

ディーゼル排気ガスとスギ花粉症 - 胎仔期暴露の影響 -

渡辺 伸枝*, 大澤 誠喜*, 池野谷 美奈**, 武田 健**

Elevation of immunoglobulin E to *Cryptomeria japonica* pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal period

Nobue WATANABE*, Masanobu OHSAWA*, Mina IKENOYA**, Ken TAKEDA**

Purpose: The possible participation of diesel exhaust inhalation during fetal development in postnatal immune function was tested.

Method: The experiment was conducted using pups. Group 1; exposed to clean air (*Control*). Group 2, 3; exposed to total or filtered diesel exhaust from the 7th day of gestation until 3 days after birth (*Total-C-C*, *Filtered-C-C*). Group 4, 5; exposed to total or filtered diesel exhaust from the 4th through the 22nd days after birth (*C-Total-C*, *C-Filtered-C*). Group 6, 7; exposed to total or filtered diesel exhausts from the 23rd through the 41st days after birth (*C-C-Total*, *C-C-Filtered*). Total diesel engine exhaust contained 1.73 mg/m³ particulate matter and 0.79ppm nitrogen dioxide; filtered exhaust contained the same gases as the total exhaust except for particulate matter. Intraperitoneal injection of 5mg pollen grains was administered from day 56.

Results: The mean IgE titers measured by the P-K reaction in the *Control*, *Total-C-C*, *Filtered-C-C*, *C-Total-C*, *C-Filtered-C*, *C-C-Total* and *C-C-Filtered* were 78.9 ± 3.6, 141.5 ± 2.0, 264.4 ± 1.3, 255.7 ± 1.3, 202.1 ± 2.1, 113.6 ± 2.0 and 78.9 ± 3.6 after the fourth immunization, respectively. There were significant differences between *Total-C-C*, *Filtered-C-C*, *C-Total-C*, *C-Filtered-C* and *Control* (p<0.05, p<0.01, p<0.01, p<0.05, respectively).

Keywords: ディーゼル排気ガス diesel exhaust, ラット rat, 胎仔期暴露 fetal-period, スギ花粉 *Cryptomeria japonica* pollen, IgE immunoglobulin E

緒 言

ディーゼル排気ガスの妊娠ラットへの暴露は血中テストステロン濃度を上昇させること、このような母体の内分泌環境の変化が胎子の生殖器や胸腺の形成に影響を及ぼすことを報告した¹⁾。

免疫機能の中核的器官である胸腺はステロイドホルモンに対する感受性が高く、ステロイド剤の投与は免疫機能の低下を起こす。特に妊娠動物にステロイド剤を投与した場合、その影響は母体ばかりでなく胎子にも及び、胸腺上皮細胞の機能を抑制し胸腺リンパ球の分化を阻害することが報告されている²⁻⁴⁾。以上のことから、排気ガスの妊娠動物への暴露、すなわち胎仔期における暴露は、アレルギー素因となる可能性が考えられる。

本研究では、ディーゼル排気ガスの胎仔期暴露のインパクトを明らかにする目的で、胎仔期、哺乳期あるいは離乳後に排気ガスに暴露されたラットにスギ花粉を感作し、花粉に特異なimmunoglobulin E (IgE)抗体を測定した。すでに雄性仔ラットの抗体産生反応については報告しており⁵⁾、今回は雌性仔ラットについての結果である。また暴露実験

は、全排気ガス群・除塵群・対照群で構成し、スギ花粉に対するIgE抗体の上昇には、排気ガス中のガス状成分あるいは粒子状成分のいずれが主として関与しているのか考察した。

実験方法

暴露条件 ディーゼル排気ガスの暴露方法並びに条件は前報⁵⁾に準じて行った。排気量400cc小型のディーゼルエンジンを用い、清浄空気で希釈し、暴露チャンパー内に導入した。これを全排気ガス群とした。除塵群には、上記の排気ガスを、ヘパフィルターに通し、0.05μm以上の粒子状成分を除去して暴露した。対照群には清浄空気を暴露した。全排気ガス群のチャンパー内の粉塵濃度は1.73mg/m³、二酸化窒素濃度は0.79ppmであった。除塵（二酸化窒素濃度：0.80ppm）であった。

動物の暴露と免疫のスケジュール 43匹の妊娠ラット(F344/DuCrj)を日本チャールスリバーから購入し、Fig.1に示したように7グループに分けた。実験はこれらの妊娠ラット由来の仔ラットを用いて行った。胎仔期、哺乳期、離乳

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京理科大学薬学部衛生化学研究室

示したように7グループに分けた 実験はこれらの妊娠ラット由来の仔ラットを用いて行った。胎仔期、哺乳期、離乳後それぞれ19日間暴露したラットについて、生後56日目から2週間ごとに、スギ花粉を抗原として腹腔投与した。花粉は一回につき粗抗原量として5mgを水酸化アルミゲル4mg(Pierce, USA)とともにNaHCO₃ (0.125M, 0.3mL) に加え投与した。感作実験前すなわち生後56日目と、3回および4回の感作5日後すなわち生後89, 103日目にエーテル麻醉下にて全採血するとともに臓器重量の測定を行った。

に、0.5%のエバンスブルー液を1mL静注し、30分後に青いスポットを皮膚の裏側から計測した。スポットの直径5mm以上のものを陽性とした。

結 果

Table 1に花粉投与前の生後56日目、花粉投与の後である生後89, 103日目の各群の体重、脾臓重量、胸腺重量を示した。胎仔期に全排気ガスあるいは除塵排気ガス暴露された群(T-C-C, F-C-C)の生後56日目、並びにF-C-C群の生後103日目の胸腺重量は対照群に比べ有意に低かった。T-C-C群の生後89日目の脾臓重量は同時期の対照群より高かった。哺乳期に全排気ガスあるいは除塵排気ガス暴露された群(C-T-C, C-F-C)の生後56日目の脾臓重量は同時期の対照群より高かった。離乳後全排気ガスあるいは除塵排気ガス暴露された群(C-C-T, C-C-F)の生後56, 89, 103日目の胸腺と脾臓の重量は対照群より高かった。体重は実験期間中いずれの群にも対照群と比べて有意な違いはなかった。

Fig.2にスギ花粉3,4回感作後のP-K反応で測定した個々のラットのIgE値と群ごとの幾何学的平均値を示した。花粉感作3回後では、F-C-C群の平均IgE値は140.0±7.1で対照群の平均IgE値34.9±5.1に比べて高かった。F-C-C群と対照群のIgE値の間には有意な差がみられた(P<0.05, table 2)。T-C-CとC-T-C群の平均IgE値は各々66.2±6.0, 66.0±6.0で対照群と同程度であった。C-F-C, C-C-T, C-C-F群の平均IgE値は各々22.6±4.5, 8.1±3.0, 17.6±4.1で対照群より低かった。4回感作後では、各群の平均IgE値は3回感作後に比べて高くなっていった。胎仔期に暴露されたT-C-C, F-C-C群と哺乳期に暴露されたC-T-C, C-F-C群の平均IgE値は各々141.5±2.0, 264.4±1.3, 255.7±1.3, 202.1±2.1で対照群の平均IgE値78.9±3.6に比べて高かった。T-C-C, F-C-C, C-T-C, C-F-C群と対照群のIgE値の間には有意な差がみられた(P<0.05, 0.01, 0.01, 0.05, table 2)。離乳後暴露されたC-C-T, C-C-F群では各々113.6±2.0, 78.9±3.6で対照群と同程度であった。また、胎仔期に全排気ガスに暴露されたT-C-C群と除塵排気ガスに暴露されたF-C-C群のIgE値には有意な差がみられた(P<0.01, table 2)。

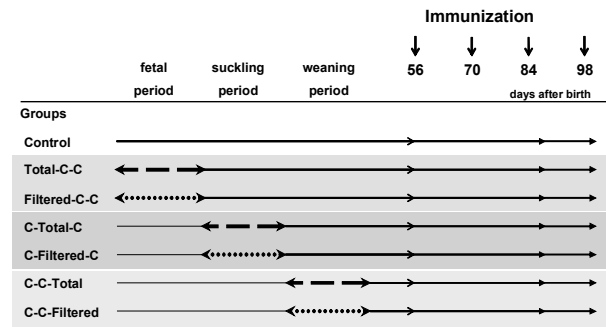


Fig. 1. Experimental Protocol. Control, exposed to clean air; Total-C-C, exposed to total diesel exhaust from the 7th day of gestation until 3 days after birth; Filtered-C-C, exposed to filtered exhaust from the 7th days of gestation until 3 days after birth; C-Total-C, exposed to diesel exhaust from the 4th day after birth through the 22nd day after birth; C-Filtered-C, exposed to filtered exhaust from the 4th day after birth through the 22nd day after birth; C-C-Total, exposed to diesel exhaust from day 23 after birth to day 41; C-C-Filtered, exposed to filtered exhaust from 23 after birth to day 41.

P-K反応によるスギ花粉に特異なIgEの測定 即時型皮膚反応の一つであるPrausnitz-Kustner(P-K)反応は抗原に特異的なIgE抗体の量と高い相関があることが知られている⁶⁾。また、P-K反応はELISA法に比べIgE抗体が微量の場合でも検出可能だったことから⁵⁾、本報告ではスギ花粉抗原に特異なIgE抗体価をP-K反応によって測定した。血清を2倍段階希釈したものをそれぞれ0.1mLずつ、日本チャールスリバーから購入した12週齢の雄ラット(F344/DuCrj)の背部皮内に接種した。48時間後にスギ花粉精製抗原である0.5µgのCry j 1と0.25µgのCry j 2(林原生物化学研究所)の混合液0.02mLを背部の同一部位に皮内注射するととも

Table 1. Average Body, Spleen and Thymus Weight of Female Rats from each Group on Days 56, 89 and 103.

Groups	non-immunized rats on day 56			89-day-old rats immunized three times			103-day-old rats immunized four times					
	No. of rats	body weight (g)	spleen (mg)	thymus (mg)	No. of rats	body weight (g)	spleen (mg)	thymus (mg)	No. of rats	body weight (g)	spleen (mg)	thymus (mg)
Control	8	117.4 ± 3.5	330.1 ± 14.6	225.5 ± 19.1	8	152.9 ± 3.8	412.6 ± 18.4	158.8 ± 13.7	9	157.1 ± 7.8	420.8 ± 11.2	152.9 ± 9.5
Total-C-C	8	118.5 ± 4.1	334.8 ± 29.7	196.7 ± 29.1 *	9	146.4 ± 7.8	443.0 ± 27.3 *	153.7 ± 17.9	9	156.1 ± 11.0	433.5 ± 55.9	152.1 ± 18.7
Filtered-C-C	8	111.1 ± 7.0	320.3 ± 19.5	205.7 ± 25.2 *	8	146.7 ± 5.7	406.3 ± 32.3	149.5 ± 18.7	8	159.1 ± 4.0	416.1 ± 21.4	140.7 ± 11.9 *
C-Total-C	8	118.1 ± 5.5	354.9 ± 30.9 *	209.3 ± 28.0	8	146.3 ± 8.1	406.9 ± 39.5	153.2 ± 13.9	9	152.6 ± 5.1	415.3 ± 30.2	138.6 ± 19.9
C-Filtered-C	7	117.3 ± 4.4	348.4 ± 9.8 *	220.4 ± 14.5	8	155.9 ± 12.7	423.8 ± 19.5	160.1 ± 15.3	8	156.6 ± 5.2	421.0 ± 28.7	139.4 ± 20.2
C-C-Total	8	124.3 ± 9.5	377.7 ± 27.3 **	264.1 ± 28.5 **	6	147.8 ± 4.4	482.1 ± 17.3 **	214.5 ± 15.2 **	7	162.6 ± 7.2	460.7 ± 43.3 *	190.8 ± 13.0 **
C-C-Filtered	8	122.3 ± 9.9	384.7 ± 10.2 **	271.2 ± 24.8 **	8	145.8 ± 6.3	471.2 ± 47.4 **	201.7 ± 20.4 **	9	151.8 ± 6.4	478.4 ± 25.4 **	173.2 ± 19.4 *

Values are expressed as mean ±SD.

* Different from Control, p<0.05; ** different from Control, p<0.01

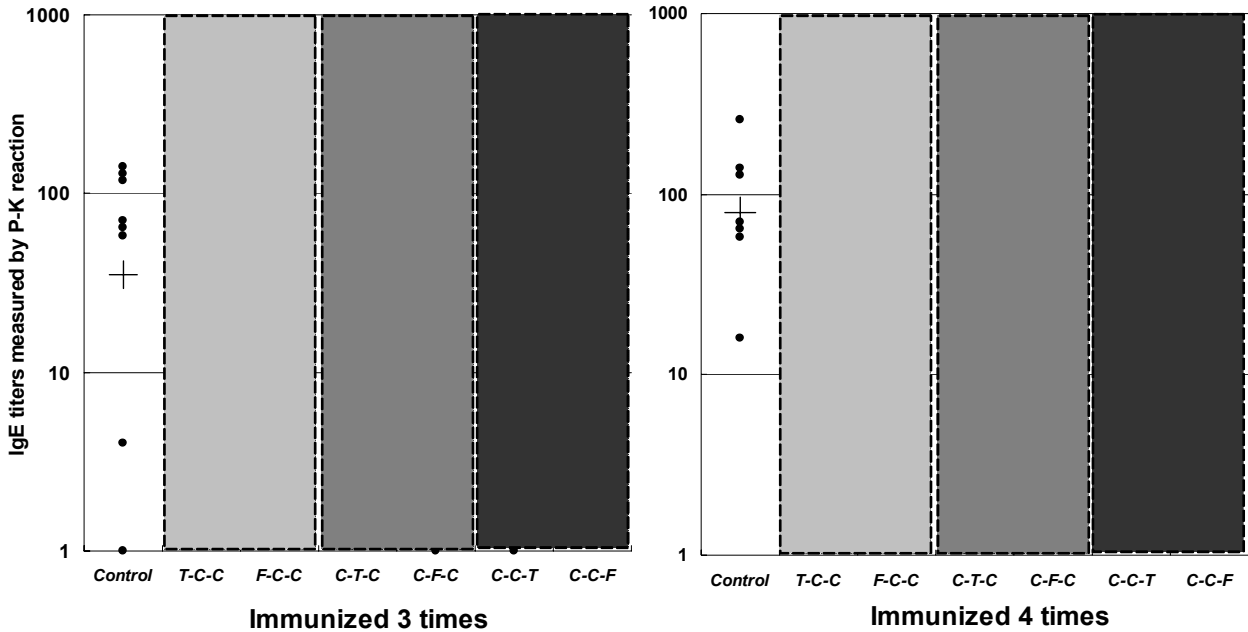


Fig.2. Anti-Japanese Cedar Pollen IgE Titers Measured by P-K Reaction.

Table 2. Log₂ P-K IgE Titers in Rats Immunized Three or Four Times.

	Immunized three times			Immunized four times		
	n	log ₂ P-K IgE titers		n	log ₂ P-K IgE titers	
Control	8	5.1 ± 2.6		9	6.3 ± 1.3	
Total-C-C	9	6.1 ± 2.3		9	7.1 ± 0.7	*,#
Filtered-C-C	8	7.1 ± 1.4	*	8	8.0 ± 0.2	**
C-Total-C	8	6.0 ± 2.1		9	8.0 ± 0.3	**
C-Filtered-C	8	4.5 ± 2.3	*	8	7.7 ± 0.8	*
C-C-Total	6	3.6 ± 2.1	*	7	6.8 ± 0.7	
C-C-Filtered	8	4.5 ± 2.5	*	9	6.3 ± 1.3	

Values are expressed as mean ± S.E.

* Different from Control, p<0.05; ** different from Control,

p<0.01; # different from Filtered-C-C, p<0.01

考 察

雌性仔ラットを用いた今回の実験において、胎仔期に除塵排気ガスに暴露されると哺乳期や離乳後に暴露された場合に比べ少量の抗原でスギ花粉に対するIgE抗体が上昇することが明らかになった。また、感作の回数が増すと、哺乳期に暴露された場合でもIgE抗体が上昇した。一方、離乳後に暴露された場合は対照群と同程度の反応であった。このIgE抗体産生反応は雄性仔ラットの場合とほぼ同様の結果であった⁵⁾。

免疫機構の中核である胸腺の発達過程みると、ラットでは胎生 9-11日目頃に胸腺原基に胸腺リンパ球の幹細胞が流入し、胎生11日目から誕生数日後まで胸腺上皮細胞の支配の下にリンパ球の増殖が盛んに行われ、生後30日目頃には免疫の基本的な機能がほぼ確立され、生後60日目頃には種々の刺激や侵襲に対してさらに効率よく反応する機構が完成される^{7,8)}。胎生7日目から20日目まで排気ガスに暴露されたラットの胸腺では対照群に比べ重量が低くまたリンパ球の数も少なかった¹⁾。胸腺リンパ球のCD8陽性のリンパ

球がIgE抗体産性を制御することが報告されている⁹⁻¹²⁾。胎仔期暴露は形成過程にある胸腺のTリンパ球の分化に影響を与え、抗体の産生に関わるリンパ球(CD4)と抑制するリンパ球(CD8)の比率を変えるため、IgE抗体が上昇しやすい素因となったことが考えられた。また、哺乳期暴露の場合は、二重の暴露、すなわち吸入による暴露と母乳を介した間接的暴露を受けていること、胸腺がいまだ形成過程にあることからIgE抗体の上昇が起こり易いことが考えられた。今後胸腺、脾臓、末梢血中のリンパ球の構成比について検討し、排気ガスの周産期暴露が花粉症の発症を助長するメカニズムに関してさらに議論を深める必要がある。

臓器重量についてみると、雄性仔ラットの場合と異なり、哺乳期に全排気ガスあるいは除塵排気ガスに暴露された群(C-T-C, C-F-C)の感作前の脾臓の重量が対照群より増していた。離乳後に暴露された群(C-C-T, C-C-F)ではいずれの時期においても胸腺と脾臓の重量が対照群より増していた。この原因として、暴露されることによってほぼ完成している免疫系が活性化すること、すなわち抗体産生能とともに抑制機構も活性化するため免疫担当器官の重量の増加を起こしていることが考えられた。また、雌の方が雄の仔ラットよりも成熟過程が早いこと、あるいは雌の方が暴露に対する適応反応が強く起こる可能性も考えられた。なお、胎仔期に全排気ガスに暴露された群(T-C-C)の三回感作後に脾臓の重量が対照群より増していた。T-C-C群ではIgE抗体の上昇を抑制するリンパ球の増加も起こっていることが考えられた。また、胎仔期に全排気ガスに暴露された群と除塵排気ガスに暴露された群の4回感作後のIgE値には有意な差がみられており、胎仔の免疫系の発達に及ぼす影響は全排気ガスより除塵排気ガスの方が強いことが考えられた。

胎仔期および哺乳期に排気ガスに暴露された場合、花粉に対するIgE抗体の産生は全排気ガス群、除塵群ともにみら

れたことから、この作用は主に、排気ガス中のガス状成分、あるいは、フィルターによる除塵の後も残存している0.05 μ m以下の超微粒子によるのではないかと考えられた。

排気ガスと花粉症について、排気ガス中の粒子状物質がアジュバンド作用をすることで花粉症の発症を助長することが報告されている¹³⁻¹⁷⁾。本研究の結果は排気ガスと花粉症の関わりについて異なる側面からの影響を示唆したものと考える。すなわち排気ガスに妊娠中に暴露されると母体の内分泌環境の変化が起こりその仔の花粉抗原に対する感受性が高まる可能が考えられた。疫学調査によると花粉症発症時期の低年齢化、アレルギー疾患の罹患率の上昇が報告されている^{18,19)}。アレルギーの発症には、環境、遺伝、ライフスタイルなどの因子があげられているが²⁰⁾、今回の結果から、環境汚染による影響は大いにあるのではないかと思われた。今後他のアレルギー疾患と排気ガスの関係についても検討することが必要である。

文 献

- 1) Watanabe, N. and Kurita, M.: *Environ. Health Perspect.*, 109, 111-119, 2001.
- 2) Kumar, N., Shan, L.X., Hardy, M.P., Bardin, C.W. and Sundaram, K.: *Endocrinology*, 136, 4887-4893, 1995.
- 3) Leposavic, G. and Micic, M.: *Thymus*, 20, 77-88, 1992.
- 4) Olsen, N.J., Olson, G., Viselli, S., Gu, X. and Kovacs, X.J.: *Endocrinology*, 142, 1278-1283, 2001.
- 5) Watanabe, N. and Ohasawa, M.: *B.M.C. Pregnancy Childbirth*, 2, 1-9, 2002.
- 6) Ishizaka, K. and Ishizaka, T.: *J. Allergy*, 42, 330-363, 1968.
- 7) Dietert, R.R., Etzel, R.A., Chen, D., et al.: *Environ. Health Perspect.*, 108 (suppl 3), 483-509, 2000.
- 8) Holladay, S.D. and Smialowicz, R.J.: *Environ. Health Perspect.*, 108 (suppl 3): 463-473, 2000.
- 9) Holmes, B.J., MacAry, P.A., A Noble, A. and Kemeny, D.M.: *Eur. J. Immunol.*, 27, 2657-2665, 1997.
- 10) Kemeny, D.M. and Diaz-Sanchez, D.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 94, 99-101, 1999.
- 11) Kemeny, D.M., Noble, A., Holmes, B.J., Diaz-Sanchez, D. and Lee, T.H.: *Allergy*, 50 (25 Suppl): 9-14, 1995.
- 12) Kemeny, D.M.: *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 628-633, 1998.
- 13) Diaz-Sanchez, D., Garcia, M.P., Wang, M., Jyrala, M. and Saxon, A.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 1183-1188, 1999.
- 14) Fujimaki, H., Saneyoshi, K., Shiraishi, F., T Imai, T. and Endo, T.: *Toxicology*, 116, 227-233, 1997.
- 15) Granum, B., Gaarder, P.I. and Lovik, M.: *Toxicology*, 156, 149-159, 2001.
- 16) Steerenberg, P.A., Dormans, J.A., Doorn, C.C. Van et al.: *Inhal. Toxicol.*, 11, 1109-1122, 1999.
- 17) Steinsvik, T.E., Ormstad, H., PI Gaarder, P.I., et al.: *Toxicology*, 128, 219-230, 1998.
- 18) Masuda, S., Takeuchi, K., A Yuta, A., et al.: *Arerugi*, 47, 1182-1189, 1998.
- 19) Masuda, S., Terada, A., Fujisawa, T. and Iguchi, K.: *Arerugi*, 49, 1138-1145, 2000.
- 20) Kemeny, D.M.: *Toxicology*, 152, 3-12, 2000.