

—総説—

有機塩素系溶剤によるアレルギー反応増悪化に関する研究

瀬尾誠^{1,2}、永瀬久光¹

要約：アレルギー疾患発症・重症化の要因として、ディーゼル排気ガス粒子やホルムアルデヒドなど様々な環境因子の関与が報告されている。本研究では、大気および水質汚染物質である有機塩素系溶剤の中でもトリクロロエチレン (TCE) およびテトラクロロエチレン (PCE) が、肥満細胞からのヒスタミン遊離および炎症性サイトカイン産生を顕著に亢進することを見出した。また水道水質基準レベルの TCE および PCE をラットに飲水摂取させたところ、肥満細胞のヒスタミン遊離反応亢進と血管周辺への局所的集積を介して I 型アレルギー反応を亢進すると考えられた。また、両化合物は肥満細胞や単核球からの IL-4 や TNF- α 産生を亢進して後期炎症反応の惹起を助長し、さらに Th1/Th2 サイトカインバランスを Th2 側に偏らせることで、アレルギー反応を亢進させているものと考えられた。本研究で得られた知見は、地下水汚染物質として問題となっている有機塩素系溶剤の水道水質基準レベルの摂取がアレルギー反応増悪化・重症化に関与することを示唆するもので、水質管理における衛生学的な見地からも意義深いものである。

索引用語：トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、肥満細胞、ヒスタミン遊離、Th1/Th2 サイトカインバランス

Enhancing Effect of Chlorinated Organic Solvents on Allergic Reactions

Makoto SEO^{1,2}, Hisamitsu NAGASE¹

Abstract: Many reports show that various environmental pollutants, such as diesel exhaust particles and formaldehyde, are closely related to increases in allergic diseases. In this study, it was found that certain chlorinated organic solvents, in particular trichloroethylene (TCE) and tetrachloroethylene (PCE), which are major air and water pollutants, significantly enhanced histamine release and inflammatory cytokine production from antigen-stimulated mast cells. TCE and/or PCE ingestion from drinking water increased the accumulation of mast cells around the vessel in the skin and histamine release from peritoneal mast cells. These results suggest that low concentration of TCE and PCE leads to acceleration of Type I allergic reaction. TCE and PCE showed increased interleukin (IL)-4 and tumor necrosis factor (TNF)- α production from mast cells and leukocytes which promoted initiation of late-inflammatory responses. TCE and PCE ingestion from drinking water also increased IL-4 production and decreased IFN- γ production. These results suggested that TCE and PCE ingestion aggravate allergic responses via Th1/Th2 cytokine imbalance. Our results suggested that the low concentrations of chlorinated organic solvents, even at Japanese government environmental standards for water and Japanese government drinking water quality guidelines, lead to the initiation and aggravation of allergic reactions. These significant findings are important in hygienic water quality management.

Keyphrases: trichloroethylene, tetrachloroethylene, mast cells, histamine release, Th1/Th2 cytokine balance

¹ 岐阜薬科大学衛生学研究室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東5丁目6-1)

Laboratory of Hygienics, Gifu Pharmaceutical University (5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

² 埼玉医科大学医学部生化学研究室 (〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38)

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Saitama Medical University (38 Morohongo, Moroyama, Irumagun, Saitama 350-0495, JAPAN)

1. 緒言

昭和 56 年 7 月より、近年、喘息や花粉症などアレルギー疾患罹患率は増加の一途をたどっており、大きな社会問題となっている。特に過去 30 年間に於いて、我が国を含む先進諸国でのアレルギー疾患の増加は著しく¹⁻³⁾、世界人口の約 1/4 の人が何らかのアレルギー疾患に罹患していると推測されている。このように増加の一途をたどっているアレルギー疾患に関しての原因・病態の解明、またそれらに基づく予防法や治療法の確立を目指した研究が精力的に行われている。

2003 年にヒトゲノムの全塩基配列が解読されてから、数多くのアレルギー関連遺伝子と一塩基多型によるアレルギー疾患との関連性について報告がなされている^{4,5)}。一方で、アレルギー疾患は生活様式などの環境要因と複数の遺伝子要因が複雑に絡み合っており、近年の急速なアレルギー疾患増加の原因は、遺伝子変異の増加の可能性だけでは考えにくく、遺伝的因子を修飾する環境因子への曝露やライフスタイルの変化によるものと考えられている。現在、我々の周りには人工の化学物質が溢れており、それらは少なからず我々の身体に何らかの影響を与えると考えられる。アレルギーの直接的な原因物質ではないが、アレルギーの感作、発症に大きな影響を与えているとされる環境物質として、二酸化窒素、二酸化硫黄、オゾン、ディーゼル排気微粒子 (diesel exhaust particles; DEPs)、有機リン系殺虫剤や可塑剤などが挙げられる。これらの環境化学物質は、抗原特異的 IgE 抗体産生増強作用があるとの報告があり、中でも DEPs は IgG 抗体産生増強作用や好酸球性活性化による気道炎症増悪作用を示すとの報告もあり、環境化学物質による免疫毒性やアレルギー疾患との関連が注目されるようになった⁶⁻⁹⁾。

1970 年代に トリクロロエチレン (TCE) など揮発性有機化合物 (volatile organic compounds; VOCs) による地下水汚染が明らかになり、大きな社会問題となっている。VOCs は難分解性で土壌に吸着されにくいいため容易に浸透し、地下水の流れによって広範囲に汚染が広がる。また VOCs は比重が大きく、水よりも動粘度係数が小さい物性を持つため土壌中深部にまで汚染が広がることもある。更に水に僅かながら溶解するため、地下水から井戸水など飲料水への混入が危惧される。2007 年の環境省 水・大気環境局が発表した平成 18 年度地下水質測定結果によると、地下水汚染判明事例は 3941 件、そのうち環境基準超過事例が 1978 件となっている。VOCs に関しては、超過事例の多い順に テトラクロロエチレン (PCE) 537 件、TCE 260 件、シス-1,2-ジクロロエチレン 152 件となっている¹⁰⁾。有機塩素系溶剤である TCE や PCE は、洗浄力が強く不燃性であるため安全な洗浄剤として、半導体

や電気工場、クリーニング工場などで大量に使われた後、適切に管理されることもなく廃棄されてきた。後に TCE や PCE の発癌性および生殖毒性などが明らかとなり、それらの土壌中への残留が問題となっている¹¹⁻¹³⁾。このように VOCs に我々が曝露される機会は非常に多いと考えられるのであるが、それらが免疫毒性やアレルギー疾患におよぼす影響に関する検討はほとんど行われていない。

そこで本総説では、有機塩素系溶剤が、抗原抗体反応を惹起した肥満細胞からのヒスタミン遊離および炎症性サイトカイン産生と受動皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis; PCA) 反応に対する影響を検討した。次に増強作用が認められた有機塩素系溶剤については、我が国の水道水質基準値を基にして、ラットに低濃度飲水投与を行った際の PCA 反応増強作用を検討し、さらにその増強作用機構の解明を試みた成績について述べる。

2. 肥満細胞からのヒスタミン遊離を増強する有機塩素系溶剤のスクリーニング

I 型アレルギー反応は、IgE 感作肥満細胞が IgE 特異的抗原によって刺激されることが引き金となる。つまり Fc ϵ RI に結合した IgE を抗原が架橋することにより、細胞内 Ca²⁺ が増加して脱顆粒が起こり、ヒスタミン・セロトニンなどの化学伝達物質が放出される。これにより I 型アレルギー反応に典型的な炎症反応が惹起される。

そこで、特に我々が曝露を受ける可能性が高いと考えられる有機塩素系溶剤から TCE、PCE、1,1,1-トリクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルム、ジクロロメタンの 6 種類を選び、IgE 感作肥満細胞からのヒスタミン遊離増強作用を有する有機塩素系溶剤のスクリーニングを行うために、ラットより回収した腹腔内浸出細胞を精製した肥満細胞 (purified peritoneal mast cells; PMCs) を用い、ヒスタミン遊離試験を行った。

PMCs の調製^{14,15)}: Wistar ラット (雄性, 8~10 週齢) にラット抗 dinitrophenol モノクローナル IgE 抗体 (抗 DNP-IgE) を腹腔内投与して肥満細胞を受動感作した。48 時間後、腹腔内洗浄液を回収し、遠心分離して得た腹腔内浸出細胞を 60 % percoll に重層して遠心分離して PMCs を精製した (純度は約 90 %)。

ヒスタミン遊離試験¹⁶⁾: PMCs (1~3 \times 10⁵ cells/mL) に各濃度の試験化合物溶液を添加してプレインキュベート (10 分間, 37 °C) した後、1 μ g/mL の 3,4-dinitrophenol-bovine serum albumin complex (DNP-BSA) を添加して抗原抗体反応を惹起した (15 分間, 37 °C)。別に、12 % 過塩素酸を添加し、3 分間超音波処理することで細胞内の全ヒスタミンを遊離させたものをポジティブコントロールとした。抗原抗体反応惹起後、遠心分離して得た上清中のヒスタミン量を *o*-フタルアルデヒドによる蛍光測定法⁹⁾

(励起波長 360nm, 測定波長 450 nm) により測定した。

それぞれの化合物のヒスタミン遊離増強率は、試験化合物非添加時のヒスタミン遊離率に対する試験化合物添加時のヒスタミン遊離率より算出して評価した。

抗 DNP-IgE で感作した PMCs を抗原刺激した際のヒスタミン遊離に対する 6 種類の有機塩素系溶剤の影響を検討した結果の一覧を Table 1 に示した。すべての有機塩素系溶剤において、0.1~10 mg/L の低濃度溶液でヒスタミン遊離増強作用が認められ、特に TCE は 1 mg/L において 2.0 倍、PCE も 0.1 mg/L において 1.8 倍といった顕著なヒスタミン遊離増強作用が認められた。

Table 1 Effect of 6 chlorinated organic solvents on histamine release from antigen-stimulated PMCs

Chlorinated organic solvent	Concentration ^a (mg/L)			Enhancing ratio
tetrachloroethylene (PCE)	0.1	1	10	1.8 *
trichloroethylene (TCE)	0.1	1	10	2.0 *
1,1,1-trichloroethane	0.1	1	10	1.6
1,2-dichloroethane	0.1	1	10	1.4
dichloromethane	0.1	1	10	1.2
chloroform	0.1	1	10	1.5

^a The colored concentrations are the most effective concentrations; the enhancing ratio was calculated that concentration.

* p<0.05 vs. the antigen-stimulated control (each chlorinated organic solvents conc. 0 mg/L)

また全ての有機塩素系溶剤の試験濃度範囲において、抗原刺激を行わなかった際には、ヒスタミン遊離は認められなかった。よって、これらの有機塩素系溶剤によるヒスタミン遊離増強作用は、これらの化合物が抗原抗体反応惹起から脱顆粒に至るまでの肥満細胞活性化シグナル伝達経路に関与することが示唆された。

3. TCE および PCE によるヒスタミン遊離および炎症性サイトカイン産生増強作用

前項では、TCE および PCE が抗原抗体反応を惹起した PMCs からのヒスタミン遊離を著しく増強することを見出した。そこで本項では、より生体内に近い細胞組成においての TCE および PCE によるヒスタミン遊離増強作用を検討するために、ラット腹腔内浸出細胞の未精製細胞群 (non-purified peritoneal mast cells: NPMCs) を用いたヒスタミン遊離試験を行った。

また生体内の肥満細胞は、粘膜型肥満細胞 (mucosal mast cells: MMCs) と結合組織型肥満細胞 (connective tissue mast cells: CTMCs) の 2 種類に分類され、性質および反応性も異なることが知られている。そこで MMCs に分類される RBL-2H3 細胞を用い、抗原抗体反応を介したヒスタミン遊離に対する TCE および PCE の影響を検討した。

NPMCs を用いたヒスタミン遊離試験: 前項の方法に準じて、Wistar ラットを受動感作して得た腹腔内洗浄液を遠心分離して得た腹腔内浸出細胞を NPMCs として用いた。ヒスタミン遊離および測定・評価に関しても、前項と同様の方法に準じて行った。

TCE および PCE はいずれも用量依存的なヒスタミン遊離増強作用を示した (Figure 1)。TCE は 0.1、1 mg/L において約 1.5~1.7 倍、PCE は 0.1 mg/L において約 1.5 倍の増強率を示した。

NPMCs は、好酸球、好塩基球やマクロファージなどを含むヘテロな細胞集団であり、その中の肥満細胞の割合はごく僅かである。NPMCs が前項の PMCs と同程度のヒスタミン遊離率を示したのは、TCE および PCE が肥満細胞以外の好酸球や好中球などの炎症性細胞に作用して間接的にヒスタミン遊離増強に働きかけている可能性がある。

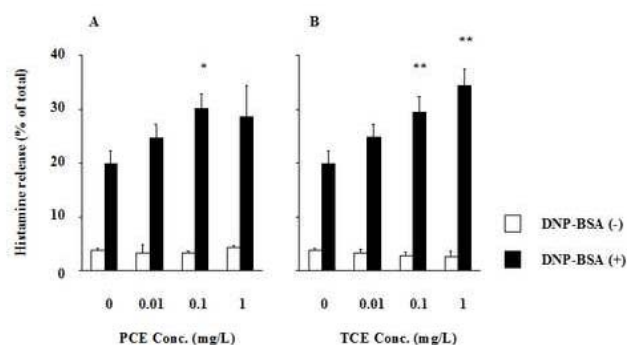


Figure 1. Effect of PCE (A) and TCE (B) on antigen-induced histamine release from NPMC.

Data are expressed as the mean ± SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. the antigen-stimulated control (PCE or TCE conc. 0 mg/L).

RBL-2H3 細胞を用いたヒスタミン遊離試験および炎症性サイトカイン測定: RBL-2H3 細胞は好塩基球であるが、FcεRI を持つため、肥満細胞と同様に脱顆粒してヒスタミンを放出する^{17,18)}。RBL-2H3 (JCRB; cell number, JCRB0023) 細胞を 24 well プレートに播種 (1×10⁵ cells/well) して一晩プレインキュベート後、抗 DNP-IgE を添加して受動感作した。TCE または PCE 溶液を添加した後、100 μg/mL DNP-BSA を添加して抗原抗体反応を惹起した (30 分間, 37 °C)。抗原抗体反応惹起後、遠心分離して得た上清中のヒスタミン量を測定した。

PCE は用量依存的なヒスタミン遊離増強作用を示し、特に 0.1、1 mg/L で約 2.1 倍の増強率を示した。一方、TCE は 1 mg/L で約 1.5 倍の増強率を示した (Figure 2)。

抗原抗体反応を惹起した肥満細胞は、ヒスタミンの他にも様々な炎症性サイトカインを放出することが報告されている。中でも interleukin (IL)-3、IL-4 は B 細胞の IgE 産生を促進し、IL-5、IL-8、IL-9、IL-13、

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、tumor necrosis factor (TNF)- α は、好酸球などの炎症性細胞の遊走や活性化など後期炎症反応発現に重要な役割を果たしている¹⁹⁻²¹⁾。よって、肥満細胞からの炎症性サイトカイン産生に対する TCE および PCE の影響を併せて評価することも重要である。そこで、抗原抗体反応を惹起した RBL-2H3 細胞からの IL-4 および TNF- α 産生に対する TCE および PCE の影響を検討した。

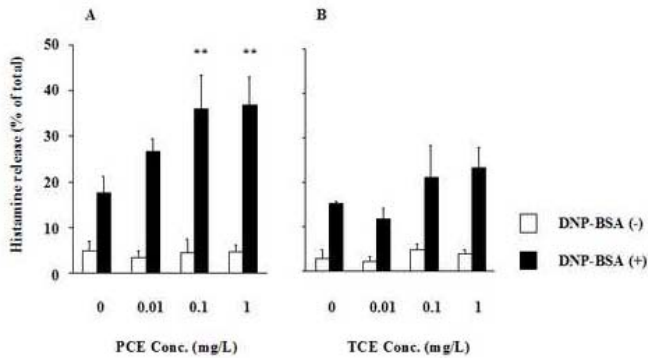


Figure 2. Effect of PCE (A) and TCE (B) on ant igen-induced histamine release from RBL-2H3.

Data are expressed as the mean \pm SEM. ** P <0.01 vs. the antigen-stimulated control (PCE or TCE conc. 0 mg/L).

炎症性サイトカインを測定・定量するために、RBL-2H3 を 35 mm ディッシュに播種 (1×10^7 cells/dish) して一晩プレインキュベート後、抗 DNP-IgE を添加して、受動感作した。TCE または PCE を添加するのと同時に 10 μ g/mL DNP-BSA を添加して抗原抗体反応を惹起した。一定時間後 total RNA を抽出した後、逆転写反応を行って cDNA を合成し、SyberGreen 蛍光検出による Real-Time PCR を行った。本検討に用いた IL-4、TNF- α 、および β -actin の各プライマーは以下のものを用いた。

IL-4:	forward primer	5'-ggaaactctgtagaggtgcagc-3'
	reverse primer	5'-aagtgcaggactcaagtatttc-3'
TNF- α :	forward primer	5'-gcagatgggctgtacctatcta-3'
	reverse primer	5'-gactttctcctggtatgaatgg-3'
β -actin:	forward primer	5'-caagtactctgtgtgattggtg-3'
	reverse primer	5'-ctcagtaacagtcgcctagaag-3'

各 mRNA 発現量は iCycler iQ Real-Time Detection System Software ver.3.0 (BioRad) にて相対検量線法により数値化し、 β -actin との相対比を算出して評価した。

TCE および PCE はいずれも用量依存的な IL-4 および TNF- α mRNA 発現を亢進した (Figure 3)。PCE は、抗原抗体反応惹起したのみの場合と比して IL-4 では約 2.4 倍、TNF- α では約 1.6 倍 (いずれも 1 mg/L PCE) の発現亢進が認められた。また TCE では、IL-4 で約 3.6 倍、TNF- α では約 1.6 倍 (いずれも 3 mg/L TCE) の発現

亢進が認められた。

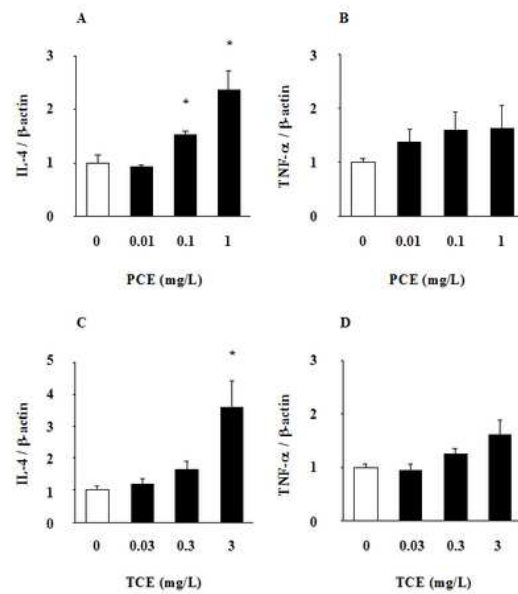


Figure 3. Effect of PCE or TCE on ant igen-induced IL-4 and TNF- α mRNA expression in RBL-2H3 cells.

IL-4 (A, C) and TNF- α (B, D) mRNA expression levels are shown as the ratio to β -actin mRNA expression. The ratio of the antigen-stimulated control is set to 1.0. Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance, * P <0.05 vs. the antigen-stimulated control (PCE or TCE conc. 0 mg/L).

また上記と同様にして、TCE および PCE 処理および抗原抗体反応惹起した RBL-2H3 を 12 時間インキュベーションした後、培養上清中および細胞溶解液中の IL-4 および TNF- α を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。

TCE 処理により、IL-4 産生は培養上清中および細胞溶解液でいずれも用量依存的に有意な上昇を示し、特に 3 mg/L TCE により抗原抗体反応を惹起しただけの場合に比して 2 倍以上の IL-4 産生が認められた (Figure 4A)。また TNF- α 産生も、0.3 mg/L TCE により抗原抗体反応を惹起しただけの場合に比して、培養上清中および細胞内で約 1.5~1.7 倍の有意な上昇を示した (Figure 4B)。

また、PCE に関しても IL-4 および TNF- α 産生が、培養上清中および細胞内においていずれも用量依存的な上昇を示し、1 mg/L PCE により両サイトカインともに有意な上昇を示した。IL-4 産生は、PCE により抗原抗体反応を惹起したのみの場合と比して培養上清中では約 7.7 倍、細胞内では約 1.5 倍の上昇を示した (Figure 5A)。また TNF- α 産生は、PCE により抗原抗体反応を惹起したのみの場合と比して培養上清中および細胞内ではいずれも約 1.5 倍の上昇を示した (Figure 5B)。

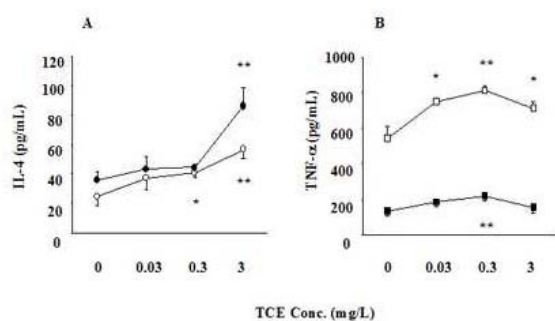


Figure 4. Effect of TCE on IL-4 (A) and TNF-α (B) production of antigen-stimulated RBL-2H3 cells.

IL-4 production in the conditioned medium (opened circle) and in the cell lysate (closed circle), and TNF-α production in the conditioned medium (opened square) and in the cell lysate (closed square) were examined. Data are expressed as the mean ± SEM. Statistical significance, *P<0.05, **P<0.01 vs. the antigen-stimulated control (TCE conc. 0 mg/L).

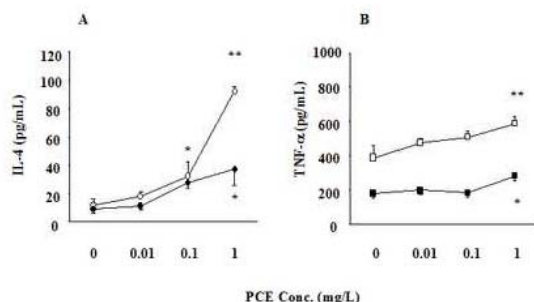


Figure 5. Effect of PCE on IL-4 and TNF-α production of antigen-stimulated RBL-2H3 cells.

IL-4 production in conditioned medium (opened circle) and in the cell lysate (closed circle), and TNF-α production in conditioned medium (opened square) and in the cell lysate (closed square) were examined. Data are expressed as the mean ± SEM. Statistical significance, *P<0.05, **P<0.01 vs. the antigen-stimulated control (PCE conc. 0 mg/L).

抗原抗体反応を惹起した肥満細胞は IL-4 を産生するのであるが、この IL-4 は、抗原で活性化された B 細胞の分化・成熟を誘導し、IgE 産生を亢進する。さらに IL-4 には FcεRI 発現増強作用もある^{22,23)} ため、肥満細胞の抗原に対する感受性が亢進して、アレルギー性炎症の増悪サイクルの形成という悪循環をもたらすことも考えられる。

PCA 反応： TCE および PCE が *in vivo* においても I 型アレルギー反応を増強することを評価することも必要であると考えたので、PCA 反応を行った。Wistar ラット (雄性, 8~10 週齢) に抗 DNP-IgE 希釈溶液を皮下投与して受動感作した。続いて 0.01~1 mg/kg body weight の TCE または PCE を腹腔内投与した。受動感作から 48 時間後に 1 mg/mL DNP-BSA-エバンスブルー溶液を尾静脈投与して抗原抗体反応を惹起した。30 分後に色素の漏出した皮膚を剥離した。皮膚片からのエバンスブルー色素

抽出は Katayama らの方法²⁴⁾ に従った。皮膚片を 1 M KOH 中で一晩インキュベートした後、0.6 N H₃PO₄:アセトン = 5 : 13 溶液でエバンスブルー色素を抽出し、遠心分離して得た上清の吸光度 (620 nm) を測定した。

PCE は PCA 反応の増強傾向を示し (Figure 6A)、TCE は用量依存的に有意な PCA 反応増強作用を示した (Figure 6B)。この増強反応は、前述してきた *in vitro* での各肥満細胞からのヒスタミン遊離増強作用とも相関性があることから、TCE および PCE が *in vivo* においても I 型アレルギー反応に対して増強作用を持つことが明らかとなった。

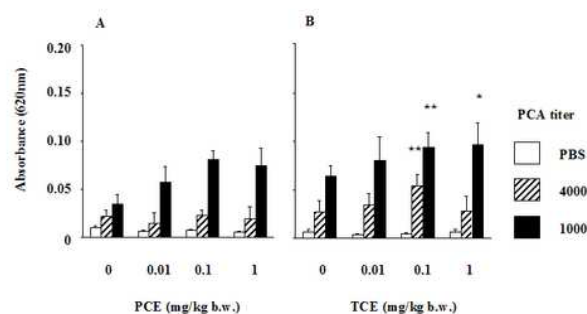


Figure 6. Effect of PCE (A) or TCE (B) treatment on PCA reaction. Two separate experiments were executed (n=3). Data are expressed as the mean ± SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. antigen-stimulated control (PCE or TCE 0 mg/kg b.w.).

本項では、抗原抗体反応惹起に伴い誘導される IL-4 や TNF-α といった炎症性サイトカイン産生が、TCE および PCE 処理により有意に上昇することを明らかにした。抗原抗体反応による肥満細胞からのケミカルメディエーター放出と炎症性サイトカイン産生は、FcεRI からの活性シグナルが共通した引き金となっている。FcεRI が IgE/抗原と会合すると、FcεRI の凝集が起こり Syk や Lyn などのチロシンリン酸化酵素が活性化し、下流のホスホリパーゼ C-γ、イノシトール三リン酸などのカスケードの活性が誘導される結果、細胞内 Ca²⁺ が上昇して活性化した肥満細胞は、脱顆粒やサイトカイン遺伝子の発現が誘導される^{25), 26)}。TCE および PCE ともにヒスタミン遊離と炎症性サイトカイン産生をいずれも上昇させたことから、両シグナル伝達の共通経路である細胞内 Ca²⁺ 上昇に到るまでの何らかのカスケードの活性化上昇に関与している可能性がある。

4. TCE および PCE 飲水投与による I 型アレルギー反応増強作用

TCE および PCE のヒトに対する主要な曝露経路は、吸入曝露、経皮吸収や飲料水からの摂取である。特に TCE および PCE は、地下水や土壌の汚染が広範囲に検出されている^{27,28)}。また TCE および PCE に汚染された地下水

や土壌から井戸水などへの混入により、ヒトが長期的に摂取する危険性がある。そこで本章では、地下水質測定結果において、環境基準値を超えている件数が多い TCE および PCE について、それらの低濃度溶液をラットに飲水投与した際の、I 型アレルギー反応に対する影響を PCA 反応により検討し、さらにその作用機序について組織学的・免疫学的な解明を試みた。

TCE および PCE 飲水投与：低濃度飲水溶液とした 0.03 mg/L TCE 溶液および 0.01 mg/L PCE 溶液は、現在我が国での水道水質基準値に設定されている濃度であり、World Health Organization (WHO) が定めた飲料水質におけるガイドライン²⁹⁾ とほぼ同等の濃度 (TCE; 0.07 mg/L, PCE; 0.04 mg/L) である。また、高濃度飲水溶液とした 3 mg/L TCE 溶液および 1 mg/L PCE 溶液は、地下水および土壌汚染地域より検出される濃度³⁰⁻³²⁾ である。

PCA 反応：Wistar ラット (雄性, 飲水開始時 8 週齢) に TCE または PCE の低濃度または高濃度飲水溶液を 2 週間または 4 週間飲水投与した。各飲水投与期間終了日の 48 時間前に抗 DNP-IgE を皮内投与して受動感作した。飲水投与期間終了日の PCA 反応の惹起および色素抽出・測定は、前項の方法に準じて行った。

TCE 飲水投与により、PCA 反応の用量および飲水期間依存的な反応増強が認められた。特に 4 週間の飲水投与により、0.03 mg/L TCE 飲水群では、蒸留水飲水群と比して約 1.2 倍の増強率を示し、3 mg/L TCE 飲水群では、蒸留水飲水群と比して約 1.4~1.8 倍の増強率を示した (Figure 7)。

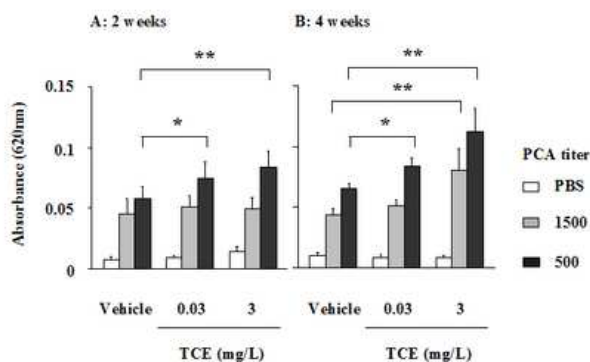


Figure 7. Effect of treatment with TCE in drinking water for 2 or 4 weeks on PCA reaction.

Before 48 hours of the end of treatment for 2 weeks (A) or 4 weeks (B). Data are expressed as the mean \pm SEM. * P <0.05, ** P <0.01 vs. vehicle.

また、2 週間の PCE 飲水投与においては、PCA 反応のわずかな増強傾向が認められただけであったが、4 週間の PCE 飲水投与においては、蒸留水飲水群に比して、1 mg/L PCE 飲水群では約 1.3~1.5 倍の PCA 反応増強率を示した (Figure 8)。

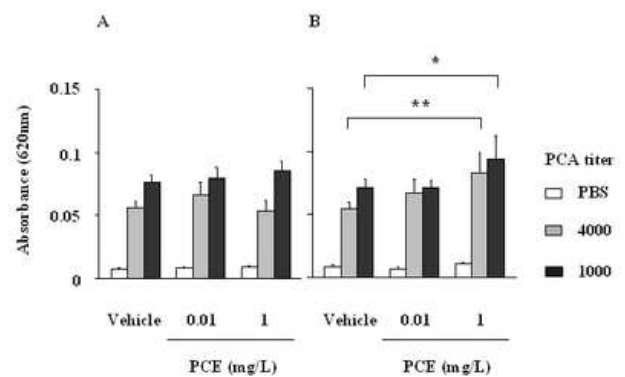


Figure 8. Effect of treatment of PCE in drinking water for 2 or 4 weeks on PCA reaction.

Before 48 hours of the end of treatment for 2 weeks (A) or 4 weeks (B). Data are expressed as the mean \pm SEM. * P <0.05, ** P <0.01 vs. vehicle.

PCE 飲水後の肥満細胞を用いたヒスタミン遊離試験：2 週間の PCE 飲水投与終了 48 時間前に、抗 DNP-IgE をラットに腹腔内投与して受動感作した。飲水投与終了日に、前項の方法に準じて PMCs と NPMCs を調製後、抗原抗体反応を惹起し、ヒスタミン遊離量の測定・評価を行った。

NPMCs および PMCs とともに 1 mg/L PCE 飲水群においてヒスタミン遊離増強作用が認められ、それらの増強率は NPMCs および PMCs とともに約 1.3 倍の有意な増強を示した (Figure 9)。

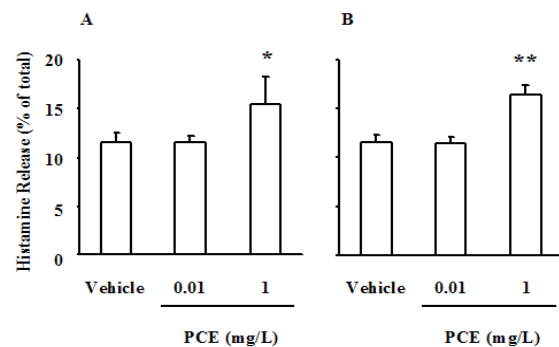


Figure 9. Effect of PCE in drinking water for 2 weeks on histamine release from antigen-stimulated NPMCs (A) and PMCs (B).

The percent of histamine release was calculated as the ratio of fluorescence intensity of a test sample to that of total histamine. Data are expressed as the mean \pm SEM. * P <0.05, ** P <0.01 vs. vehicle.

皮膚組織および免疫担当器官の病理組織学的検討：2 週間の TCE または PCE 飲水投与を行ったラットより皮膚組織を、また 4 週間の TCE および PCE 飲水投与を行ったラットより免疫担当器官として脾臓および腸間膜リンパ節を採取して湿重量を測定後、ホルマリン固定して薄切標本を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色後、単位面積あたりの単核球数を計測した。また別にアルシアンブルー染色後、微小毛細血管本数あたりの肥満細胞数を計測した。脾臓および腸間膜リンパ節の薄切標本

も H&E 染色して組織学的形態変化を観察した。

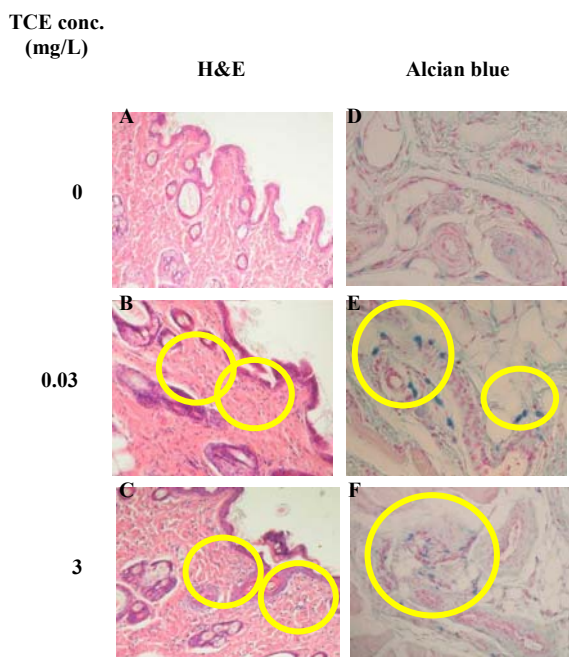


Figure 10. Histological changes in the skin of rats treated with TCE in drinking water for 2 weeks.

Vehicle (0 mg/L TCE; A, D), 0.03 mg/L TCE in drinking water (B, E) or 3 mg/L TCE in drinking water (C, F) was shown with hematoxylin-eosin (H&E) staining (A-C) or Alcian blue staining (D-F).

Table 4 Cellular profile in skin lesions after TCE ingestion from drinking water

TCE conc. (mg/L)	Mononuclear cells ($\times 10^3$ cells/mm ²)	Mast cells (cells/blood vessel)
0	1.02 \pm 0.13	0.74 \pm 0.19
0.03	1.66 \pm 0.27**	1.04 \pm 0.08**
3	1.96 \pm 0.28**	1.30 \pm 0.12**

** p<0.01 vs. vehicle (0 mg/L TCE).

真皮中への単核球の浸潤は、蒸留水飲水群 (Figure 10A) に比して、TCE 飲水群 (Figure 10B, 10C) で用量依存的な浸潤細胞数の増加が認められた。単位面積あたりの単核球細胞数は、蒸留水飲水群に比して、0.03 mg/L TCE 飲水群では約 1.7 倍、3 mg/L TCE 飲水群では約 2.0 倍の細胞数の増加が認められた (Table 4)。また、アルシアンブルー染色像において、微小毛細血管周辺の肥満細胞を観察したところ、蒸留水飲水群 (Figure 10D) に比して、TCE 飲水群 (Figure 10E, 10F) では、用量依存的な細胞数増加が認められた。微小毛細血管本数あたりの肥満細胞数を計測したところ、蒸留水飲水群に比して、0.03 mg/L TCE 飲水群では約 1.3 倍、3 mg/L TCE 飲水群では約 1.7 倍の細胞数の増加が認められた (Table 4)。

同様に 2 週間の PCE 飲水投与後、真皮中への単核球の浸潤を観察したところ、蒸留水飲水群 (Figure 11A) に比して、PCE 飲水群 (Figure 11B, 11C) では顕著な単核球の浸潤が認められ、0.01 mg/L PCE 飲水群、1 mg/L

PCE 飲水群ともに約 1.2 倍の細胞数の増加が認められた (Table 5)。またアルシアンブルー染色像においても TCE 同様、蒸留水飲水群 (Figure 11D) に比して、PCE 飲水群 (Figure 11E, 11F) では、血管周辺の肥満細胞の顕著な増加が認められ、肥満細胞数も、蒸留水飲水群に比して、0.01 mg/L PCE 飲水群、1 mg/L PCE 飲水群ともに約 2.2 ~ 2.3 倍の細胞数の増加が認められた (Table 5)。

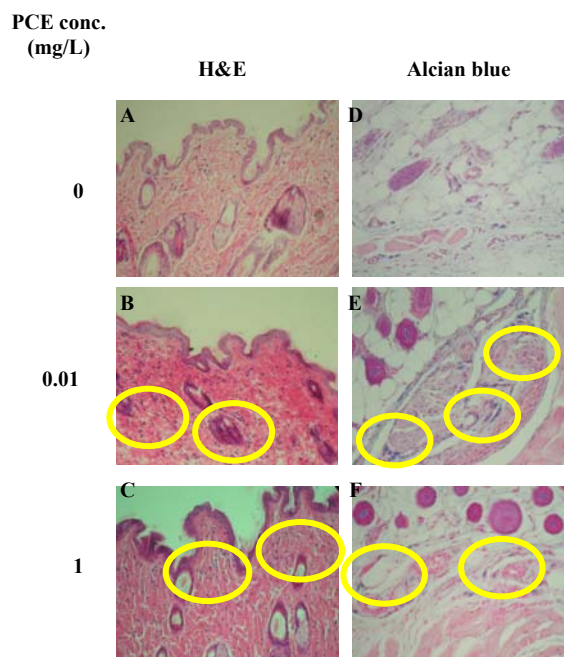


Figure 11. Histological changes in the skin of rats treated with PCE in drinking water for 2 weeks.

Vehicle (0 mg/L PCE; A, D), 0.01 mg/L PCE in drinking water (B, E) or 1 mg/L PCE in drinking water (C, F) was shown with hematoxylin-eosin (H&E) staining (A-C) or Alcian blue staining (D-F).

Table 5 Cellular profile in skin lesions after PCE ingestion from drinking water

PCE conc. (mg/L)	Mononuclear cells ($\times 10^3$ cells/mm ²)	Mast cells (cells/blood vessel)
0	0.90 \pm 0.14	0.75 \pm 0.14
0.01	1.12 \pm 0.21**	1.67 \pm 0.40**
1	1.11 \pm 0.21**	1.69 \pm 0.36**

** p<0.01 vs. vehicle (0 mg/L PCE).

4 週間の TCE 飲水投与後の脾臓に関しては、いずれの群間においても湿重量および組織学的変化は認められなかった。一方、腸間膜リンパ節においては、蒸留水飲水群に比して TCE 飲水群のリンパ節自体の数およびサイズの増加が認められ、湿重量の増加が認められた (Figure 12A)。また H&E 染色した組織像においては、蒸留水飲水群 (Figure 12B) に比して、TCE 飲水群ではリンパ小節の数およびサイズの増加と胚中心の明瞭化が認められた (Figure 12C, 12D)。

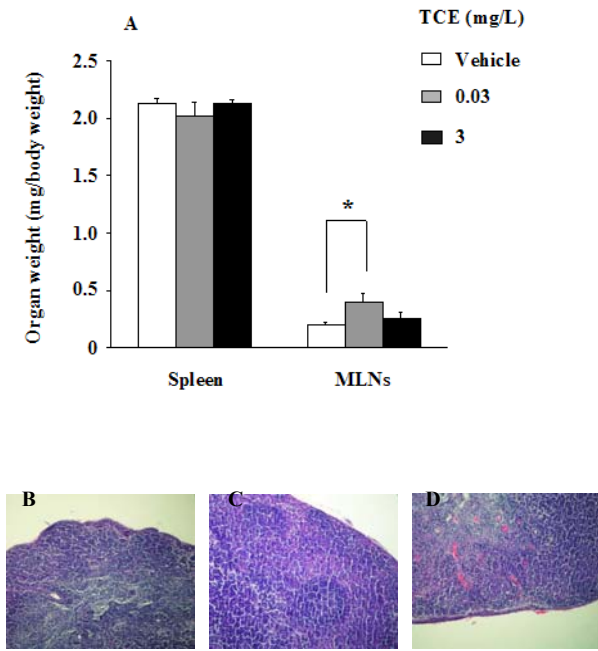


Figure 12. Histological changes in MLNs treated with TCE in drinking water for 4 weeks.

We evaluated the wet weight of tissues (A). MLNs of the vehicle (B), 0.03 mg/L TCE in drinking water (C) or 3 mg/L TCE (D) are shown with H&E staining.

また 4 週間の PCE 飲水投与後に採取した脾臓、胸腺、頸部リンパ節および腸間膜リンパ節の臓器湿重量と、腸間膜リンパ節の H&E 染色した組織像を Figure 13 に示す。

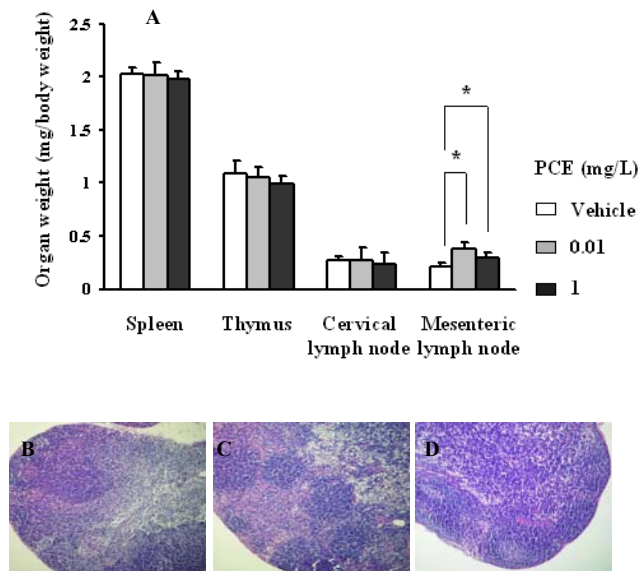


Figure 13. Histological changes in MLNs treated with PCE in drinking water for 4 weeks.

We evaluated the wet weight of tissues (A). Mesenteric lymph nodes of the vehicle (B), 0.01 mg/L PCE in drinking water (C) or 1 mg/L PCE (D) are shown with H&E staining.

脾臓、胸腺および頸部リンパ節に関しては、いずれの群間においても湿重量および組織学的変化は認められなかった。一方、腸間膜リンパ節においては、蒸留水飲水群に

比して PCE 飲水群のリンパ節自体の数およびサイズの増加が認められ、湿重量の増加も認められた (Figure 13A)。またヘマトキシリン・エオジン染色した組織像においては、蒸留水飲水群 (Figure 13B) に比して、PCE 飲水群ではリンパ小節の数およびサイズの増加と胚中心の明瞭化が認められた (Figure 13C, 13D)。

Th1/Th2 サイトカイン mRNA 発現変化： 4 週間の TCE または PCE 飲水投与を行ったラットより腸間膜リンパ節または全血由来の白血球より total RNA を抽出して逆転写反応を行い、cDNA を合成してテンプレートとして用いた。テンプレート溶液に Ex Taq、Ex Taq buffer、dNTP (以上 Takara Bio) とプライマーを添加して、PCR 反応を行った。本検討に用いた IL-4、IFN- γ 、および GAPDH の各プライマーは以下のものを用いた。

IL-4: forward primer 5'-tctcacgtcactgactga-3'
reverse primer 5'-cttcagtggtgagcgt-3'
IFN- γ : forward primer 5'-agagcctccttgatattctgg-3'
reverse primer 5'-gcttccttagcctagattctggtg-3'
GAPDH: forward primer 5'-gcatggccttcggttctctac-3'
reverse primer 5'-actcctggaggccatgtaggc-3'

PCR 産物を 1 % アガロースゲルにて電気泳動を行った後、GAPDH との相対比を算出して評価した。

IL-4 mRNA は、TCE 飲水群において用量依存的に発現上昇し、3 mg/L TCE 飲水群において約 1.4 倍の発現上昇を示した (Figure 14A)。一方、Th1 サイトカインである IFN- γ mRNA は、3 mg/L TCE 飲水群において約 0.7 倍の発現抑制が認められた (Figure 14B)。

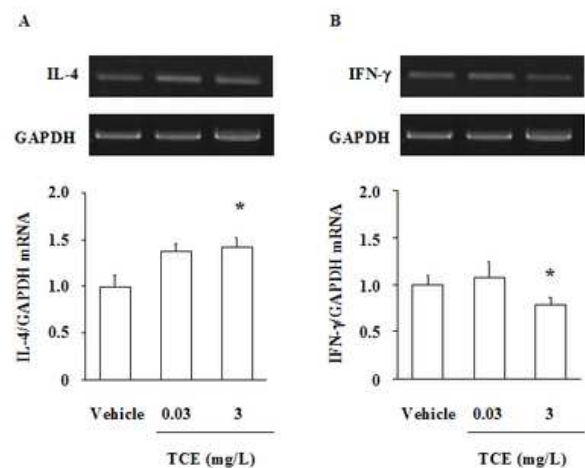


Figure 14. The level of IL-4 (A) mRNA and IFN- γ (B) mRNA expression in MLNs of the rats treated with TCE in drinking water for 4 weeks.

The relative expression intensity was calculated according to the following formula: IL-4 mRNA/GAPDH mRNA (A) or IFN- γ mRNA/GAPDH mRNA (B). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=4). *P<0.05 vs. vehicle.

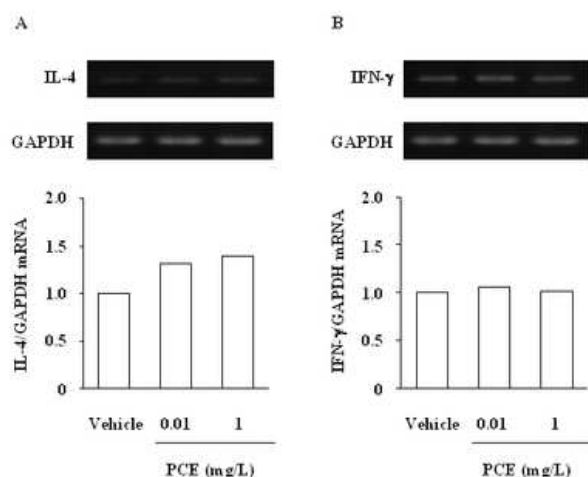


Figure 15. Gel electrophoresis of RT-PCR products obtained from lymphocytes separated from rats treated with PCE in drinking water for 4 weeks.

The relative expression intensity was calculated according to the following formula: IL-4 mRNA/GAPDH mRNA (A) or IFN- γ mRNA/GAPDH mRNA (B).

また、4週間のPCE飲水投与後にラットより採取した末梢血白血球におけるIL-4 mRNAは、PCE飲水群において発現上昇傾向を示した (Figure 15A)。一方、Th1サイトカインであるIFN- γ mRNAは、いずれの群間においても同程度の発現を示した (Figure 15B)。

両化合物の飲水投与により、皮膚組織においては単核球および肥満細胞の顕著な増加によると考えられるPCA反応亢進作用が認められた。また経口摂取した際の所属リンパ組織にあたる腸間膜リンパ節でのリンパ小節の増大と胚中心の明瞭化が認められたのであるが、これらは両化合物による炎症応答に起因するものと考えられた。さらに腸間膜リンパ節や抹消血由来白血球において、両化合物の飲水によりIL-4産生が亢進した。アレルギー疾患患者においては、血中IgE濃度と相関してIL-4などのTh2サイトカイン濃度が高いことが報告されている³³⁻³⁶ことから、両化合物はTh1/Th2サイトカインバランスの破綻をきたしてアレルギー反応が増強したことが示唆された。

本項ではTCEおよびPCEを飲水投与したのであるが、両化合物は揮発性であるため、経気道曝露など投与経路を変えた場合についての影響も検討する必要がある。また、本研究では一貫して受動感作によるアレルギー反応に関して検討を重ねてきたのであるが、能動感作に対する両化合物の影響を検討することも重要であると考えられる。

5. 結論

TCEおよびPCEは、受動感作した各種肥満細胞からのヒスタミン遊離および炎症性サイトカイン産生に対して増強作用を示したことから、TCEおよびPCEはI

型アレルギー反応において即時相だけでなく、後期炎症反応 (遅発相) 惹起の助長を促す可能性が示唆された。また水道水質基準値を基に、低濃度TCEおよびPCE飲水投与により、投与期間および用量依存的なPCA反応増強が認められ、飲水投与後の腹腔内浸出細胞由来肥満細胞においても抗原抗体反応によるヒスタミン遊離亢進作用が認められた。また病理組織学的には、皮膚組織における単核球浸潤および微小毛細血管周囲の肥満細胞の集積が認められた。さらに両化合物は、Th1/Th2サイトカインバランスを相対的にTh2側にシフトさせることで、アレルギー反応が起こりやすい体質にする可能性も示唆された。本研究で得られた知見は、地下水汚染物質として問題となっている有機塩素系溶剤の水道水質基準値レベルの摂取が健康に影響をおよぼす可能性を示唆するもので、水質管理における衛生的な見地からも意義深いものである。と考えられた。

6. 謝辞

本研究の遂行に際して、貴重なラット抗DNP-IgE抗体をご供与および有益なるご助言を頂きました岐阜薬科大学学長 永井博弼先生並びに岐阜薬科大学薬理学研究室 稲垣直樹教授に深謝申し上げます。

7. 参考文献

- 1) Fleming D. M., Crombio D. L., *BMJ*, **31**, 279-283 (1987).
- 2) Nakagomi T., Itaya H., Tominaga T., Yamaki M., Hisamatsu S., Nakagomi O., *Lancet*, **343**, 121-122 (1994).
- 3) Aberg N., Hesselmar B., Aberg B., Eriksson B., *Clin. Exp. Allergy*, **25**, 815-819 (1995).
- 4) Zhang Y., Leaves N. I., Anderson G. G., Ponting C. P., Broxholme J., Holt R., Edser P., Bhattacharyya S., Dunham A., Adcock I. M., Pulleyn L., Barnes P. J., Harper J. I., Abecasis G., Cardon L., White M., Burton J., Matthews L., Mott R., Ross M., Cox R., Moffatt M. F., Cookson W. O., *Nat. Genet.*, **34**, 181-186 (2003).
- 5) Howard T. D., Meyers D. A., Bleecker E. R., *Chest*, **123**, 363S-368S (2003).
- 6) Fujimaki H., Saneyoshi K., Shiraishi F., Imai T., Endo T., *Toxicology*, **116**, 227-233 (1997).
- 7) Etzel R. A., *Pediatrics*, **112**, 233-239 (2003).
- 8) Bornehag C. G., Sundell J., Weschler C. J., Sigsgaard T., Lundgren B., Hasselgren M., Hagerhed-Engman L., *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1393-1397 (2004).
- 9) Sato T., Taguchi M., Nagase H., Kito H., Niikawa M., *Toxicology*, **126**, 41-53 (1998).

- 10) 平成 18 年度 地下水質測定結果, 環境省, 2007.
- 11) Lawrence H. L., Jean C. P., *Pharmacol. Rev.*, **53**, 177–208 (2001).
- 12) Nachman B., John W. I. I., *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **205**, 479–491 (2002).
- 13) Wang F. I., Kuo M. L., Shun C. T., Ma Y. C., Wang J. D., Ueng T. H., *J. Toxicol. Environ. Health*, **65**, 279–291 (2002).
- 14) Inagaki N., Kawasaki H., Ueno M., Nagai H., Koda A., *Life Sci.*, **54**, 1403–1409 (1994).
- 15) Inagaki N., Nakai N., Kimata M., Kawasaki H., Nagai H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 829–834 (2001).
- 16) May C. D., Lyman M., Alberto R., Cheng J., *J. Allergy*, **46**, 12–20 (1970).
- 17) Kanda T., Akiyama H., Yanagida A., Tanabe M., Goda Y., Teshima R., Saito Y. A., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1284–1289 (1998).
- 18) Suzuki Y., Yoshimaru T., Yamashita K., Matsui T., Yamaki M., Shimizu K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 707–714 (2001).
- 19) Plaut M., Pierce J. H., Watson C. J., Hanley-Hyde J., Nordan R. P., Oaul W. E., *Nature*, **339**, 64–67 (1989).
- 20) Ohno I., Tanno Y., Yamauchi K., Takishima T., *Immunol.*, **70**, 88–93 (1990).
- 21) Razin E., Pecht I., Rivera J., *Immunol. Today*, **16**, 370–373 (1995).
- 22) Hano T., Ra C., Nonoyama S., Suzuki K., Yata J., Nakahata T., *Int. Immunol.*, **8**, 1367–1373 (1996).
- 23) Yamaguchi M., Sayama K., Yano K., Lantz C. S., Noben-Trauth N., Ra C., Costa J. J., Galli S. J., *J. Immunol.*, **162**, 5455–5465 (1999).
- 24) Katayama S., Shionoya H., Ohtake S., *Microbiol. Immunol.*, **22**, 89–101 (1978).
- 25) Eiseman E., Bolen J. B., *Nature*, **355**, 78–80 (1992).
- 26) Jouvin M. H., Adamczewski M., Numerof R., Letourneur O., Valle A., Kinet J. P., *J. Biol. Chem.*, **269**, 5918–5925 (1994).
- 27) Josephson J., *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 23 (1986).
- 28) Westrick J. J., Mello J. W., Thomas R. F., *J. Am. Water Works Assoc.*, **76**, 52 (1984).
- 29) World Health Organization (WHO), “Guidelines for drinking-water quality, Vol. 2, Health criteria and other supporting information. 2nd ed.” ed. by WHO, Geneva, 1996.
- 30) Wu C., Schaum J., *Environ. Health Perspect.*, **108**, 359–363 (2000).
- 31) Giger W., Molnar-Kubica E., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 475–480 (1978).
- 32) Leschber R., Mergler-Voelkl R., Nerger M., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **39**, 159–164 (1990).
- 33) Kapsenberg M. L., Wierenga E. A., Bos J. D., Jansen H. M., *Immunol. Today*, **12**, 392–395 (1991).
- 34) Parronchi P., Macchia D., Piccinni M. P., Biswas P., Simonelli C., Maggi E., Ricci M., Ansari A. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **15**, 4538–4542 (1991).
- 35) Del Prete G. F., De Carli M., D’Elios M. M., Maestrelli P., Ricci M., Fabbri L., Romagnani S., *Eur. J. Immunol.*, **23**, 1445–1449 (1993).
- 36) Maggi E., *Immunotechnology*, **3**, 233–244 (1998).