

## ディーゼル車排出ガスと花粉症 子宮内曝露・経母乳曝露の免疫機能への影響

渡辺 伸枝<sup>1</sup>, 大澤 誠喜<sup>1</sup>, 湯澤 勝廣<sup>2</sup>, 矢野 範男<sup>2</sup>,  
長澤 明道<sup>2</sup>, 久保 喜一<sup>2</sup>, 高橋 博<sup>2</sup>, 安藤 弘<sup>2</sup>,  
小縣 昭夫<sup>2</sup>, 上原 真一<sup>1</sup>

### The Effect of Diesel-Exhaust-Exposure in Utero and Via lactation on Immune Response to *Cryptomeria japonica* Pollen in Rats

Nobue WATANABE<sup>1</sup>, Masanobu OHSAWA<sup>1</sup>, Katsuhiko YUZAWA<sup>2</sup>, Norio YANO<sup>2</sup>,  
Akemichi NAGASAWA<sup>2</sup>, Yoshikazu KUBO<sup>2</sup>, Hiroshi TAKAHASHI<sup>2</sup>,  
Hiroshi ANDO<sup>2</sup>, Akio OGATA<sup>2</sup> and Shin-ichi UEHARA<sup>1</sup>

The inhalation of diesel exhaust during fetus accelerated the elevation of IgE against pollen. This study was conducted to determine whether maternal inhalation of diesel-exhaust had an influence on offspring by cross fostering animals at birth. On the day of birth, litters of the exposed to total- or filtered-diesel-exhaust groups, and litters of the non-exposed group were cross-fostered, resulting in the following groups: Control (clean air); T C, F C (exposed to total- or filtered-diesel-exhaust in utero and suckled by non-exposed mothers); C T and C F (suckled by mothers exposed to total or filtered-diesel-exhaust during pregnancy). Total-diesel-exhaust contained 1.71 mg/m<sup>3</sup> particulate matter and 0.80 ppm nitrogen. Filtered-diesel-exhaust contained 0.79 ppm nitrogen dioxide. Intraperitoneal injection of 5mg crude cedar pollen was performed 3 or 4 times at 2-week intervals from the 49th day after birth. The IgE titers measured by P-K reaction of the T C and F C groups were significantly higher than those of the Control, C T and C F groups after the 3rd immunization. The IgE titers in the C T and C F groups were the same as those of the Control group even after the 4th immunization. The present findings demonstrated that in utero exposure was a major cause of the immunotoxicity.

**Keywords :** ディーゼル車排出ガス diesel exhaust, ラット rat, スギ花粉 *Cryptomeria japonica pollen*, 免疫グロブリン E IgE, 交差育成 cross-fostering, 子宮内 in utero, 経母乳 via lactation

#### 緒 言

胎仔期, 哺乳期あるいは離乳後にディーゼル排気ガスを曝露されたラットに, スギ花粉を感作し, 花粉に特異な immunoglobulin E (IgE) 抗体を測定した結果, 胎仔期に曝露されたラットでは IgE 抗体が上昇しやすいことを報告した<sup>1)</sup>.

花粉抗原に対する反応が強くみられた胎仔期に排出ガスを曝露されたラットは, 生後, 母仔ともに清浄空気下で飼育されているが, 妊娠中排出ガスに曝露されていた同一の母親の母乳で育成されている. 従って, 胎仔期において排出ガスに曝露されたラットは, 排出ガスを曝露されている母親の影響を子宮内にいる時期に受けるだけでなく, 生後

においても母乳を介して受けていることが考えられる.

出産後母仔を入れ替える実験は, 観察されたある形質が遺伝的要因によって決定されているか, 母胎内環境によって修飾をうけたのか, あるいは哺乳することで起こったのかを解析する有効な手段である<sup>2)</sup>.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の臼歯への作用<sup>3)</sup>, 行動様式の系統による違い<sup>4,5)</sup>等は胎仔の時期における母親からの影響が大きいこと, 鉛<sup>6)</sup>・PCBs<sup>7)</sup>・コルチコスレロイド<sup>8)</sup>・diethylstilbestrol(DES)<sup>9)</sup>.

2,2-dichloro-1,1,1-trifluoroethane (HCFC-123)<sup>10)</sup>等は母乳から哺乳期の動物に移行して毒性を発現すること, アルコールは胎仔の時期には胎内で, 哺乳期には母乳を介して

\* 東京都健康安全研究センター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

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\* \* 東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科

影響を及ぼす<sup>1)</sup>ことが報告されている。

本実験では、胎仔期に排出ガスを曝露されたラットの免疫機能への影響は子宮内にいる時期に起こるのか、あるいは生後母乳を介して起こるのかを明らかにすることを目的とした。このため、出産直後に曝露群と曝露されていない非曝露群の親と仔を取り替え、すなわち、胎仔期曝露の仔ラットを非曝露群の母乳で育て、非曝露群の仔ラットを曝露群の母乳で育て花粉感作に対する免疫反応をIgE抗体を測定することによって検討した。

### 実験方法

#### 曝露方法

ディーゼル排気ガスの曝露源として、排気量 309 cc の小型のディーゼルエンジン（ヤンマーディーゼルエンジン NFAD-50-EX）、燃料には軽油（JIS2 号相当、日本石油）を用い、回転数 2,600 rpm で運転した。その排気ガスを清浄空気で希釈し曝露チャンパー内に導入した。チャンパーの容量は 1.6 m<sup>3</sup>、換気回数は 15 回/時、換気容量は 405 L/min であった。全排気ガス曝露チャンパーには希釈したディーゼル排気ガスを導入した。除塵排気ガス曝露チャンパーには、希釈排気ガスをフィルター（超 ULPA、日本無機）に通し、0.05 μm 以上の粒子状成分を除去して導入した。対照群には活性炭層（SX、HC-6:ツルミコール）とヘパフィルターを通した清浄空気を導入した。

#### チャンパー内の粉塵濃度と二酸化窒素濃度

各チャンパー内の環境濃度は、粉塵濃度計（線式質量濃度計 BAM-102 型、SHIBATA）と、窒素酸化物測定器（9841 型 Monitor Lobs Co.）で常時モニターした。全排気ガス曝露(Total exhaust)、除塵曝露(Filtering exhaust)並びに対照(Control)のチャンパー内の曝露時間内平均粉塵濃度と二酸化窒素濃度を Table 1 に示した。

Table 1. Concentration of SPM and NO<sub>2</sub> in the Inhalation Chambers

	SPM (mg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (ppm)
Control	<0.01	0.02
Total exhaust	1.71	0.79
Filtered exhaust	<0.01	0.80

SPM: suspended particulate matters,  
NO<sub>2</sub>: nitrogen dioxide

#### 動物の曝露と免疫のスケジュール

妊娠 6 日目のラット(F344/DuCrj)を日本チャールスリバーから購入し、実験はこれらの妊娠ラット由来の仔ラット（雄）を用いて行った。実験群は、妊娠 7 日目から全排出ガス(Total exhaust)あるいは除塵排出ガス(Filtering exhaust)を曝露されていた母ラット由来で、生後は妊娠中並びに授乳中も清浄空気下で飼育されている母ラットの母乳で育てられた T C 群・F C 群、妊娠中に清浄空気下

で飼育されていた母ラット由来で、生後は妊娠中全排出ガスあるいは除塵排出ガスに曝露され授乳中は清浄空気下で飼育されている母ラットの母乳で育てられた C T 群・C F 群、並びに清浄空気下で飼育された母ラット由来で、妊娠中並びに授乳中とも清浄空気下で飼育されている母ラットの母乳で育てられた Control 群の 5 群である。各群 5 匹ずつの妊娠ラットを用いた。なお、F C 群では 5 匹中 2 匹が里仔を育てなかったため、F C 群と C F 群に各々 2 匹追加した。曝露時間は午前 10 時から午後 4 時まで 1 日 6 時間行い、曝露日数は 14 日間であった。Figure 1 に動物の処置方法と花粉感作の実験スケジュールを模式的に示した。

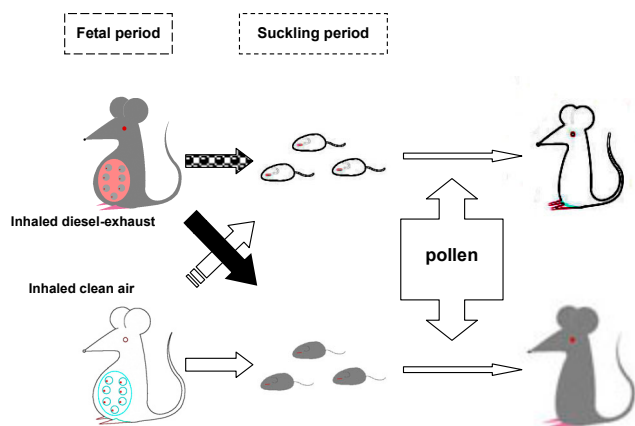


Figure 1. Experiment protocol

各群のラットは、温度 24 ± 2 °C、湿度 55 ± 5 % に維持されたチャンパー内で飼育した。飼料はラット用標準飼料を与えた(MF、オリエンタル酵母)。仔ラットは、出生直後に親と仔を入れ替えた後、生後 23 日目の離乳時まで里親ラットと共に飼育し、その後、同群の仔ラットを雌雄に分け、無作為に 1 ケージ当たり 6-8 匹収容して飼育した。生後 49 日目から 2 週間ごとに、スギ花粉を抗原として腹腔内投与した。花粉は一回につき粗抗原量として 5 mg を水酸化アルミゲル 4 mg (Pierce, USA) とともに炭酸水素ナトリウム水溶液 (0.125 M, 0.3 mL) に加え投与した。実験に使用した花粉粗抗原は、タンパク 100 μg につきスギ花粉の主要抗原である Cry j 1, Cry j 2 を各々 26.7 μg, 2.7 μg 含有していた。感作実験前と、3 回及び 4 回目感作の 5 日後にエーテル麻酔下にて全採血した。

#### P-K 反応によるスギ花粉に特異な IgE の測定

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。3 回あるいは 4 回花粉感作したラットから採取した血清を 2 倍段階希釈し、それぞれ 0.1 mL ずつ、日本チャールスリバーから購入した 9 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 0.5 μg の Cry j 1 と 0.25 μg の Cry j 2 (林原生物化学研究所)の混合液 0.02 mL を血清接種部位に皮内注射するとともに、0.5 % のエバンスブルー液を 1 mL 静注し、30

Table 2. Average Body, Spleen and Thymus Weight of Male Rats from each Group on Days 82 and 96

	82-day-old rats immunized three times						96-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)
Control	10	256.0 ± 7.8		561.1 ± 17.8		222.4 ± 16.2	10	267.9 ± 10.4		569.6 ± 34.6		211.4 ± 9.7
T→C	9	252.6 ± 12.8		586.6 ± 52.0		229.0 ± 16.7	8	273.6 ± 16.4		606.3 ± 17.4		200.0 ± 14.2
F→C	10	244.7 ± 17.9		529.2 ± 43.0		222.8 ± 18.5	9	266.3 ± 18.6		574.3 ± 39.9		194.5 ± 27.0
C→T	11	239.0 ± 7.7		550.3 ± 31.3		217.1 ± 19.8	10	260.4 ± 6.8		561.2 ± 21.2		182.2 ± 21.9
C→F	8	247.4 ± 17.3		545.0 ± 34.8		219.2 ± 22.5	8	263.1 ± 11.8		565.3 ± 17.1		198.5 ± 13.3

Values are expressed as mean ±SD.

\* Different from Control,  $p < 0.05$

分後に出現する青いスポットを皮膚の裏面から計測した。スポットの直径 5mm 以上のものを陽性とした。

## 結 果

### 体重・臓器重量

Table 2 に、生後 82, 96 日目における各群の仔ラットの体重、脾臓重量並びに胸腺重量を示した。体重、脾臓重量並びに胸腺重量はいずれの時期においても各群間に差はなく、出産直後に親仔を入れ替えたことの仔ラットの成長への影響はみられなかった。

### P-K 反応によるスギ花粉に特異な IgE 抗体価

Figure 2 にスギ花粉で 3 回あるいは 4 回感作した後に P-K 反応で測定した IgE 抗体価の幾何学的平均値を対数目盛で示した。花粉感作 3 回後の IgE 抗体価を比較すると、胎仔期に全排出ガスあるいは除塵排出ガスを曝露され、生後は清浄空気下で飼育された母ラットの母乳で育てられた

T→C, F→C 群の IgE 抗体価は、Control 群に比べ有意に高かった(各々  $P < 0.01$ , Table 3)。胎仔期には曝露されず、生後は妊娠中除塵排出ガスに曝露されていた母ラットの母乳で育てられた C→F 群の IgE 抗体価は Control 群より有意に低かった( $P < 0.05$ , Table 3)。また、胎仔期には曝露されず、生後は妊娠中全排出ガスに曝露されていた母ラットの母乳で育てられた C→T 群の IgE 抗体価は Control 群と同様であった(Table 3)。

4 回感作後における T→C, F→C 群の IgE 抗体価は、Control 群に比べ有意に高かった(各々  $P < 0.01$ , Table 3)。C→T, C→F 群の IgE 抗体価は Control 群と同様であった(Table 3)。

## 考 察

花粉に対する IgE 抗体は、胎仔期に全排ガス・除塵排ガスに曝露され、生後、妊娠中並びに授乳中も清浄空気下で

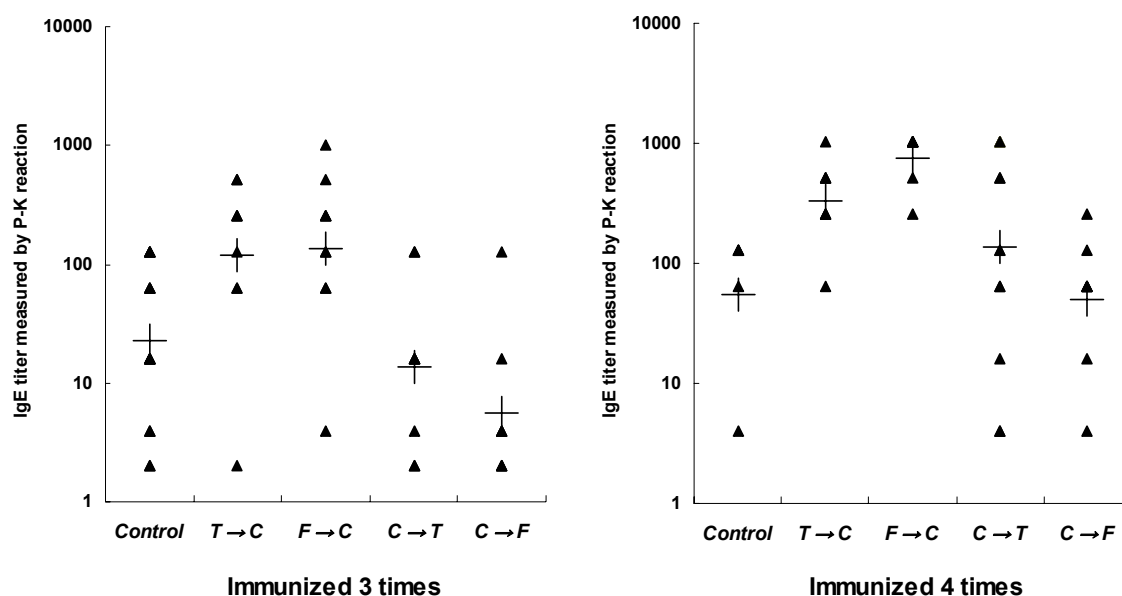


Figure 2. IgE Titer Measured by P-K Reaction after Immunized 3 and 4 Times

▲ IgE titers in the individual rat; + geometrical means of each group

Table 3. IgE Titers Measured by P-K Reaction against Pollen in Rats Immunized Three or Four Times

	Immunized three times			Immunized four times			
	(n)	log <sub>2</sub> P-K IgE titers		(n)	log <sub>2</sub> P-K IgE titers		
<i>Control</i>	10	4.5 ±	2.2	10	5.8 ±	2.2	
<i>T</i> → <i>C</i>	9	6.9 ±	2.5 **	8	8.4 ±	1.2	**
<i>F</i> → <i>C</i>	10	7.1 ±	2.2 **	9	9.6 ±	0.8	**
<i>C</i> → <i>T</i>	11	3.8 ±	2.2	10	7.1 ±	3.0	
<i>C</i> → <i>F</i>	8	2.5 ±	2.1 *	8	5.6 ±	1.8	

Values are expressed as mean.

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

飼育されていた母ラットの母乳で育てられた仔ラットで上昇した。一方、胎仔期は曝露されず、妊娠中に曝露されていた母ラットの母乳で育てられた仔ラットでは上がらなかった。このことから、排出ガス曝露が次世代の免疫機能に及ぼす影響は、曝露されている母親の子宮内にいる胎仔の時期に起こったことが明らかになった。また、花粉に対する IgE 抗体の産生は全排気ガス群、除塵群ともみられたことから、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 μm 以下の超微粒子によると考えられた。

ディーゼル排出ガスの胎仔期曝露によって生後の免疫機能の発現に影響を及ぼす可能性のあるものとして、排出ガスに直接曝露された母親の内分泌機能など体内環境の変化及び母親の体内に蓄積した排出ガス由来の有害物質の移行が考えられる。

母親の内分泌機能など体内環境の変化に関して、排出ガスに曝露された妊娠ラットではテストステロンの高濃度蓄積が起こることを報告した<sup>12)</sup>。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仔にも及び、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<sup>13-15)</sup>。また、胎児期における胸腺細胞の数が少ないと生後アレルゲンにさらされた場合 IgE の上昇を起しやすいたことが報告されている<sup>16)</sup>。これらのことから、母体の内分泌機能の変化は、胎盤を介して胎仔に影響を及ぼし胎仔の免疫機能の発達を妨げたため花粉に対する抗体の上昇を起しやすいたことが考えられた。

排出ガスに曝露された母親ラットに取り込まれた物質の胎仔への移行に関して多環芳香族炭化水素類(PAHs)を指標として検討した結果、排出ガス由来の PAHs が全排出ガス・除粒子群の胎仔に蓄積したことが示されている<sup>17)</sup>。また、ディーゼル排ガス中の PAHs を吸着した粒子状物質 (DEP) は免疫機能に影響を及ぼすことが報告されてい

る<sup>18-22)</sup>。PAHs の胸腺の分化形成段階に及ぼす影響については報告されておらず今後の検討課題と考えられる。あるいは、胎盤を介して胎仔に蓄積した PAHs が遅発的に免疫機能の発達に関与した可能性も考えられた。

母親ラットが吸入した排出ガス中の PAHs が母乳中にも移行したことが報告されているが<sup>23)</sup>、本実験の結果では免疫機能への母乳を介した影響はみられなかった。しかし、化学物質の作用機序と影響は曝露される動物の発達段階や臓器によって異なることから<sup>24,25)</sup>、母乳中に移行した PAHs の他の臓器や機能への影響を否定することはできないと考えられた。

#### 文 献

- 1) Watanabe, N., Osawa, M.: *BMC Pregnancy and Childbirth*, **2**, 2-7, 2002.
- 2) Kubisch, H.M., Gomez-Sanchez, E.P.: *Lab. Anim. Sci.*, **49**, 90-94, 1999.
- 3) Miettinen, H.M., Alaluusua, S., Tuomisto, J., et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **184**, 57-66, 2002.
- 4) Lucion, A.B., De Almeida, R.M. and De Marques, A.A.: *Physiol. Behav.*, **55**, 685-689, 1994.
- 5) Gomez-Serrano, M., Tonelli, L., Listwak, S., et al.: *Behav. Genet.*, **31**, 427-436, 2001.
- 6) Hallen, I.P., Jorhem, L. and Oskarsson, A.: *Arch. Toxicol.*, **69**, 596-602, 1995.
- 7) Crofton, K.M., Kodavanti, P.R., Derr-Yellin, E.C., et al.: *Toxicol. Sci.*, **57**, 131-140, 2000.
- 8) Brabham, T., Phelka, A., Zimmer, C., et al.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279**, R1899-1909, 2000.
- 9) Odum, J., Lefevre, P.A., Tinwell, H., Van Miller, J.P., et al.: *Toxicol. Sci.*, **68**, 147-163, 2002.
- 10) Buschmann, J., Bartsch, W., Dasenbrock, C., et al.: *Inhal. Toxicol.*, **13**, 671-687, 2001.
- 11) Murillo-Fuentes L, Artillo R, Carreras O., et al.: *Eur*

- J Nutr.*, **40**:147-154,2001.
- 12) Watanabe, N., Kurita, M.: *Environ. Health Perspect.*, **109**, 111-119, 2001.
- 13) Leposavic, G., Micic, M.: *Thymus*, **20**, 77-88, 1992.
- 14) Angervall, L., Lundin, P.M.: *Acta. Endocrinol.*, **50**, 104-114, 1965.
- 15) Screpanti, I., Morrone, S., Meco, D., *et al.*: *J. Immunol.*, **142**, 3378-3383, 1989.
- 16) Juto, P.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **66**, 402-407, 1980.
- 17) Tozuka, Y., Watanabe, N., Ohsawa, M., *et al.*: *J. Health Sci.*, **50**, 497-502, 2004.
- 18) Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **76**, 299-309,2003.
- 19) Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., *et al.*: *Arch. Toxicol.*, **77**, 335-343,2003.
- 20) Hirose, T., Morito, K., Kizu, R., *et al.*: *J. Health Sci.*, **47**, 552-558, 2001.
- 21) Kazuichi Hayakawa, Yu Onoda, Makiko Kamiya, Toshiharu Hirose, Akira Toriba, Ryoichi Kizu: **Structure-activity relationship for estrogenic/antiestrogenic activities of monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons**, The 5th Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disrupters Research (Hiroshima,Japan), 2002.
- 22) Safe S.: *Toxicol. Lett.*, **120**, 1-7, 2001.
- 23) Yoshiko Tozuka, Nobue Watanabe, Masanobu Ohsawa, Akira Toriba, Ryoichi Kizu, Kazuichi Hayakawa: **Polycyclic aromatic hydrocarbons in fetuses and breast milk from rat exposed to diesel exhaust during pregnancy and lactation**, Forum 2003: Pharmaceutical Health Science/Environmental Toxicology (Sendai, Japan), 2003.
- 24) Dietert, R.R., Etzel, R.A., Chen, D., *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **108** (suppl 3), 483-509, 2000.
- 25) Holladay, S.D., Smialowicz, R.J.: *Environ. Health Perspect.*, **108** (suppl 3): 463-473, 2000.