Gundel, R.H., Reilly, P., et al.: Intercellular adhesion molecular 1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247, 456-459, 1990.
- 8) Wittich, F.W.: Allergic disease in animals. *Progr. Allergy* 2, 58, 1949.
- 9) Patterson, R.: Laboratory models of reaginic

allergy. *Progr. Allergy* 13, 332-407, 1969.

- 10) 横田 明, 峯澤 満, 中村 伸, 他: ニホンザル宮島群にみられたスギ花粉症について. 霊長類研究 3, 112-118, 1987.
- 11) 相馬新也, 朝倉光司: 実験的鼻アレルギーの確立と鼻粘膜における β -adrenergic receptor の検討. 札幌医誌 55, 161-175, 1986.
- 12) Mancino, D. and Bevilacqua, N.: Persistent and Boosterable IgE antibody production in mice injected with low doses of ovalbumin and silica. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 57, 155-158, 1978.
- 13) 牧野莊平: アレルギー疾患治療ガイドライン—鼻アレルギー(含花粉症)の診断と治療. ライフサイエンス・メディカ, 東京, p.63, 1993.
- 14) 小島正三, 堤 直行, 阿部充生, 他: ラットの実験的アレルギー性鼻炎モデルとこれに及ぼす tranilast および抗ヒスタミン剤の影響. アレルギー 35, 180-187, 1986.
- 15) 小島正三, 堤 直行, 百瀬泰紀, 他: ラットの実験的アレルギー性鼻炎およびそれに及ぼす影響. 信州医誌 31, 123-127, 1983.
- 16) 伊藤幸治: 呼吸器疾患 1. “新薬開発のための動物モデル利用集成”. R&D プランニング. 東京, pp. 356-366, 1985.
- 17) 無江季次: 気道過敏性の動物モデル. “気道過敏性の基礎と臨床”(瀧島 任, 宮本昭正 編), pp.110-134, 文光堂, 東京, 1985.
- 18) Ulrich, H.L.: Experimental pollinosis. *J. Immunol.* 3, 453-461, 1918.
- 19) 阿部能之, 荻野 敏, 入船盛弘, 松永 亨: ヒト及び鼻過敏症モルモット鼻粘膜のヒスタミン代謝. 日耳鼻 94, 1113-1122, 1991.
- 20) 足川哲夫: オゾン暴露のマウス肺及び鼻粘膜に及ぼす影響とヒスタミンの関与. 耳展 33, 9-21, 1990.
- 21) 横田 明, 馬場駿吉: 鼻アレルギーの動物モデル. 耳鼻免疫アレルギー 7, 1-5, 1989.
- 22) 入船盛弘: アレルギー性鼻炎の実験動物モデル. 耳鼻臨床 41, 208-217, 1991.

STUDIES ON MURINE MODEL OF NASAL ALLERGY

Masako Watanabe, Kohji Asakura, Hiroko Saito and Akikatsu Kataura

Department of Otolaryngology School of Medicine, Sapporo Medical University

For the purpose of making a murine model of nasal allergy, we performed the ovalbumin (OA)-sensitization on groups of BALB/c mice in four different ways. The 1st group was sensitized with OA + alum by intraperitoneal myection on day 1, 5 and 21, and the 2nd group was added OA nasal drips on day 28-34. The 3rd group was performed OA + alum nasal dripping on day 1, 5 and 21, and the 4th was a added OA nasal dripping in the same way with the 2nd group.

The observed OA-induced nasal symptoms, mucosal eosinophilia and 8 days-PCA titer were remarkable in 2nd group, moreover it also showed higher histamine hypersensitivity than other groups. We concluded that mice sensitized by OA with alum are useful for research of nasal allergy, for the reason that they possess three features of nasal allergy, anti-intigen-induced nasal symptoms, eosinophils infiltration and antigen-specific PCA titer as index of IgE increasing.
