

## 2. 低濃度長期ホルムアルデヒド曝露の免疫系への 影響についての検討

## 2-1. 低濃度長期ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響についての検討

研究者：藤巻秀和（国立環境研究所）

研究協力者：黒河佳香（国立環境研究所）

櫻田尚樹（産業医科大学）

### 1. 研究要旨

低濃度長期ホルムアルデヒド曝露をマウスを用いて行い、免疫学的な過敏反応の出現について抗原感作の有無を含めて検討した。ホルムアルデヒド曝露のみでは、肺においては顕著な炎症性細胞の集積やサイトカイン産生はみられなかった。脾臓や血中でのリンパ球集団においても有意な変化はみられていない。脾臓細胞における抗原刺激に対するサイトカイン産生では、2000ppbでTh1タイプの産生が顕著に抑制された。血中での抗体価においては、抗原特異的な抗体価では有意な差はみられていないが、400ppbで総IgG2aでは著しい低下がみられ、Th1タイプの抑制が示唆された。脳内においては、2000ppbでIL-1 $\beta$ のサイトカイン産生に変動がみられた。

### 2. 研究目的

MCSを低濃度化学物質に対する過敏反応と捉えたときに、即時型、あるいは遅発型のアレルギー反応とどのように異なるのか明らかでない。しかしながら、MCS患者の中には60%近いアレルギー疾患の既往歴のある人が含まれるという報告もみられているので、何らかの関連性が推測される。最近、脳のアストロサイトやミクログリアなどの細胞が情報伝達物質としての役割を果たしているサイトカインを産生すること、免疫系のリンパ球やマクロファージなどの細胞が神経伝達物質を産生することが明らかとなり、神経系と免疫系とが相互に作用しあう制御機構が存在すると考えられている。鬱病や精神分裂病ではIL-2が低下しIL-6が亢進すること、睡眠障害ではIL-1、記憶、認識障害ではTNF- $\alpha$ などのサイトカインが変動することが報告されている。

そこで、低濃度化学物質曝露によるsensitizationとアレルギー性炎症との差異について明らかにするために、抗原を感作した群としない群にわけ、それぞれ化学物質を曝露し脳内、呼吸器、脾臓、血中におけるサイトカイン、抗体価の変動について比較検討した。今回は、化学物質として低濃度ホルムアルデヒド曝露が免疫系にどのような影響を及ぼし、それらにおいて従来のアレルギー反応との違いが見られるか否かについて検討した。

### 3. 研究方法

3-1) 使用した実験動物及びホルムアルデヒドの曝露条件について最初に記載した吸入曝露装置および曝露条件の項を参照。

### 3-2) 抗原投与

抗原としては、卵白アルブミン(OVA)を曝露開始前に 10 µg/マウスの濃度で 2 mg alum とともに腹腔内投与し、以後 OVA のみを 4 週間は毎週 1 回、その後は 3 週おきに 1 回の割合で腹腔内投与を行った (図 1)。最終投与の 1 週間後 (ホルムアルデヒド曝露終了 1 日後)、ネンプター麻酔下で肺胞洗浄液、胸腺、脾臓の採取と採血を行った。また、脳内のサイトカイン量を測定のため、マウスより大脳と小脳とを含む部分を取り出し冷 ELISA 緩衝液(1%BSA,0.05%Tween 20,0.1%NaN<sub>3</sub>を含んだ PBS)中でホモジェナイズして遠心後上清を集めた。なお、抗原感作なし群は各群 5 匹、抗原感作群は各群 6 匹を用いた。

### 3-3) 炎症性細胞の算定とサイトカイン産生

肺胞洗浄液中の炎症性細胞の集積については、洗浄液を遠心後に細胞数を算定しサイトスピン標本を作成し、ディフクイック (国際試薬) で染色して検索した。脾臓細胞は、ステンレスメッシュを用いて細胞をばらばらにしたあと細胞数を算定し OVA と共に 24 時間と 48 時間培養した。肺胞洗浄液中、培養上清中、あるいは脳内のサイトカイン産生量について、IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF-α(Endogen, R&D Systems,あるいは Biosource International) と TGFβ(Promega)の ELISA キットを用いて測定した。

### 3-4) 抗体価の測定

血漿中の抗原特異的 IgE 抗体価は、anti-mouse IgE, biotinylated OVA を用いての ELISA 法で測定した。抗原特異的 IgG1 と IgG2a は、HRP 標識した anti-mouse IgG1 と IgG2a をそれぞれ用いて ELISA 法で測定した。また、総 IgE、総 IgG1 と IgG2a も ELISA 法により測定しマウス IgE,IgG1,IgG2a を用いた検量線より算定した。

### 3-5) フローサイトメトリー分析

細胞膜上の表面抗原の分析による脾臓細胞、および血中のリンパ球亜集団の解析は、PE 標識 anti-mouse CD3e hamster IgG、PE 標識 anti-mouse CD4 rat IgG2b、FITC 標識 anti-mouse CD45R/B220 rat IgG2a、FITC 標識 anti-mouse CD8a rat IgG2a (BD PharMingen)と対照抗体を用いて Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer で行った。

### 3-6) 統計処理

測定データは平均値±SE で表示し、全体の分散分析と個々の対照群と曝露群と有意差の検定は、それぞれ ANOVA と Dunnett による検定で行った。

#### 4. 研究結果

##### 4-1) 肺胞洗浄液中の細胞成分とサイトカインにおける変動

ホルムアルデヒドのみの低濃度曝露においては、肺胞洗浄液中の細胞数に濃度依存的な増加傾向がみられた。細胞成分ではマクロファージ数は曝露によって特に有意に増加した (\* $P < 0.05$ ) (表1)。好中球やリンパ球の細胞数には曝露による差はみられなかった。なお、ルームコントロールとして飼育室で曝露と同様の期間飼育したマウスにおいては、総細胞数は  $6 \times 10^4/\text{mouse}$  で、マクロファージ数、好中球数、リンパ球数はそれぞれ  $5.51 \pm 0.09(x10^4)$ ,  $0.41 \pm 0.08(x10^4)$ ,  $0.03 \pm 0.01(x10^4)$  であった。次に、OVA 免疫してホルムアルデヒド曝露した群では、肺胞洗浄液中の総細胞数と炎症性細胞の集積において対照群と曝露群との間で差はみられなかった (表2)。低濃度ホルムアルデヒド曝露の1週間前に高濃度ホルムアルデヒド曝露してさらに免疫を行った群では、肺胞洗浄液中の総細胞数の有意な増加が 2000ppb 曝露群でみられ、マクロファージの数の増加は 80、400、2000ppb でみられた (表3)。しかしながら、他の炎症性細胞の集積における変動はみられなかった。

肺胞洗浄液中のサイトカイン産生においては、proinflammatory サイトカインとして IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  を、炎症を抑制するものとして IL-10 を測定した。図2には IL-1 $\beta$ , 図3には IL-6, 図4には TNF- $\alpha$  の産生量が示してあり、(a)はホルムアルデヒド低濃度曝露のみ、(b)はOVA免疫とホルムアルデヒド曝露、(c)はホルムアルデヒド高濃度曝露、OVA免疫、そしてホルムアルデヒド低濃度曝露をあらわしている。結果は、いずれの曝露条件の違いにおいても、あるいはいずれのサイトカイン産生量においてもホルムアルデヒド曝露による有意な差は認められなかった。なお、IL-10産生の増加は、いずれの群でも認められなかった。

##### 4-2) 脾臓、及び末梢血中のリンパ球亜集団の変動

曝露期間中、マウスの体重、脾臓重量、及び脾臓の相対重量 (図5) においても曝露群 (G2:80ppb; G3:400ppb; G4:2000ppb ホルムアルデヒド) と対照群 (G1:0ppb) との間に差はみられなかった。脾臓の細胞数においても同様であった。脾細胞中の CD19 陽性 (B) 細胞の低濃度ホルムアルデヒド曝露群での比率が図6(a)に、OVA免疫後低濃度ホルムアルデヒド曝露した群の比率が図6(b)に示してあるが、いずれも差はみられなかった。また、CD3 陽性 (T) 細胞の低濃度ホルムアルデヒド曝露群での比率が図6(c)に、OVA免疫後低濃度ホルムアルデヒド曝露した群の比率が図6(d)に示してあるが、いずれも影響はみられなかった。低濃度ホルムアルデヒド曝露群での CD4/CD8 比率が図7(a)に、OVA免疫後低濃度ホルムアルデヒド曝露した群の CD4/CD8 比率が図7(b)に示してあるが、いずれも対照群との間に差はみられていない。末梢血中の CD19 陽性 (B) 細胞の低濃度ホルムアルデヒド曝露群での比率が図8(a)に、OVA免疫後低濃度ホルムアルデヒド曝露した群の比率が図8(b)に示してあるが、いずれも差はみられなかった。同様に CD3CD4

陽性 (T)細胞の低濃度ホルムアルデヒド曝露群での比率が図 9 (a)に、OVA 免疫後低濃度ホルムアルデヒド曝露した群の比率が図 9 (b)に、また CD3CD8 陽性 (B)細胞の低濃度ホルムアルデヒド曝露群での比率が図 10(a)に、OVA 免疫後低濃度ホルムアルデヒド曝露した群の比率が図 10(b)に示してあるが、いずれも対照群との間に差はみられなかった。これらの結果は、今回のホルムアルデヒド濃度での 1 2 週間曝露は、リンパ球集団にはあまり変化をもたらさないことを示唆している。

#### 4-3) 脾臓における Th1/Th2 バランス

ヘルパーT細胞はサイトカイン産生パターンからアレルギー反応の亢進に働く Th2 タイプと細胞性免疫に働く Th1 タイプに分類することが出来る。そこで、OVA 免疫後低濃度ホルムアルデヒド曝露をおこないこの Th1/Th2 のバランスがどのように変化するか調べた。図 11 には培養 24 時間(a)と 48 時間(b)での IL-4 産生量が表してある。24 時間ではやや産生が増加傾向であったが、48 時間では低下傾向へと変化した。図 12 には培養 24 時間(a)と 48 時間(b)での IFN- $\gamma$ 産生量が表してあり、24 時間で 400ppb と 2000ppb 曝露で低下傾向がみられ、48 時間ではさらに顕著になり有意差がみられた。IFN- $\gamma$ と同様に Th1 タイプである IL-2 産生の 48 時間では 400ppb 曝露で有意な低下がみられた (図 13a)。一方、IL-4 と同じ Th2 タイプである IL-5 産生は低下傾向はみられたが、有意な差ではなかった (図 13b)。

なお、低濃度ホルムアルデヒド曝露のみによるサイトカイン産生を調べるために、曝露マウスの脾臓細胞を 48 時間培養して上清中の IL-4 と IFN- $\gamma$ 産生を測定したが、共に産生はみられなかった。

#### 4-4) 血漿中の抗体価の変動

低濃度ホルムアルデヒド曝露したマウス血漿中の抗体価を調べるために総 IgE、IgG1、IgG2a を ELISA 法で測定した。総 IgE 価においては、G4(2000ppb)群で増加の傾向がみられたが、有意な差ではなかった (図 14a)。総 IgG1 価は、変動がみられなかった (図 14b) が、総 IgG2a 価では、G3(400ppb)群で有意な低下が認められた (図 14c)。次に、OVA 免疫してホルムアルデヒド曝露したマウスでは、総 IgE(図 15a)と抗原特異的 IgE (図 15b) において G4(2000ppb)で低下傾向がみられたが有意な差ではなかった。抗原特異的 IgG1 (図 15c) と抗原特異的 IgG2a (図 15d) では対照群と比べて変動はみられなかった。

#### 4-5) 脳内サイトカインの変動

脳内でのサイトカイン産生の変化を調べるために、proinflammatory サイトカインを中心に測定した。IL-6 と TNF $\alpha$ においては上昇はみられなかった。IL-1 $\beta$ においては、低濃度ホルムアルデヒド曝露で濃度依存的に増加傾向がみられ、G4(2000ppb)群で有意な