

## 揮発性有機化合物の胎仔期曝露による仔マウスの Th1、Th2 型免疫応答のかく乱

山元 昭二・Tin-Tin Win-Shwe・藤巻 秀和

独立行政法人国立環境研究所環境リスク研究センター高感受性影響研究室

### 要 約

胎児期、乳児期は化学物質に対して高感受性の時期であるとも云われており、多種多様な化学物質による子供の健康影響とそのメカニズムを把握することは生体機能の正常な発達の観点から重要と考えられている。本研究では低濃度トルエンの胎児期曝露が仔マウスの全身および局所での Th1/Th2 免疫応答に及ぼす影響についてグラム陽性菌細胞壁成分ペプチドグリカン (PGN; peptidoglycan) との併用、非併用下で検討した。その結果、5, 50 ppm トルエンのみもしくは PGN 刺激との併用曝露は血中や脾臓において Th1 及び Th2 型免疫応答に関係するいくつかの免疫パラメーター (総 Ig 抗体サブクラスの産生レベルや転写因子 Tbet, GATA-3, Foxp3 の mRNA 発現等) をかく乱することを明らかにした。

【キーワード】感染、低濃度トルエン曝露、Th1/Th2 バランス、免疫発達

### はじめに

ヒトの乳幼児は、一日の多くを室内で過ごすため、VOC (ホルムアルデヒド、トルエン等揮発性有機化合物) やタバコの煙、ダニ、カビなどの環境因子に長時間曝される可能性がある。さらに、子供特有の活動や行動も環境因子を体内に多く摂取する要因になり、例えば、子供の体重当りの水や食物の摂取量は大人に比べて多くなることや、指をくわえる行為などが環境因子を体内に多く取り込む原因の一つにもなる (WHO, 1986; Au, 2002)。又、胎盤や母乳経由による取り込みも当然考えられる。特に胎児期、乳児期は化学物質に対して高感受性の時期であるとも云われており (Holladay and Smialowicz, 2000)、VOC 等を含む多種多様な化学物質による子供の健康影響とそのメカニズムを把握することは生体機能の正常な発達の観点から重要と考えられている。

芳香族炭化水素に属する有機化合物の一つであるトルエンは、溶媒として、ペンキ、塗料用シンナー、多くの化学物質、印刷用インク、接着剤等に用いられ、ヒトへの高濃度曝露では中枢神経系に機能障害を引き起こすことが知られている (Byrne *et al.*, 1991; Greenberg, 1997)。また、近年はシックハウス症候群の原因物質の一つであるともいわれ、筆者の所属する研究室では、これまでに成熟マウスへの低濃度トルエン曝露が免疫系および神経系をかく乱することを明らかにした (Fujimaki *et al.*, 2007; Win-Shwe *et al.*, 2005)。免疫系の器官形成は主に胎児期および出生初期に起こるが健康な子供の免疫パラメーターの基礎的なデータは不足している。又、動物実験において、妊娠マウス又は幼若マウスを用いたトルエン曝露による免疫系への影響に関する報告は見当たらない。

近年、小児の免疫発達は、I 型ヘルパー T (Th1)

細胞と II 型ヘルパー T (Th2) 細胞の機能の関係で議論され、その発達の過程では、Th1/Th2 比の均衡がとれた状態で発達していくことが重要と考えられている。通常、胎児期および新生児期の免疫応答は Th2 側に偏り、成長にともなって Th1/Th2 バランスのとれたものへと移行するが (Adkins and Guevara, 2001)、この間の Th1 型免疫応答の発達には生体を取り巻く多くの微生物からの刺激が重要であることがわかってきた (図 1) (Marodi, 2006; Bottcher *et al.*, 2000)。又、いくつかの化学物質は Th1/Th2 バランスをかく乱する可能性も示唆されている。筆者らは、マウス胎仔期のみの低濃度トルエン曝露もしくはペプチドグリカン (PGN: グラム陽性菌細胞壁成分) 刺激との併用曝露が仔マウスの全身または局所での Th1/Th2 免疫に及ぼす影響を明かにするために、妊娠マウスにトルエンおよび PGN を曝露し、Th1 及び Th2 型免疫応答に関連する血中

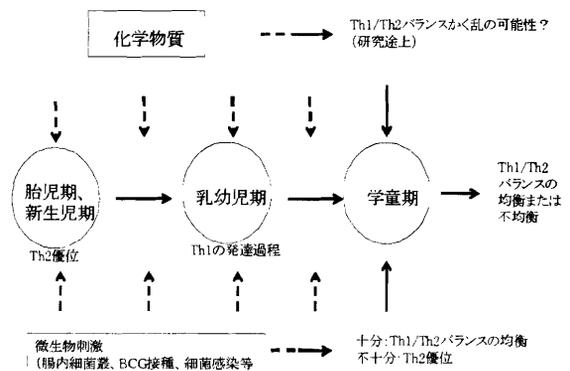


図 1 Th1/Th2 バランスの発達と細菌感染および化学物質との関係

Ig 抗体や脾臓・肺でのサイトカイン産生とその mRNA 発現等への影響について解析し報告した (Yamamoto *et al.*, 2009)。本稿ではその解析結果について概説する。

### 材料および方法

動物はSlc BALB/c妊娠マウス (日本エスエルシー) を用い、実験群として対照 (0 ppm, 新鮮ろ過空気) 群、5 ppmトルエン曝露群、50 ppmトルエン曝露群、PGN曝露群、5 ppmトルエン+PGN曝露群、50 ppmトルエン+PGN曝露群の計6群を設定した。トルエン曝露はトルエン吸入曝露チャンパー (産業医科大学環境管理学科内設置) を用いて、新鮮ろ過空気または5 ppm、50 ppm濃度のトルエンを妊娠14日目から出産前日にかけて1日当り6時間 (9時から15時) の5日間連続曝露した (図2)。トルエンガスは有機溶剤ガス発生器によって発生させ、ろ過空気で希釈したガスをステンレス・ガラス製のチャンパーに導入した。チャンパー内のトルエン濃度はガスクロマトグラフィ法によってモニターした。トルエン曝露期間中、PGN刺激との併用群では妊娠マウスに黄色ブドウ球菌由来のPGN (シグマアルドリッチ社製: 生理食塩水10mlにPGN 200 $\mu$ gを溶解) をネブライザーで吸入曝露 (10分間/回、3回/週) し、さらに出生した仔マウスに100 $\mu$ gのPGNを生後7日目から19日目までの間に計5回 (1回/3日)、腹腔内投与した。生後21日目に、ペントバルビタール麻酔下でそれぞれの仔マウスから血液、脾臓、肺を採取して液体窒素で凍結させた後、-80 $^{\circ}$ C設定の超低温槽で保存した。血漿中の総IgE, IgG1, IgG2a抗体産生レベルや脾臓・肺ホモジネート上清中のサイトカイン (IL-12, interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-4, IL-5) 産生量はELISA法によって測定した。

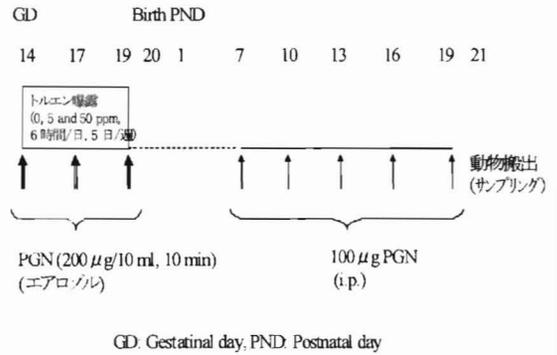


図2 トルエン曝露とペプチドグリカン刺激の実験スケジュール (Yamamoto *et al.*, J. Toxicol. Sci., 2009 より改変)

また、脾臓・肺のサイトカインや転写因子 Tbet, GATA-3, Foxp3 の mRNA の発現はリアルタイム RT-PCR 法によって解析した。

### 結果

図3にはナイーブヘルパーT細胞 (Th0細胞) から Th1細胞への分化促進に関与する転写因子 Tbet と Th2細胞への分化促進に関与する GATA-3 並びにエフェクターTh細胞活性化の抑制に関与する Foxp3 の mRNA 発現結果を示した。Tbet, GATA-3, Foxp3 のいずれの転写因子も 5 ppm 又は 50 ppm トルエン曝露によって対照群に比べて有意に減少した。トルエン+PGN 群では PGN のみとの間に差はみられなかった。表1には胎児期のみ5 ppm トルエン曝露並びに PGN 刺激との併用曝露の結果を示した。血漿中の総 Ig

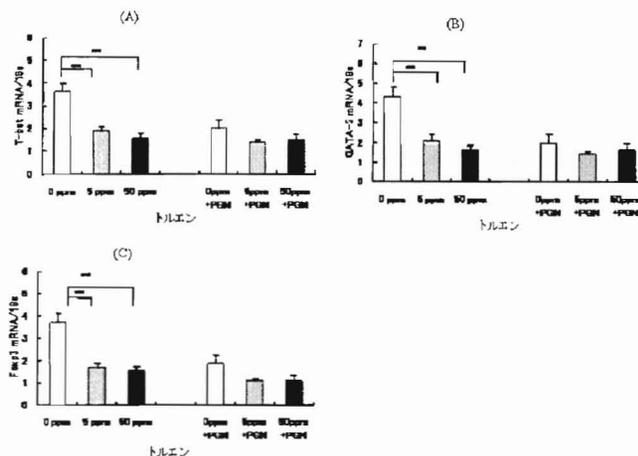


図3 胎仔期トルエン曝露後の幼若マウスの脾臓における転写因子の発現 (Yamamoto *et al.*, J. Toxicol. Sci., 2009 のデータより改変)。(A) Tbet mRNA, (B) GATA-3 mRNA, (C) Foxp3 mRNA, Each bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=6) (\*\* p<0.01)

表 1 胎仔期のための 5 ppm トルエン吸入曝露による影響

	1-week exposure to 5 ppm toluene					
	Toluene <sup>1)</sup>			Toluene + PGN <sup>2)</sup>		
	Th1	Th2	Other	Th1	Th2	Other
血漿総 IgE		→			↑	
総 IgG1		→			↓	
総 IgG2a	→			↓		
脾臓 IFN- $\gamma$ mRNA	→			→		
IL-12 mRNA	→			↓		
IL-4 mRNA		→			→	
IL-5 mRNA						
脾臓 Tbet mRNA	↓			→		
GATA-3 mRNA		↓			→	
Foxp3 mRNA			↓			→
肺 IFN- $\gamma$	→			→		
IL-12	→			→		
IL-4		→			→	
IL-5		→			→	

<sup>1)</sup> p<0.05, vs 0 ppm toluene (control)

<sup>2)</sup> p<0.05, vs 0 ppm toluene + PGN

↑: 増加, ↓: 減少, →: 変化なし

抗体サブクラス (Th2 系; IgE, IgG1, Th1 系; IgG2a) の産生や脾臓でのサイトカイン (Th1 系; IFN- $\gamma$ , IL-12, Th2 系; IL-4, IL-5) mRNA 発現、肺でのサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-5) 産生等については 5 ppm トルエン曝露による変化はみられなかった。しかしながら、脾臓での転写因子については前述したように 5 ppm トルエン曝露によって有意な減少が見られた。5 ppm トルエン+PGN 群では、PGN のみと比べて総 IgE 抗体産生レベルは増加し総 IgG1 および総 IgG2a 抗体産生レベルは反対に減少した。又、脾臓での IL-12 mRNA 発現が減少した。それ以外の免疫パラメーターについては併用曝露による変化はみられなかった。表 2 には 50 ppm トルエン曝露並びに PGN 刺激との併用曝露の結果を示した。50 ppm トルエンのみの曝露では、総 IgG1 や総 IgG2a の抗体産生レベルの増加と脾臓での転写因子 (Tbet, GATA-3, Foxp3) mRNA 発現の減少がみられた。50 ppm トルエン+PGN 群では PGN のみに比べて総 IgG1 や総 IgG2a の抗体産生レベルの減少および脾臓での IL-12 mRNA の減少が観察された。脾臓での IL-12 以外のサイトカインや転写因子 (Tbet, GATA-3, Foxp3) の mRNA 発現、肺のサイトカイン産生については影響はみられなかった。

## 考 察

本研究では低濃度トルエンの胎児期曝露が仔マウ

表 2 胎仔期のための 50 ppm トルエン吸入曝露による影響

	1-week exposure to 50 ppm toluene					
	Toluene <sup>1)</sup>			Toluene + PGN <sup>2)</sup>		
	Th1	Th2	Other	Th1	Th2	Other
血漿総 IgE		→			→	
総 IgG1		↑			↓	
総 IgG2a	↑			↓		
脾臓 IFN- $\gamma$ mRNA	→			→		
IL-12 mRNA	→			↓		
IL-4 mRNA		→			→	
IL-5 mRNA						
脾臓 Tbet mRNA	↓			→		
GATA-3 mRNA		↓			→	
Foxp3 mRNA			↓			→
肺 IFN- $\gamma$	→			→		
IL-12	→			→		
IL-4		→			→	
IL-5		→			→	

<sup>1)</sup> p<0.05, vs 0 ppm toluene (control)

<sup>2)</sup> p<0.05, vs 0 ppm toluene + PGN

↑: 増加, ↓: 減少, →: 変化なし

スの全身および局所での Th1/Th2 免疫応答に及ぼす影響についてグラム陽性菌細胞壁成分 PGN との併用、非併用下で検討した。その結果、5, 50 ppm トルエンのみもしくは PGN 刺激との併用曝露は血中や脾臓において Th1 及び Th2 型免疫応答に関係するいくつかの免疫パラメーターをかく乱することを明らかにした。

トルエンのみの曝露による主な影響は、血漿中総 IgG2a (Th1 依存性) 抗体産生レベルの増加と脾臓での Th1 型サイトカイン IL-12 および転写因子 Tbet, GATA-3, Foxp3 の mRNA 発現レベルの減少傾向ないし有意な減少であった。我々は以前の研究で、成熟マウスへの低濃度トルエン (50 ppm) の長期 (6 ないし 12 週間) 吸入曝露によって気管支肺胞洗浄液中のマクロファージ数ないしリンパ球数の増加による気道炎症反応の変化と Th1 型サイトカイン IFN- $\gamma$  産生レベルの低下がみられたことを明らかにした (Fujimaki *et al.*, 2007)。本研究では、肺ホモジネート上清中の IFN- $\gamma$  を含むサイトカインの産生レベルは各曝露群間で有意な差はなかったけれども、脾臓において PGN 刺激との併用曝露下で IL-12 mRNA 発現の減少傾向がみられ、Th1 型サイトカインの発現レベルを抑制方向に導くことが明らかになった。IL-12 は細胞性免疫において Th0 細胞の Th1 亜集団への分化ないし NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞の活性化において中心となる役割を演じることが知られている。本研究で低濃度トルエン曝露は Th0 細胞から Th1

細胞またはTh2細胞分化を直接促進する二つの転写因子(Tbet, GATA-3) (Szabo *et al.*, 2000; Zhou and Ouyang, 2003) の mRNA 発現を抑制するだけでなくFoxp3の mRNA 発現も抑制した。Foxp3は制御性T細胞(regulatory T cell: Treg細胞)に発現し(Lopes *et al.*, 2007)、Treg細胞の機能の低下は直接的または間接的にアレルギーや自己免疫疾患のリスクを高めることが知られている(Curotto de Lafaille and Lafaille, 2002; Verhagen *et al.*, 2006)。しかしながら、本研究ではFoxp3 mRNAの低下がTbetもしくはGATA-3の mRNA 発現の増加には反映されていないため、一般に言及されているようなTh1/Th2パラダイムでこれらの実験結果を説明することはできなかった。

トルエン曝露とPGN刺激との併用による曝露は、PGNのみに比べて、総IgE抗体産生レベルを高め、反対に総IgG1抗体や総IgG2a抗体の産生レベルを減少させた。総IgE抗体と総IgG1抗体は同じTh2系の抗体であるにも関わらず逆の反応を示した。この理由についてははっきり説明できないが、胎仔期でのトルエン曝露とPGN刺激との併用曝露は、仔マウスのTh1/Th2免疫応答に関係する血中のIg抗体サブクラスの産生レベルについても抑制もしくはかく乱する方向に導くことを明らかにした。

## 謝辞

本研究の遂行に際し、多大なご協力をいただいた産業医科大学の嵐谷奎一先生、樺田尚樹先生(現国立保健医療科学院)、吉田安宏先生に深謝いたします。

## 引用文献

- Adkins, B., Bu, Y. and Guevara, P. (2001). The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J. Immunol.*, 166, 918-925.
- Au, W.W. (2002). Susceptibility of children to environmental toxic substances. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205(6), 501-503. Review.
- Bottcher, M. F., Nordin, E.K., Sandin, A., Midtvedt, T. and Bjorksten, B. (2000). Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. *Clin. Exp. Allergy*, 30(11), 1590-1596.
- Byrne, A., Kirby, B., Zibin, T. and Ensminger, S. (1991). Psychiatric and neurological effects of chronic solvent abuse. *Can. J. Psychiatry*, 36(10), 735-738.
- Curotto, de Lafaille M.A., Lafaille, J.J., (2002). CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 14(6),

771-778. Review.

- Fujimaki, H., Yamamoto, S., Tin-Tin-Win-Shwe, Hojo, R., Sato, F., Kunugita, N., Arashidani, K., (2007). Effect of long-term exposure to low-level toluene on airway inflammatory response in mice. *Toxicol. Lett.* 168(2), 132-139.
- Greenberg M.M. (1997). The central nervous system and exposure to toluene: a risk characterization. *Environ. Res.*, 72, 1-7. Review.
- Holladay, S.D., Smialowicz, R.J. (2000). Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ. Health Perspect.* 108, 463-473. Review.
- Lopes, J.E., Soper, D.M., Ziegler, S.F. (2007). Foxp3 is required throughout the life of a regulatory T Cell. *Sci. STKE.* 2007(393), pe36.
- Maródi, L. (2006). Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infection and Immunity*, 74(4), 1999-2006.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, Tbet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100, 655-669.
- Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, C.A., Akdis, M. (2006). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Tregulatory cells and more. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 26(2), 207-231.
- WHO, (1986). Principles for evaluating risks from chemicals during infancy and early childhood: the need for a special approach. World Health Organization, Geneva.
- Win-Shwe, T.T., Yamamoto, S., Kakeyama, M., Kobayashi, T., Fujimaki, H. (2005). Effect of intratracheal instillation of ultrafine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209(1), 51-61.
- Yamamoto S., Win-Shwe, T.T., Yoshida Y., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., (2009). Children's immunology, what can we learn from animal studies (2): Modulation of systemic Th1/Th2 immune response in infant mice after prenatal exposure to low-level toluene and toll-like receptor (TLR) 2 ligand. *J. Toxicol. Sci.*, 34 Suppl 2:SP341-348.
- Zhou, M., Ouyang, W. (2003). The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol. Res.*, 28(1), 25-37. Review.