

環境化学物質の実験的アレルギー性結膜炎への影響

難波 龍人, 本間 啓蔵, 堀内 浩史, 辻澤 宇彦, 宮田 幹夫, 石川 哲

北里大学医学部眼科学教室

要 約

アレルギー疾患は従来特異的な体質を持つ人にのみ発症するという印象が強かったが、近年増加の傾向にある。抗原の増加だけでは説明ができず、我々は環境化学物質がこの種の疾患の増悪に関与しているのではないかと推定し、ハートレイ系モルモットをモデルとして実験的解明を行った。モルモットにスギ花粉に対する受動免疫を与え、背部皮下に有機燐系殺虫剤 (trichlorofon, fenitrothion)、有機塩素系除草剤 (paraquat dichloride) を投与し、実験的スギ花粉アレルギー性結膜炎に対する影響を評価した。結膜炎の強度の定量は、炎症部位の血管から組織中へ出る Evans blue を抽出し分光光度計で測定することにより行った。その結果、trichlorofon, fenitrothion では $10^{-4} \sim 10^{-5}$ mg/kg レベルという極めて少量の投与群において、paraquat dichloride でも $10^{-3} \sim 10^{-4}$ mg/kg の極めて少量の投与で結膜炎の有意の増悪が認められた。また増悪効果は2週間以上にわたった。(日眼会誌 97: 297-303, 1993)

キーワード: アレルギー性結膜炎, 有機燐系殺虫剤, 有機塩素系除草剤, スギ花粉症, 環境因子

Participation of Environmental Chemicals in Experimental Allergic Conjunctivitis

Tatsuto Namba, Keizou Honma, Koushi Horiuchi, Iehiko Tsujisawa,
Mikio Miyata and Satoshi Ishikawa*Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kitasato University*

Abstract

The effects of organophosphorus pesticides (trichlorofon and fenitrothion) and an organochlorine herbicide (paraquat) on experimental allergic conjunctivitis were studied quantitatively. Guinea pigs were passively immunized with antiserum to Japan cedar pollen. The above chemicals were administered subcutaneously 2 days prior to challenge with cedar pollen in the conjunctival sac, resulting in allergic conjunctivitis. The intensity of the conjunctival allergic reaction was quantitatively estimated by measuring the extravasation of Evans blue in the conjunctiva which had previously been administered intravenously. The allergic conjunctivitis was apparently aggravated by extremely low dosage level of organophosphorus pesticide ($10^{-4} \sim 10^{-5}$ mg/kg) and organochlorine herbicide ($10^{-3} \sim 10^{-4}$ mg/kg). The most intensive aggravating reaction was obtained 10^{-5} mg/kg of organophosphorus pesticide and at 10^{-4} mg/kg of paraquat dichloride. The aggravating effects of organophosphorus pesticide and organochlorine herbicide persisted at least two weeks after the single administration. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 297-303, 1993)

Key words: Allergic conjunctivitis, Organophosphorus pesticide, Organochlorine herbicide, Pollinosis, Environment

別刷請求先: 228 相模原市北里1-15-1 北里大学医学部眼科学教室 難波 龍人

(平成4年6月29日受付, 平成4年9月7日改訂受理)

Reprint requests to: Tatsuto Namba, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kitasato University. 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara 228, Japan

(Received June 29, 1992 and accepted in revised form September 7, 1992)

I 緒 言

ここ数年、アレルギー疾患、特にスギ花粉症は増加してきている¹⁾。従来特異体質の人だけと考えられていたこの種の疾患の増加の原因として、戦後進められてきたスギ植林面積の拡大を挙げる者もある²⁾。確かに林野庁の調査によれば、積極的な植林の結果、わが国のスギ林は昭和60年度末現在で人工林の45%を占めるに至っている³⁾。しかし都衛生局の調べによれば、スギ花粉の飛散量はスギ植林面積ではなく、その年、その前年の気候に影響されて毎年まちまちであることが分かっている⁴⁾。そこでアレルギー反応を増悪させる物質の増加が考えられ、環境に広がっている化学汚染物質が注目されてきた。自動車の排気ガスの影響の報告もあるが⁵⁾⁶⁾、我々は戦後、大量に使用されてきた殺虫剤、除草剤^{7)~10)}の影響が大きいのではないかと推定し、モルモットを用いた実験的アレルギー性結膜炎で解明を試みた。

II 方 法

実験にはすべて8週齢のハートレイ系雄モルモットを用いた。

1. 抗血清の作製

まず始めに以後の実験に使用するための抗スギ花粉血清を作製した。石崎¹¹⁾、竹内¹²⁾の方法に準じて行った。すなわち腹腔内に一匹あたり水酸化アルミニウムゲル10mgと蛋白質量として3μgのスギ花粉を生理的食塩水1mlとホモジネイトし、一週間間隔で8回反復投与した。スギ花粉 (*Cryptomeria japonica* D. Don.) は関東近隣にてその年の春に採取したものを使用した。最終投与1週間後にベントパルビタールナトリウム (ネプタール®) 50mg/kg投与の深麻酔下で心腔内より全採血を行った。採取血液はしばらく室温放置後、遠心分離により血清を分離した。

2. 抗血清の抗体価確認

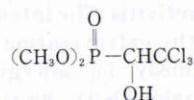
実験1にて作製した抗血清の抗体価を測定した。Ovaryら¹³⁾の方法に準じて抗血清の希釈系列を作製し、各血清をハートレイ系雄モルモットの背部皮内に0.1mlずつ注射した。48時間後、蛋白質量として10μg相当量のスギ花粉と0.5%Evans blueを含んだ生理的食塩水ホモジネイト1mlを静脈内に投与した。20分後背部の皮内注射部のPCA (passive cutaneous anaphylaxis)反応を確認した。色素漏出した青色斑の直径が8mm以上のものを陽性とした。予備実験より

安定したスギ花粉によるI型アレルギー反応を得るには少なくとも抗体価160倍の抗血清が必要であり、また反応があまりに鋭敏でも結果の評価が困難であるため、抗体価が160倍から320倍の血清を混合し、抗体価を平均化して160倍強に調節し、以下の実験に使用した。

3. 実験的アレルギー性結膜炎に及ぼす化学物質の影響

投与化学物質には有機燐系殺虫剤のtrichlorfon (和光純薬、図1)、fenitrothion (西尾工業、図2)、有機塩素系除草剤のparaquat dichloride (和光純薬、図3)を用いた。ハートレイ系雄モルモットに実験2で作製した抗血清1mlを静脈注射し、スギ花粉に対する受動免疫を与えた。受動免疫8日目に化学物質を皮下投与した。投与量はtrichlorfonでは 3×10^6 mg/kgから10倍系列希釈で 3×10^{-5} mg/kgまで、fenitrothionでは 6×10^6 mg/kgから10倍系列希釈で 10^{-5} mg/kgまで、paraquatでは 10^6 mg/kgから10倍系列希釈で 10^{-5} mg/kgであった。なお各投与量につきモルモット5匹ずつ、10眼を1群として行った。化学物質投与48時間後、すなわち受動免疫後10日目に1%Evans blue生理的食塩水溶液1mlを静脈注射した。静脈注射後直ちに蛋白質量で0.7μg/mlを含むスギ花粉生理的食塩水ホモジネイトを0.05mlずつ両眼に点眼した。30分後ベントパルビタールナトリウム (ネプタール®) (50mg/kg)投与の深麻酔下で心臓より放血、致死せしめ、その後球結膜と瞼結膜を剖出した。剖出結膜は1

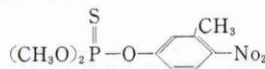
DEP
trichlorfon



Dipterex
Dylox
Nekirton

図1 Trichlorfonの構造式。

MEP
fenitrothion



Sumthion
Folithion

図2 Fenitrothionの構造式。

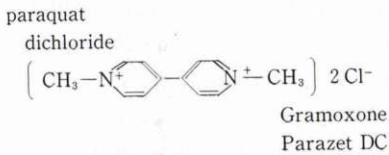


図 3 Paraquat dichloride の構造式.

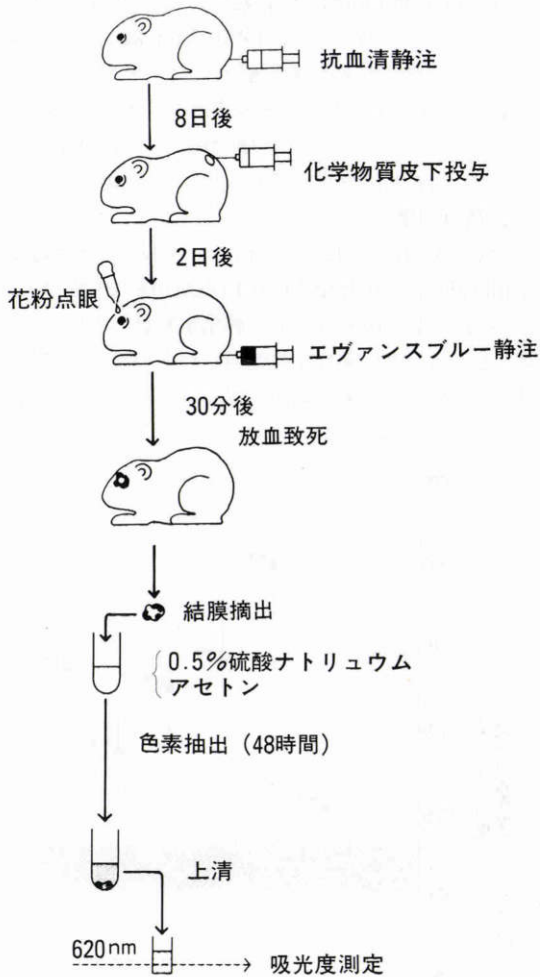


図 4 アレルギー性結膜炎実験の模式図.

眼ずつ 0.5%硫酸ナトリウム水溶液とアセトン混合液 (3 : 7) 1 ml で 48 時間暗所、室温に浸漬して Evans blue を抽出した。抽出色素量は波長 620 nm で吸光度を測定し、その吸光度をそのアレルギー性結膜炎の強度とした (図 4)。

なお対照として、スギ花粉点眼は行ったが、化学物質の投与をしなかったもの、および上記の各濃度の化学物質は投与したがスギ花粉の点眼をしなかったもの

を、それぞれ 5 匹ずつ 10 眼測定した。

4. 残留効果

Trichlorfon, および paraquat dichloride の投与量は実験 3 で得られた結果の最も増悪反応の強かった量で行った。すなわち trichlorfon では $3 \times 10^{-3} \text{mg/kg}$, paraquat dichloride では $1 \times 10^{-4} \text{mg/kg}$ の皮下投与を 1 回行い、そのアレルギー性結膜炎の増悪作用の残留効果をみた。trichlorfon 投与後 1 日, 2 日, 4 日, 7 日, 14 日目に, paraquat dichloride では 7 日, 14 日目にスギ花粉を実験 3 と同様に行い、アレルギー性結膜炎の強度を定量的に測定した。なお、受動免疫のための抗スギ花粉血清は花粉点眼 10 日前に静脈内投与した。また各群は 5 匹, 10 眼ずつで行った。

なお対照として、スギ花粉の点眼のみで化学物質の投与しなかったもの、および上記の各濃度の化学物質は投与したがスギ花粉を点眼しなかったものを、それぞれ 5 匹, 10 眼ずつを測定した。

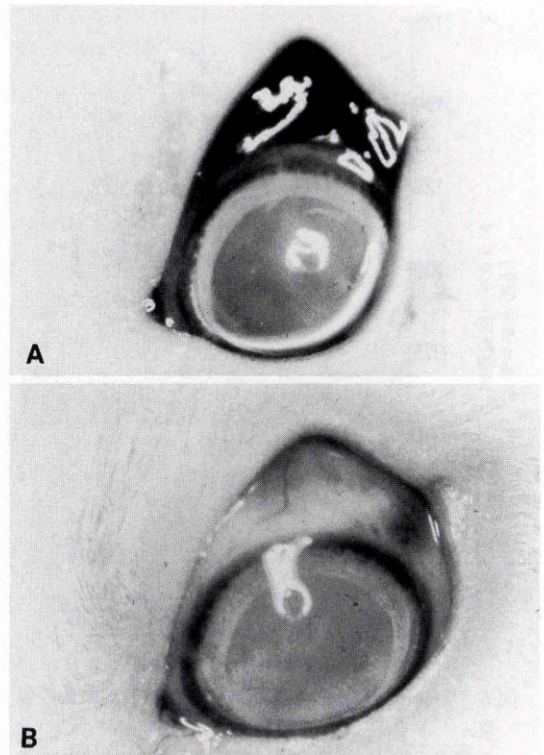


図 5 A : $3 \times 10^{-5} \text{mg/kg}$ 体重の trichlorfon 負荷の結膜炎。B : 対照の化学物質負荷なしの結膜炎。

Trichlorfon 負荷では対照に比べて著明な結膜内色素漏出が認められる。

III 結 果

1. 化学物質によるアレルギー性結膜炎の変化

Trichlorofon 3×10^{-5} mg/kg の投与では, trichlorofon 投与なしの対照に比べ, 肉眼的にも結膜は非常に青く染色され, その差は一目瞭然であった (図 5 A, B). それらの定量結果を図 6 に示した. アレルギー性結膜炎は 10^{-5} mg/kg という極めて微量投与からすでに trichlorofon 投与なしの対照より有意の増悪効果が認められ, 3×10^{-3} mg/kg の投与量で最もアレルギー性結膜炎の強度は高く, それ以上の濃度の投与ではむしろやや低くなる釣り鐘型を示した. なお, 抗原の点眼なしの対照は各投与量とも低値で, trichlorofon 自体の色素漏出の増悪効果は認められなかった. すなわち trichlorofon のみでは結膜血管の漏出増強作用は示さなかった.

Fenitrothion の投与でもほぼ同様で, 吸光度は $6 \times$

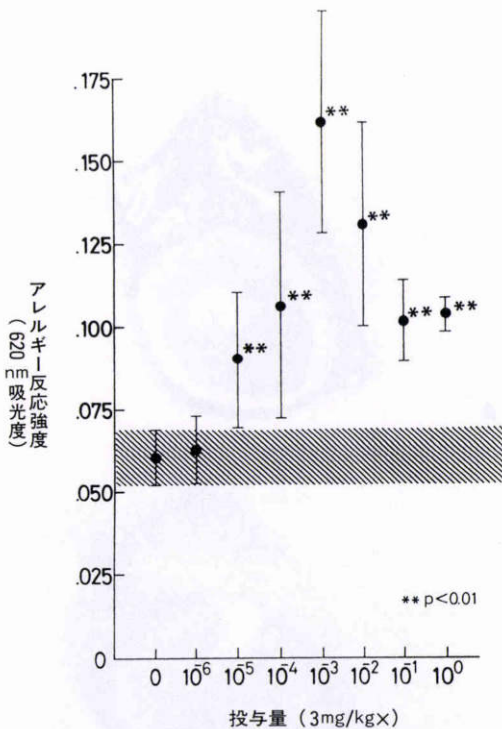


図 6 Trichlorofon 投与量とアレルギー性結膜炎の強度.

各値は平均値と標準偏差. 斜線の範囲は trichlorofon を負荷していない対照群での範囲. 3×10^{-5} mg/kg という微量からすでに増悪効果が認められ, 3×10^{-3} mg/kg の投与量で最も強い増悪効果, これより大量ではやや弱い増悪効果が認められる.

10^{-5} mg/kg の投与量ですでに fenitrothion 投与なしの対照より有意に高くなり, 6×10^{-4} mg/kg の投与量で最も強くなり, さらに高濃度ではやや低下するという釣り鐘型を示した (図 7). なお抗原の点眼なしの対照は各投与量とも低値で, fenitrothion 自体による結膜血管からの色素漏出効果は認められなかった.

Paraquat dichloride の投与では, 1×10^{-4} mg/kg の投与量で有意に高くなり, 1×10^{-2} mg/kg の濃度で最も高くなるやはり釣り鐘型を示した (図 8). なお, paraquat の投与のみで抗原であるスギ花粉の暴露のない群ではすべての投与群で低値を示し, paraquat 自体による色素漏出効果は認められなかった.

2. 残留効果

Trichlorofon 3×10^{-3} mg/kg の一回投与, paraquat dichloride 1×10^{-4} mg/kg の 1 回投与後の残留効果をそれぞれ図 9, 10 に示した. 両化学物質とも投与後時間とともにその増悪作用は減弱したものの, 2 週間でもなお対照に比べ有意に高い値を示し, 明らかな残留

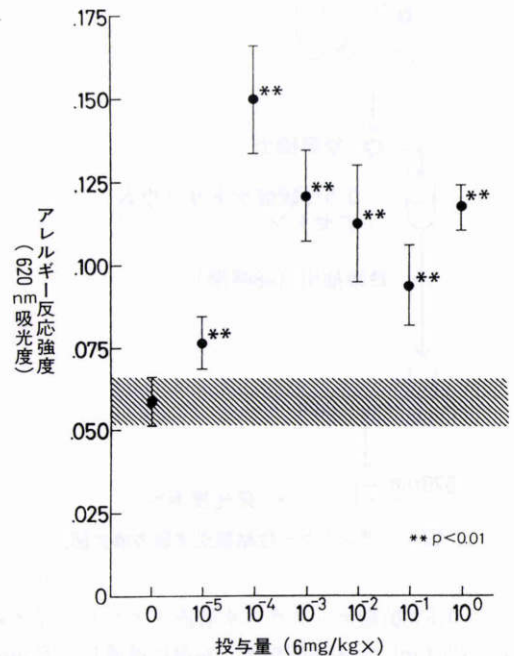


図 7 Fenitrothion 投与量とアレルギー性結膜炎の強度.

各値は平均値と標準偏差. fenitrothion を負荷していない対照群での範囲. 6×10^{-5} mg/kg という微量からすでに増悪効果が認められ, 6×10^{-4} mg/kg の投与量で最も強い増悪効果, それより大量ではやや弱い増悪効果が認められる.

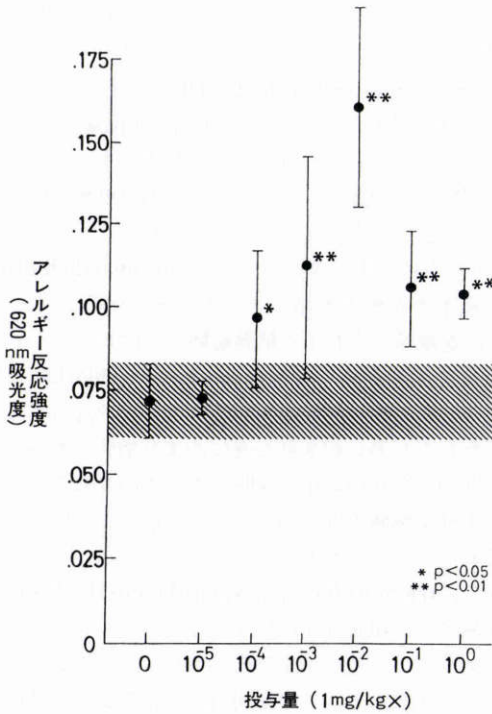


図 8 Paraquat dichloride 投与量とアレルギー性結膜炎の強度。

各値は平均値と標準偏差。斜線の範囲は paraquat を負荷していない対照群での範囲。1×10⁻⁴mg/kg という微量からすでに増悪効果が認められ、1×10⁻²mg/kg の投与量で最も強い増悪効果、それより大量ではやや弱い増悪効果が認められる。

効果が認められた。

IV 考 按

ある種の物質に対して過敏な反応を示す人があることは古くから知られていた。同じ植物に接しても接触性皮膚炎が重症になる人、ある物質の吸引によって喘息発作を起こし易い人など、どちらかと言えば特殊な疾患であり、特異体質の人が罹患するという印象が強かった。しかし近年重い軽いはあるにしてもアレルギー疾患に関わる人が増加してきた¹⁾。身近にも花粉や家ダニが原因の鼻炎や結膜炎を持つ人が増えている。眼科領域でも、その季節になれば外来にアレルギー性結膜炎の患者が溢れるという事態を、臨床に携わっている者ならば誰しも経験してきたことである。このスギ花粉症の増加の説明として、しばしばスギ植林面積の増加が挙げられてきた。確かにスギ植林の奨励によりかなりの面積を占めるに至っているが²⁾³⁾、前述し

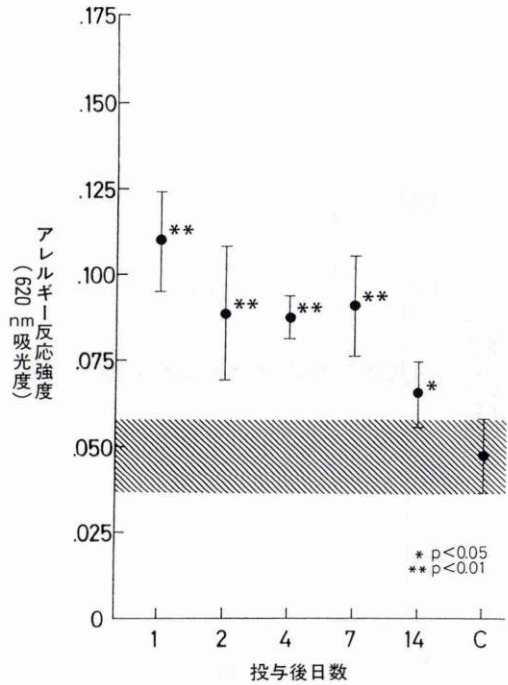


図 9 Trichlorfon 1 回投与の残留効果。

C; trichlorfon を負荷していない対照値で、その範囲を斜線で示した。1 回の投薬 2 週間後でも有意の増悪作用が認められている。

たように花粉の飛散量は必ずしも植林面積に比例していない⁴⁾。そのため他の原因として、環境化学物質の関与が考えられている。ある化学物質がアレルギー反応を起こし易い状態を造り、その上に抗原であるスギ花粉と接触すると花粉症を発症するというものである。石山ら⁵⁾は日光周辺で自動車の通行量が多い地域と少ない地域に分けてスギ花粉症の発症率を調査した。その結果通行量の多い地域の発症率が高いことから、自動車の排気ガスが花粉症発症増加に関与していると結論づけている。そしてその効果はディーゼル車の排気微粒子によるアジュバント作用によっていることが述べられている⁶⁾。その他の環境汚染物質の関係についても論じられているが¹⁴⁾、今回我々は広く使用されてきた殺虫剤、除草剤も花粉症に対して影響を及ぼしているのではないかと考え、実験的研究を行った。なお、本実験に際して結膜採取前に動物を放血致死せしめる事で、血液からの色素の混入を最小限に防ぐことができ、実験精度を非常に高めることができた。

結果は、今回実験に使用した 2 種の有機リン系殺虫剤、trichlorfon, fenitrothion および有機塩素系除草

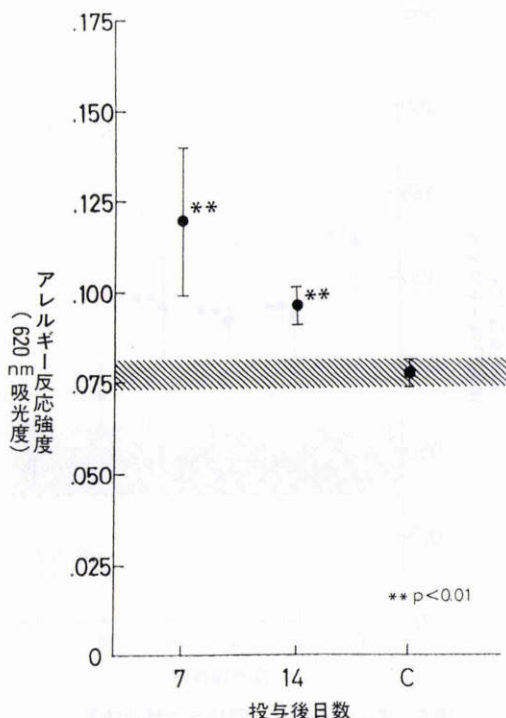


図10 Paraquat dichloride 1回投与の残留効果。

C; paraquat を負荷していない対照値で、その範囲を斜線で示した。1回の投薬2週間後でも有意の増悪作用が認められている。

剤, paraquat dichloride を投与したモルモットではいずれもスギ花粉アレルギー性結膜炎の明らかな増悪が認められた。また、同時に施行した化学物質の投与のみで花粉の暴露のない群ではほとんど反応していないことから、化学物質自体は結膜血管の透過性を亢進させることはなく、発症しようとしているアレルギー反応を増強せしめることが明らかになった。それも LD_{50} の $10^{-7} \sim 10^{-6}$ 倍という極めて少量の投与で増悪効果があった。この程度の濃度ならばヒトの場合、直接殺虫剤や除草剤の散布に携わらなくとも接触する可能性は十分にあると思われる。

スギ花粉アレルギー性結膜炎はよく知られているように典型的な I 型アレルギー反応である。この反応は肥満細胞によるところが大きい。この細胞は acetylcholine receptor を持っている^{15)~17)}。したがって有機リン系殺虫剤がこの receptor に作用した cholinergic な状態では、肥満細胞は活性化された状態になっており、ヒスタミンなどの化学伝達物質を放出しやすくなっていると考えられた。また、肥満細胞表面の IgE

からの信号の伝達に serine esterase に属する複数の酵素が介在している。これらの酵素は高濃度の diisopropylphosphofluoridate (DFP) や他の有機リン系殺虫剤で阻害され¹⁸⁾、また phospholipase も阻害されることが知られている¹⁹⁾。このためヒスタミンなどの伝達物質の放出が、高い有機リン系殺虫剤の投与群で却って反応が弱くなったと考えられた。

一方、有機塩素系除草剤である paraquat dichloride は組織中の遊離基を増加させることが知られているが²⁰⁾、遊離基の存在下で肥満細胞からのヒスタミン遊離が促進される²¹⁾。このため paraquat dichloride の投与でアレルギー性結膜炎が増悪したことの説明はできた。ただなご高い投与群で逆にあまり増悪効果が認められなかったかの理由は現時点では不明であるが、毒物により細胞障害性が高くなると一般に免疫反応も抑えられるのかも知れない。

また、trichlorofon, paraquat dichloride の残留効果実験では、微量な 1 回投与後でも少なくとも 2 週間はアレルギー反応の増悪効果が残存していることが判明した。すなわち、この期間内に抗原の暴露を受けるとアレルギー性疾患が発症あるいは増悪しやすくなると考えられた。

以上のようにある種の殺虫剤や除草剤がスギ花粉アレルギー性結膜炎の発症や増悪に少なからず影響を及ぼしていることが明らかになった。

本論文の要旨は第 94 回日本眼科学会総会にて発表した。また研究費の一部は文部省科学研究費一般研究 02454407 によるものである。

文 献

- 1) 奥田 稔: 鼻アレルギー。金原出版、東京、103—106、1988。
- 2) 奥田 稔: 鼻アレルギー。金原出版、東京、204、1988。
- 3) 横山敏孝、金指達郎: 花粉発生源としてのスギ林面積の推移。IgE 抗体産生と環境因子。村中正治、他(編): メディカルトリビューン、東京、67—79、1990。
- 4) 東京都衛生局: 花粉症対策に係る基礎的研究。総合解析報告書。東京都衛生局医療福祉部公害保健課、東京、51—89、1989。
- 5) 石山康子、池森享介、小泉一弘、石崎 達: 大気汚染のスギ花粉症に及ぼす影響。アレルギー 35: 892、1986。
- 6) 村中正治、小泉一弘、石田房子、宮本睦子、鈴木修二、奥村 浩: 花粉アレルギーの増加と大気汚染—ディーゼル排出微粒子の関与についての作業仮説とその検討—。日本医事新報 3180: 26—32、

- 1985
- 7) 農林水産省統計局情報部：ポケット農林水産統計—平成2年版—。農村統計協会，東京，158，1990。
 - 8) 農林水産省統計局情報部：ポケット農林水産統計—昭和60年版—。農林統計協会，東京，162，1985。
 - 9) 農林水産省統計局情報部：ポケット農林水産統計—昭和55年版—。農林統計協会，東京，169，1980。
 - 10) 農林水産省統計局情報部：ポケット農林水産統計—昭和50年版—。農林統計協会，東京，164，1975。
 - 11) 石崎道治：スギ花粉によるアレルギー性結膜炎の実験的・組織学的研究。アレルギー 35：1149—1157，1986。
 - 12) 竹内良夫，西村葉子，横室公三，木村義民，雑賀寿和，石崎正道，他：アレルギー性結膜炎の動物実験モデルの作製。アレルギー 34：1021—1027，1985。
 - 13) Ovary Z, Kaplan B, Kojima S: Characteristics of guinea pig IgE. *Int Arch Allergy Appl Immun* 51: 416—528, 1976。
 - 14) 今井 透，小沢 仁，若盛和雄，渡辺直熙：IgE抗体産生を修飾する環境汚染。IgE抗体産生と環境因子。村中正治，他（編）：メディカルトリビューン，東京，21—30，1990。
 - 15) Fantozzi F, Moroni F, Masini E, Blandina P, Mannalioni PF: Moduration of the spontaneous histamine release by adrenergic and cholinergic drugs. *Agents and Actions* 8: 347—358, 1978。
 - 16) 富岡玖夫：I型アレルギー反応の機序とその調節。矢田純一（編）：図説，臨床免疫講座。メジカルビュー社，東京，137—144，1987。
 - 17) 小山次郎：免疫。化学同人，東京，170，1985。
 - 18) Becker EL, Austen KF: Mechanism of immunologic injury of rat peritoneal mast cells. I. The effect of phosphonate inhibitors on the homocytotropic antibody-mediated histamine release and the first component of rat complement. *J Exp Med* 124: 379—395, 1966。
 - 19) Misaki H, Matsumoto M: Purification of lysophospholipase of vibrio parahaemolyticus and its properties. *J Biochem* 83: 1395—1405, 1978。
 - 20) Smith LL, Rose MS, Wyatt I: The pathology and biochemistry of paraquat. Ciba foundation symposium 65. Oxygen free radicals and tissue damage. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 321—341, 1979。
 - 21) Mannaioni PF, Gianella E, Palamerani A, Pistell A, Gambassi F, Bani-Sacchi T, et al: Plenary lecture: Free radicals as endogenous histamine releasers. *Agents and Actions* 23: 129—142, 1988。