

## 6. ホルムアルデヒド曝露した肥満細胞欠損 (WBB6F1 - W/W<sup>v</sup>) マウスとその正常対照 (WBB6F1 - +/+ ) マウスの免疫系への影響

### A. 病理組織およびリンパ球画分の変化

研究協力者：佐藤房枝・菊池 亮・樺田尚樹・嵐谷奎一  
(産業医科大学産業保健学部)

#### (1) 研究要旨

WBB6F1 マウスのうち肥満細胞欠損モデルマウスW/W<sup>v</sup>を用いた低濃度ホルムアルデヒド(2000ppb)の12週間吸入曝露でも、気道粘膜上皮細胞の著明な剥離や扁平上皮化生、腫瘍変化等を認めなかった。一方これまでに使用したC3H/HeNやC57BL/6NマウスよりOVA前感作による気道粘膜変化や炎症性細胞の浸潤が強く観察され、感受性がより高いと思われた。WBB6F1 - +/+マウスでは、ホルムアルデヒド曝露群で気管上皮内の肥満細胞が増加する傾向がみられたが、WBB6F1 - W/W<sup>v</sup>マウスでは、ホルムアルデヒド曝露後においても肥満細胞の増加は認められなかった。肥満細胞欠損マウスにみられた皮膚の慢性炎症病変は、ホルムアルデヒドの吸入曝露による反応というよりはむしろ脱毛を基盤とした皮膚刺激・掻痒の増強によるものと考えられた。またフローサイトメーターを用いてリンパ球分画について検討した結果、脾細胞中および末梢血中のCD3陽性細胞の比率、CD4、CD8陽性細胞比率は、マウスの系統差、ホルムアルデヒドの曝露にかかわらず有意な変化は認めなかった。リンパ球の活性化の指標として、CD26抗原の発現の変化について検討したが、変化はなかった。CD3陽性細胞中の TcR陽性細胞の比率は、系統的にはW/W<sup>v</sup>マウスで低値を示し、ホルムアルデヒド曝露によりW/W<sup>v</sup>マウスの末梢血を除いて増加する傾向が認められた。

#### (2) 研究目的

本態性多種化学物質過敏状態の原因物質の1つとして、室内環境中のホルムアルデヒドの関与が推測されているが、その生体影響についてはまだよくわかっていない。

これまでにC3H/HeNならびにC57BL/6Nマウスを用いて、低濃度(最大2000ppb)・長期(3ヶ月)ホルムアルデヒド曝露によるマウス気道粘膜上皮の変化と炎症細胞の動態について、卵白アルブミン(OVA)前感作との関連性も含めて形態学的に検索をおこなった。その結果、OVA投与による影響と推定される気管上皮での肥満細胞の粘膜内浸潤や気管支上皮の杯細胞増生が観察されたが、ホルムアルデヒド曝露による影響と考えられる明らかな組織学的変化を観察することができなかった。

今回は、OVA前感作状態での低濃度(2000ppb)・長期(3ヶ月)ホルムアルデヒド曝露において、その生体影響を気道粘膜上皮を中心として形態学的に検索するとともに、アレルギー - 反応に寄与する肥満細胞の有無がどのような組織変化の違いをもたらしのかについて、肥満細胞欠損マウスを用いて比較検討した。加えて、脾細胞および末梢血中の免疫担当細胞分画の変化をについて検討した。

### (3) 研究方法

#### 1) 病理学的検索

10週齢・メスの肥満細胞欠損(W/W<sup>v</sup>)マウス8匹とその正常対照(+ / +)マウス9匹を用いた。すべてのマウスはホルムアルデヒド曝露前に、別項に述べられているようにネブライザ - を用いてOVAを吸入感作した。W/W<sup>v</sup>マウスは4匹・4匹の2群に、また正常対照マウスは4匹・5匹の2群に分け、それぞれホルムアルデヒド濃度0ppbと2000ppbで3ヶ月間吸入曝露した。

曝露終了後、ネンブタ - ル麻酔下においてマウスを失血死させ、頭部、気管・肺、皮膚、肝臓、腎臓、心臓、胸腺、脾臓、腸管(食道・胃・小腸・大腸・膵臓)、卵巣・子宮、膀胱、一部リンパ節を採取した。

固定は4%パラホルムアルデヒド / 0.1M磷酸緩衝液(pH7.4)ならびに各群2匹の気管・肺はcarnoy液で浸漬固定をおこない、型どおりにパラフィン包埋切片を作製した。なお、頭部は固定後Plank-Rychlo法にて脱灰し、昨年度と同様4 Point(図1)で分割した後にパラフィン包埋をおこなった。

すべての組織からHE染色標本を作製した。またHE染色標本の他に、頭部、気管・肺は炎症性細胞の動態を観察するためにGiemsa染色とToluidin blue染色、粘液分泌の状態を観察するためにPAS反応とAlcian blue染色を、皮膚はGiemsa染色とToluidin blue染色の他に、線維の変化を観察するためにAzan染色とElastica染色を施した。

さらにcarnoy固定した正常対照マウスの肺・気管より20枚 / 匹、2匹 / 群の1群計40枚の連続切片を作製し、Toluidin blue染色を施して気管粘膜上皮内に出現する肥満細胞の数を計数して、ホルムアルデヒド曝露濃度0ppb群と2000ppb群間で比較した。

#### 2) フローサイトメーターによるリンパ球分画の検索

屠殺時に脾細胞単細胞浮遊液、および末梢血単核球についてフローサイトメーターを用いて、リンパ球分画の変化について観察した。観察した表面抗原は、CD3, CD4, CD8, CD19, CD26および TcRである。なお、各処置群8~9匹のマウスを用いた。

### (4) 研究結果

#### 1) 気道粘膜組織における変化

頭部の4 Pointにおける上気道粘膜上皮の基本構造は昨年度と同様であった。

正常対照マウスとW/W<sup>v</sup>マウスはともに、これら4 Pointのいずれの粘膜上皮においても、ホルムアルデヒド曝露0ppbと2000ppb間で組織像に差はみられなかった。

喉頭から肺にかけては連続した標本を作製して粘膜上皮の変化を検索したが、すべての標本において、明らかな上皮細胞の剥離や扁平上皮化生、腫瘍性変化等は観察されなかった。しかし、気管支から終末細気管支にかけての著明な杯細胞の増生と粘液の分泌像がみられ(写真1)、また、末梢気管支ならびに血管周辺に多数の好酸球、形質細胞、リンパ球の浸潤がみられた(写真2)。これらの組織所見はホルムアルデヒド曝露の有無、肥満細胞欠損マウスであるか否かに関わらず、すべての標本で観察された。

carnoy固定した正常対照マウスWBB6F1 - + / +のToluidin blue染色標本より、気管上皮内に分布する肥満細胞を計数し、上皮内肥満細胞数 / 上皮気管軟骨数で補正してその出現率を算出した。各マウス20切片の平均値±標準偏差は、0ppb群は0.19±0.09、0.26±0.08で、2000ppb群は0.67±0.21、0.61±0.15であり2000ppb群の方が気管上皮内に肥満細胞が多くみられた(図2, 写真3)。なお、

WBB6F1-W/Wvにおいては、ホルムアルデヒド曝露後においても肥満細胞はごくわずかしら観察されず、変化は認めなかった。

## 2) 皮膚組織における変化

正常対照マウスWBB6F1-+/+の毛色は黒色、肥満細胞欠損モデルマウスWBB6F1-W/Wvは白色ある。W/Wvマウスは飼育の途中で脱毛が著しく、脱毛部では肉眼的に皮膚の硬化と搔爬による出血がみられた(写真4)。この皮膚の硬化・出血像はホルムアルデヒド曝露0ppb群においても少数みられたが、2000ppb群では多数のマウスで観察された。

組織学的に、過角化を伴った表皮肥厚と真皮の膠原線維の増加(写真5)が種々の程度でみられ、出血部には表面に潰瘍を有する炎症性変化がみられた(写真6)。炎症細胞の主体は好中球で好酸球の出現は目立たなかった。これらの皮膚所見により、不感蒸泄の増加が考えられたので、飲水量の計測したところ、図3に示すようにW/Wvマウスが正常対照マウスに比較し有意に飲推量が多く、さらに0ppbに比較しても2000ppb群で飲推量の増加が観察され、皮膚の障害が強いことをうかがわせた。

さらに2000ppb群では、硬化・出血部周辺の皮下に、腫大したリンパ節がみられた。リンパ節組織には多数のリンパ濾胞がみられ、膨大した髄索はほとんど形質細胞で占められていた(写真7)。

## 3) その他の組織における変化

気道、皮膚・リンパ節の他に肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、心臓、腸管(食道・胃・小腸・大腸・膵臓)、卵巣・子宮、膀胱の各組織を比較検討した。

肝臓では肝小葉内に、腎臓では腎盂の血管周辺に好酸球、形質細胞、リンパ球の集簇がみられた(写真8)。これらの所見は、個体差が多少みられたが、正常対照マウスもW/Wvマウスにも出現し、ホルムアルデヒド曝露0ppb群と2000ppb群の間で差はみられなかった。同様に胸腺、脾臓においても好酸球や形質細胞の出現が目立った。特にホルムアルデヒド曝露2000ppb群で皮下にリンパ節の腫大があったマウスでは、胸腺は、皮質が狭小で葉様構造は不明瞭であったが、髄質ではリンパ球やリンパ芽球様細胞に混じて好酸球や形質細胞が散見された(写真9)。また、脾臓は腫大しており、白脾髄のリンパ濾胞は胚中心を形成し、胚中心・濾胞辺縁体を中心として好酸球や形質細胞が散見された(写真10)。心臓、腸管、膀胱においては組織学的な変化を認めなかった。W/Wvマウスでは生殖器は萎縮性で卵巣は明らかではなかった。

## 4) リンパ球分画の変化

脾細胞中および末梢血中のCD3陽性細胞の比率、CD4、CD8陽性細胞比率およびB細胞比率は、マウスの系統差、ホルムアルデヒドの曝露にかかわらず有意な変化は認めなかった(図4-8、図11-15)。CD3陽性細胞中のTcR陽性細胞の比率は、系統的にはW/Wvマウスで低値を示し、ホルムアルデヒド曝露によりW/Wvマウスの末梢血を除いて増加する傾向が認められた(図9、16)。またリンパ球の活性化の指標として、CD26抗原の発現の変化について検討したが、変化はなかった(図10、17)。

## (5) 考察

今回使用したW/W<sub>v</sub>マウスは、前述したように生後20日では正常対照マウスの10%程度の肥満細胞を持っているが、生後100日を経過すると1%以下となり、肥満細胞欠損マウスとして用いられている(1)。

結果において、組織変化の強弱に多少の個体差はあったものの、すべてのマウスにおいて観察された気管支から終末細気管支にかけての著明な杯細胞の増生ならびに粘液の分泌像と末梢気管支ならびに血管周辺の好酸球・形質細胞・リンパ球等の浸潤、さらに肝臓、腎臓、脾臓、胸腺組織でのこれら炎症性細胞の集簇は、前回の結果も踏まえOVA前感作による反応と考えられた。昨年C3H/HeNマウスを用いてOVA前感作の影響としてホルムアルデヒド曝露濃度に関係なくみられた気管上皮内への肥満細胞の浸潤は、今回ホルムアルデヒド曝露0ppb群と2000ppbの間でその出現率に差がみられたことより、ホルムアルデヒド曝露によるアレルギー-症状増強効果も否定できないと思われるが、検討個体数が少ないこともあり推測にとどまる。いずれの所見も前回用いたC3H/HeNマウスやC57BL/6NマウスよりWBB6F1-W/W<sub>v</sub>マウスの方が反応が強く、感受性が高く感じられた。

W/W<sub>v</sub>マウスでみられた皮膚病変については、脱毛部における広範で種々な程度の皮膚増殖変化は炎症変化との移行像も見られ、その形態学的特徴から慢性皮膚炎の状態と考えられた。皮膚の掻痒と継続的な掻爬が推測される。このW/W<sub>v</sub>マウスは肥満細胞が欠損しているため、掻痒はIgEと肥満細胞が関与するI型アレルギー-による過敏反応とは考えがたい。また、ホルムアルデヒドを曝露した群の方がより多くの病変部位がみられ、その程度も強かったことを合わせると、脱毛を基盤として直接皮膚に外部刺激を受けた結果生じた掻痒による反応の可能性がある。ホルムアルデヒド曝露という持続性の外部刺激はより強い掻痒を引き起こしたであろうと考える。さらに、皮下のリンパ節の腫大は、皮膚の炎症の程度に比例して出現しており、気道からのOVA前感作やホルムアルデヒド曝露による反応というよりはむしろ皮膚の炎症による二次的な反応と考えられた。

肝臓・腎臓にみられた炎症性細胞の集簇は、ほとんどすべてのマウスに同様に観察されたことより、主としてOVA前感作による反応であろうと考えられた。また、胸腺、脾臓での炎症性細胞の増加は、皮膚病変の強いマウスでより強かったことからOVA前感作による反応と皮膚病変による反応が混在しているものと思われた。

## (6) 参考文献

1) 関正利,平嶋邦猛,小林好作:疾患モデル.実験動物の血液学.ソフトサイエンス社., 東京, 1981: 205-227

## (7) Abstract

Histopathological changes after repeated formaldehyde exposure in WBB6F1-W/W<sub>v</sub> and WBB6F1-+/+ mice

Fusae Sato, Makoto Kikuchi, Naoki Kunugita, Keiichi Arashidani

School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan.

To study the effect of repeated formaldehyde exposure on respiratory and dermal

systems, histopathological changes of the lung, trachea and skin have been observed in mast cell deficient WBB6F1-W/W<sup>v</sup> and unaffected WBB6F1-+/+ mice. We also observed surface phenotype of splenic and peripheral mononuclear cells in mice. Formaldehyde exposure did not show any adverse effects including epithelial cell proliferation, epithelial dysplasia and squamous metaplasia on morphology of the lung and trachea under light microscope. There was a mild infiltration of mast cells in the groups of mice previously sensitized with OVA in WBB6F1-+/+ mice. However, there were no infiltration of mast cells in WBB6F1-W/W<sup>v</sup> after formaldehyde exposure. We also observed the severe skin reaction including erosion and ulcer after formaldehyde exposure in WBB6F1-W/W<sup>v</sup> mice. There were no significant changes in surface phenotype of splenic and peripheral mononuclear cells in both mice. It was shown that the skin of mast cell deficient WBB6F1-W/W<sup>v</sup> mice may be high susceptible to formaldehyde exposure.

図1 頭部の切片作成部位

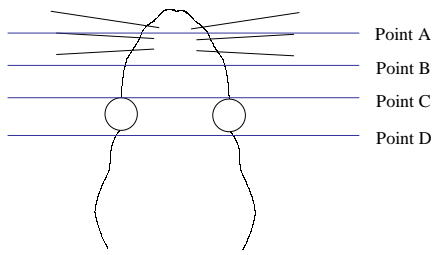


図2 WBB6F1(+/+)マウスにおける肥満細胞の出現

マウス番号	曝露濃度	肥満細胞数/軟骨
#1	0ppb	0.19 ± 0.09
#2	0ppb	0.26 ± 0.08
#3	2000ppb	0.67 ± 0.21
#4	2000ppb	0.61 ± 0.15

WBB6F1(+/+)マウスでは、ホルムアルデヒド曝露で、肥満細胞数が増加する傾向にあるが、観察個体数が少なく今後さらなる検討が必要。

一方、肥満細胞欠損モデルマウスWBB6F1-W/W<sup>v</sup>では、皮下において数箇所肥満細胞が観察されたが、数はわずかであった。

図3 飲水量比較

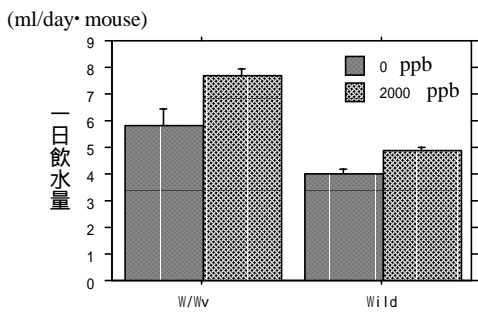


図4 Mutantマウス Spleen CD3陽性細胞比率

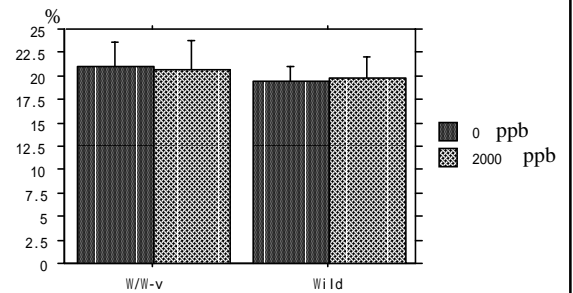


図5 Mutantマウス Spleen CD3&CD8+4-

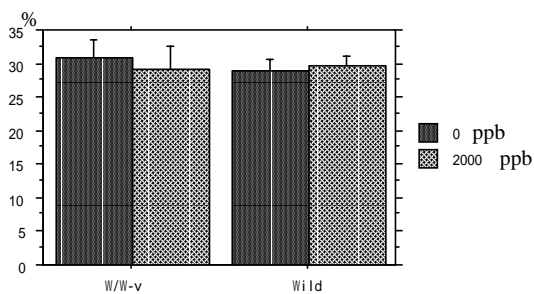


図6 Mutantマウス Spleen CD3&CD8-4+

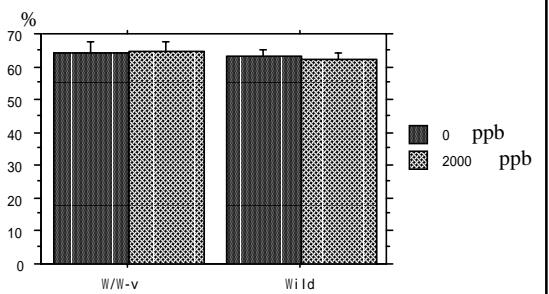


図7 Mutantマウス Spleen CD4/CD8

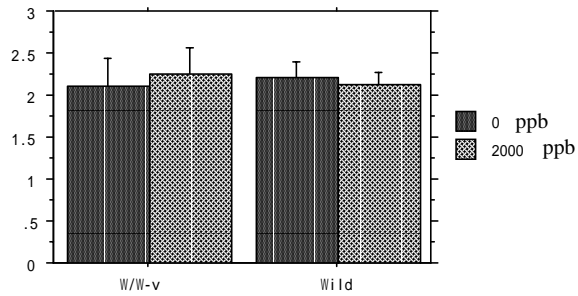


図8 Mutantマウス Spleen B cells

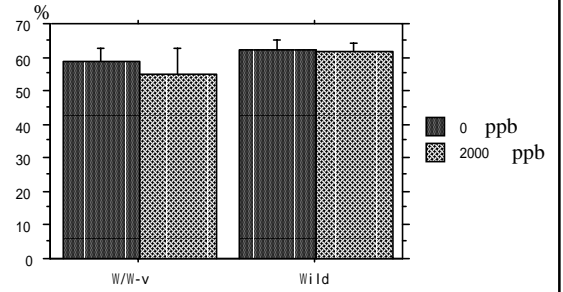


図9 Mutantマウス Spleen -TcR Tcells

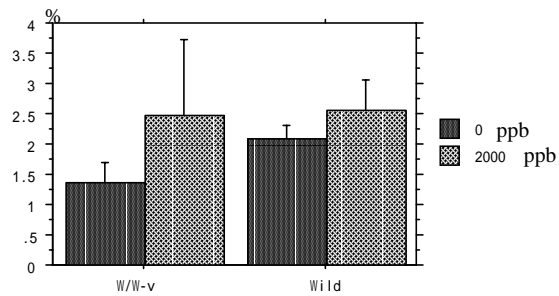


図10 Mutantマウス Spleen CD26+ Tcells

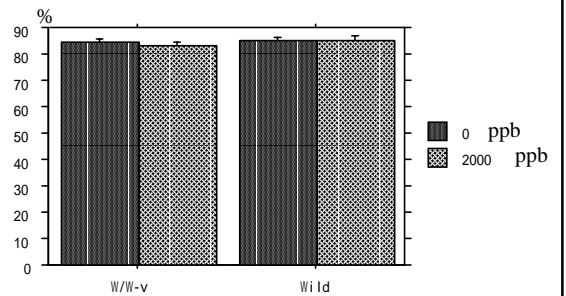


図11 Mutantマウス 末梢血 CD3陽性細胞比率

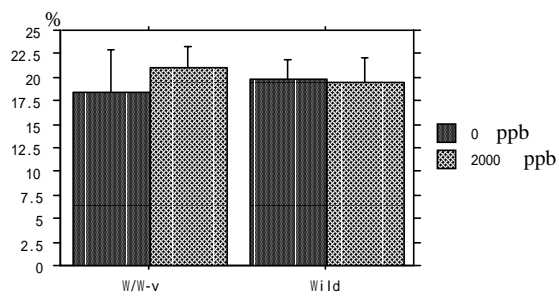


図12 Mutantマウス 末梢血 CD3&CD8+4-

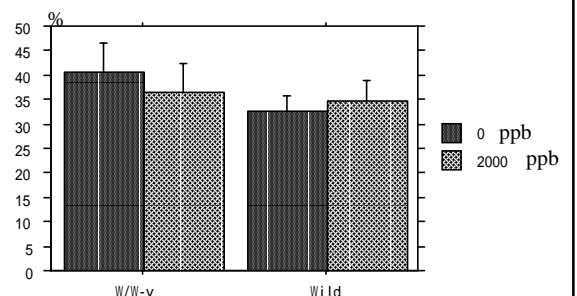


図13 Mutantマウス末梢血 CD3&CD8-4+

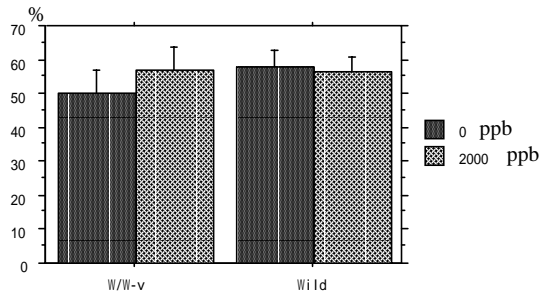


図14 Mutantマウス末梢血 CD4/CD8

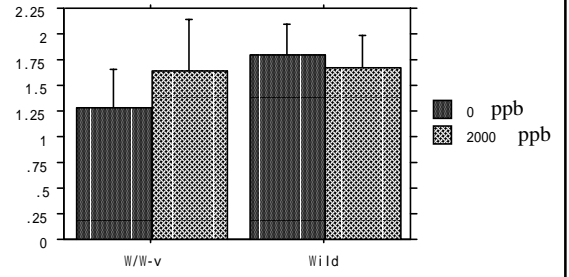


図15 Mutantマウス末梢血 B cells

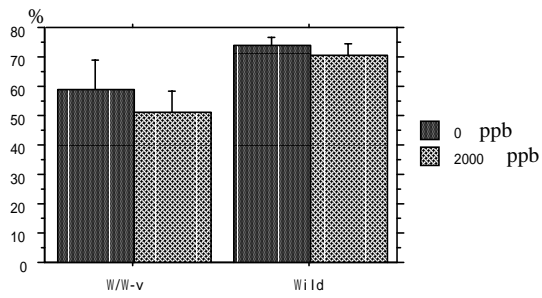


図16 Mutantマウス末梢血 -TcR Tcells

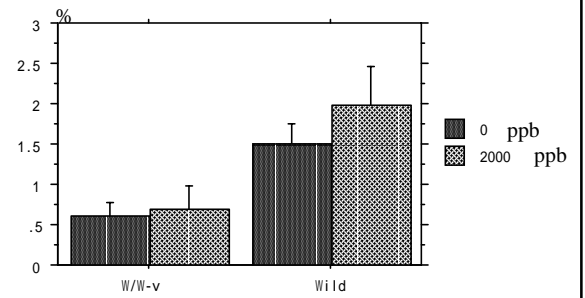


図17 Mutantマウス末梢血 CD26+ Tcells

