

## 6.ホルムアルデヒド曝露した肥満細胞欠損マウス(WBB6F1-W/Wv) と その正常対照マウス (WBB6F1-+/+)の免疫系への影響

### B. 炎症性反応について

研究者：藤巻秀和（独立行政法人国立環境研究所）

研究協力者：黒河佳香（独立行政法人国立環境研究所）

樺田尚樹（産業医科大学）

#### （１）研究要旨

くしゃみ様症状の増加に肥満細胞が関与する機構について解明するために、肥満細胞欠損マウス(WBB6F1-W/Wv) とその正常対照マウス (WBB6F1-+/+)を用いて、ホルムアルデヒド曝露により誘導される炎症反応について比較検討した。その結果、肺胞洗浄液中への炎症性細胞の集積においては、W/Wvマウスと +/+マウスでホルムアルデヒド曝露による違いが認められた。脾細胞におけるサイトカイン産生、及び血漿中の抗体価において増強は認められなかった。神経成長因子であるNGFや炎症誘導の神経ペプチドであるSubstance Pについては、ホルムアルデヒド曝露による変動は両マウスの血漿中では認められなかった。

#### （２）研究目的

MCSの発症と低濃度化学物質曝露との関連について検索するためには、アレルギー反応とは異なる過敏状態の誘導の有無について調べることが重要である。そこで、低濃度ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響と抗原感作により誘導される即時型、あるいは遅発型のアレルギー反応との差異や関連について明らかにすることを目的として研究を進めている。MCS患者の中にはアレルギー疾患の既往歴のある人が60%近く含まれるという報告もみられているので、MCSの発症と免疫系との何らかの関連性が推測される。昨年度までに、行動毒性への影響検索において、くしゃみ様症状の増加がホルムアルデヒド曝露に依存して増加することが明らかになった。さらに、抗原の吸入感作によるアレルギー性炎症モデルにおいてホルムアルデヒド曝露による顕著なくしゃみの増加が観察された。そこで、本年度は、その機構を解明するために、肥満細胞欠損マウスと正常対照マウスに2000 ppbの濃度でホルムアルデヒド曝露と抗原エアロゾル感作を行い、そのときの炎症反応について比較検討した。

#### （３）研究方法

##### 1) 実験動物

8週齢の雌肥満細胞欠損マウス(WBB6F1-W/Wv) とその正常対照マウス (WBB6F1-+/+)をJackson Lab.より購入し、2週間馴化後10週齢より曝露実験に供した。ホルムアルデヒドの曝露は、2000ppb 曝露群とコントロール群の2群で12週間行った。

##### 2) アレルギー性炎症モデルの作成

抗原の吸入感作を繰り返すことにより肺への炎症性細胞の集積と抗原特異的 IgE 抗体産生増強を示すマウスモデルを作成した。まず、ホルムアルデヒド曝露前に10 µg/マウスの濃度で卵白アルブミン(OVA)を2 mg alum とともに腹腔内投与し、以後ホルムアルデヒド曝露期間中 OVA のみの

エアロゾル感作を3週間に1回の割合で行った。最終投与の1週間後、ネンブタール麻酔下で肺胞洗浄液、脾臓の採取と採血を行った。

### 3) 炎症性細胞の算定と細胞増殖、サイトカイン・ケモカイン産生の測定

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、スライドグラスを用いて細胞をばらばらにし、遠心により洗浄したあと細胞数を算定した。一部は、WST-1(Roche)を用いた48時間での細胞増殖試験に、他は *in vitro* でOVAと共に24時間と48時間培養した。培養上清は、使用時まで-80℃に保存した。肺胞洗浄液中、培養上清中、あるいは脳内のサイトカイン・ケモカイン産生量について、インターロイキン(IL)-4, IL-5, IL-10, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , KC (Endogen, R&D Systems,あるいはBiosource International), Substance P (Assay Designs Inc.)と nerve growth factor (NGF) (Promega)のELISAキットを用いてそれぞれ測定した。

### 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,IgG2aは、HRP標識したanti-mouse IgG1,IgG2aをそれぞれ用いてELISA法で測定した。また、総IgE(ヤマサ)もELISA法により測定した。

### 5) 統計処理

測定データは平均値 $\pm$ SEで表示し、全体の分散分析と個々の対照群と暴露群間の有意差の検定は、Student's *t*-testにより行った。

## (4) 研究結果

### 1) 肺胞洗浄液中での炎症性細胞の変動

ホルムアルデヒド曝露と抗原感作終了後に、肺胞洗浄液を採取して、総細胞数とその細胞成分について検討した。総細胞数については、W/Wvマウスと+/+正常マウスにおいて対照群と比べホルムアルデヒド曝露による増加はみられなかった(表1)。しかしながら、炎症性細胞の割合においては、両系統間で違いがみられた。+/+マウスでは対照群と比べホルムアルデヒド曝露群で肺胞マクロファージの数に顕著な増加がみられた。しかしながら、他の好中球(Ne)、好酸球(Eo)、リンパ球(Ly)では曝露群と対照群との間に差はみられなかった。W/Wvマウスでは、肺胞マクロファージの数には影響がみられないものの、好酸球とリンパ球においてホルムアルデヒド曝露による有意な増加が認められた。

### 2) 脾臓細胞における細胞増殖とサイトカイン産生

ホルムアルデヒド曝露終了後に採取した脾細胞を培養してWST-1アッセイで抗原刺激による増殖反応を調べたところ、W/Wvマウスと+/+マウスでともにホルムアルデヒド曝露群での有意な増加が認められ、W/Wvマウスのほうがより顕著であった(図1)。なお、*in vitro*での抗原刺激なし(-OVA)群でもホルムアルデヒド曝露による増加がみられた。次に、脾細胞の活性化の指標としてのサイトカイン産生を抗原と共に培養したときの上清で測定した。Th2タイプのサイトカ

インである IL-4(a), -5(b), -10(c)の産生では、ホルムアルデヒド曝露群と対照群とで有意な差はみられなかった(図2)。Th1 タイプのサイトカインである IFN- $\gamma$ 産生量(d)の比較では、+/+ マウスでは抗原刺激の有無にかかわらず産生はみられなかったが、W/Wv マウスでは抗原刺激により産生が誘導された。しかしながら、ホルムアルデヒド曝露の影響はみられなかった。

### 3) 抗原特異的抗体価の変動

全身的なホルムアルデヒド曝露の影響の指標としての抗原特異的抗体価について比較検討した。血漿中での抗 OVA IgE 抗体価においては、+/+ マウスでは曝露の影響は見られず、W/Wv マウスにおいてはホルムアルデヒド曝露群の方がやや低下傾向を示したが、有意差はみられなかった(図3a)。抗 OVA IgG1 抗体価については、両系統でまったく曝露の影響は認められていない(図3b)。抗 OVA IgG2a 抗体価においては、+/+ マウスでは曝露の影響は見られず、W/Wv マウスにおいてはホルムアルデヒド曝露群の方がやや増加傾向を示したが、有意差はみられなかった(図3c)。

### 4) 血漿中でのサイトカイン、神経ペプチドの変動

前報告で、ホルムアルデヒド曝露により皮膚病変の増悪が観察されていたので、炎症に関連するサイトカイン、ケモカイン、神経ペプチドについて血漿中での変動について検討した。好酸球の活性化因子であり、アレルギー反応の増悪に関連する IL-5 については、+/+ マウスではホルムアルデヒド曝露による低下傾向がみられ、W/Wv マウスにおいては逆にホルムアルデヒド曝露群の方がやや増加傾向を示したが、ともに有意な差はみられなかった(図4)。好中球の遊走にかかわる KC ケモカインと単球、活性化した T 細胞、未熟樹状細胞などのケモカインである Th2 タイプの反応に関連する MCP-1 を測定した。その結果、KC 産生では+/+マウスでの変動はなく、W/Wv マウスではホルムアルデヒド曝露による増加傾向がみられた(図5a)。MCP-1 産生では、ホルムアルデヒド曝露による有意な差はみられなかったが、W/Wv マウスではホルムアルデヒド曝露による増加の傾向が認められた(図5b)。知覚神経終末から分泌され神経性炎症誘導にかかわる Substance P を血漿中で測定したが、両マウスでホルムアルデヒド曝露による有意な増減はみられなかった(図6)。

次に、昨年度脳内で顕著な変動がみられた NGF 産生について、肺胞洗浄液と血漿中で測定して比較した。その結果、肺胞洗浄液中では、両マウスで増減は認められなかった(図7a)。血漿中では、両マウスでホルムアルデヒド曝露による増加の傾向が見られたが、有意な差ではなかった(図7b)。

### (5) 考察

W/Wv マウスと+/+マウスを用いて、2000 ppb ホルムアルデヒド曝露と抗原感作とで誘導されるくしゃみ様症状の機構について検討した。くしゃみ様症状の回数については差がなく、肥満細胞の関与はあまり大きくないと思われる(行動毒性の項参照)。他のアレルギー性炎症について比較すると、脾臓でのサイトカイン産生、血漿中でのケモカイン産生では、いずれも W/Wv マウスの方でホルムアルデヒド曝露による増強傾向が認められている。しかしながら、抗原特異的 IgE 抗体価や IgG1 抗体価の結果に見られるように、Th2 タイプへの偏りはみられなかった。肺胞洗浄液における炎症性細胞の集積については、W/Wv マウスと+/+マウスとで顕著な差が認められ、

肥満細胞欠損マウスの方がより好酸球が増加した知見は興味深い。しかしながら、好酸球の活性化、遊走に關与する Eotaxin や IL-5 などでの顕著な増加はみられていない。皮膚病変の増加に伴う炎症に關与すると考えられた NGF や substance P のレベルは、血漿中では特に変動はみられなかったが、局所においてはどのように変動しているのか不明である。全般的に、2000 ppb ホルムアルデヒド曝露により有意な差はみられなかったものの、W/Wv マウスの方がサイトカイン系の増加傾向が認められ、肥満細胞が欠損していることで肥満細胞の機能を補填するための別の機構が過敏に反応しようとしているのかもしれない。

#### ( 6 ) Abstract

Effect of repeated formaldehyde exposure on immune response to OVA in WBB6F1-W/Wv and WBB6F1-+/+ mice

To study the effect of repeated formaldehyde exposure on immune response to OVA in mast cell deficient WBB6F1-W/Wv and normal WBB6F1-+/+ mice, changes in the number of inflammatory cells of bronchoalveolar lavage fluid and cytokine production in plasma of mice were investigated. Formaldehyde exposure did not show any significant increase in total number of bronchoalveolar lavage fluid cells in both strains of mice. In bronchoalveolar lavage fluid in WBB6F1-W/Wv mice, exposure to formaldehyde significantly increased the numbers of eosinophils and lymphocytes. Exposure of +/+ mice to formaldehyde markedly increased the number of macrophages. There was a mild increase of IL-5 and KC production in plasma of formaldehyde-exposed WBB6F1-W/Wv mice. However, there was no significant difference of OVA-specific IgE and IgG1 antibody production in WBB6F1-W/Wv and +/+ mice. These things suggest that exposure of mast-cell deficient WBB6F1-W/Wv mice to 2000 ppb formaldehyde may induce a minor immune response to OVA.

低濃度長期ホルムアルデヒド曝露による免疫系への影響について、3年間の成果をまとめると以下のようなものである。

1 .ホルムアルデヒド曝露のみによる免疫系への影響としては、肺泡マクロファージの増加、脳内 IL-1 の増加 (2000ppb)、血漿中での MCP-1 の減少、KC と Substance P の有意な増加 (2000ppb) がみられた。これらの結果は、ホルムアルデヒド曝露のみでは 2000ppb の濃度曝露が免疫系に影響を及ぼし、過敏反応にかかわる可能性を示唆している。

2 .抗原感作とホルムアルデヒド曝露による免疫系の変動では、invitro での IFN- と IL-2 産生の抑制、あるいは MCP-1 の増加 (400, 2000ppb) がみられた。肺泡洗浄液中での IL-1 の低下(2000ppb)、NGF の 80, 400 での有意な低下が認められた。

3 .抗原感作と 2000ppb 曝露による肥満細胞欠損マウスへの影響については、くしゃみ様症状の増加に肥満細胞はあまり積極的には關与していないことが示唆され、このマウスは肺泡洗浄液中

の炎症性細胞の割合の変化を除いて血漿中成分においては顕著な変動はみられなかった。しかしながら、神経系の刺激を介したと考えられる皮膚病変は比較的早期から観察されたため、ホルムアルデヒドの感覚神経の刺激作用を解明するためには新たな指標になりえと考えられる。

4．抗原感作とホルムアルデヒド曝露の脳内での変動として、NGF が 80 と 400ppb で増加し、海馬での NGF mRNA の発現増強もみられた。また、400ppb で海馬と扁桃体における NMDA 型グルタミン酸受容体やドーパミン D1 受容体で顕著な変動が認められたことは、ホルムアルデヒド単独では分子発現の変動がみられないような濃度でも免疫刺激が加わることで脳における分子レベルの動きが誘導されることから、過敏状態に繋がる可能性を示唆している。

表1 FA曝露した肥満細胞欠損マウスの脾臓洗浄中の炎症性細胞数の変動

WBB6F1/J		総細胞数 ( $10^6$ )	M $\phi$	Ne	Eo	Ly
+/+	C	10.0 $\pm$ 0.7	3.84 $\pm$ 0.28	0.07 $\pm$ 0.02	4.96 $\pm$ 0.26	1.17 $\pm$ 0.10
	FA	12.1 $\pm$ 1.2	6.09 $\pm$ 0.55*	0.08 $\pm$ 0.02	4.69 $\pm$ 0.52	1.22 $\pm$ 0.11
w/w <sup>r</sup>	C	13.1 $\pm$ 1.2	7.58 $\pm$ 0.75	0.02 $\pm$ 0.01	4.16 $\pm$ 0.71	1.36 $\pm$ 0.17
	FA	12.9 $\pm$ 2.8	8.54 $\pm$ 0.92	0.02 $\pm$ 0.01	6.85 $\pm$ 1.01*	2.33 $\pm$ 0.13*

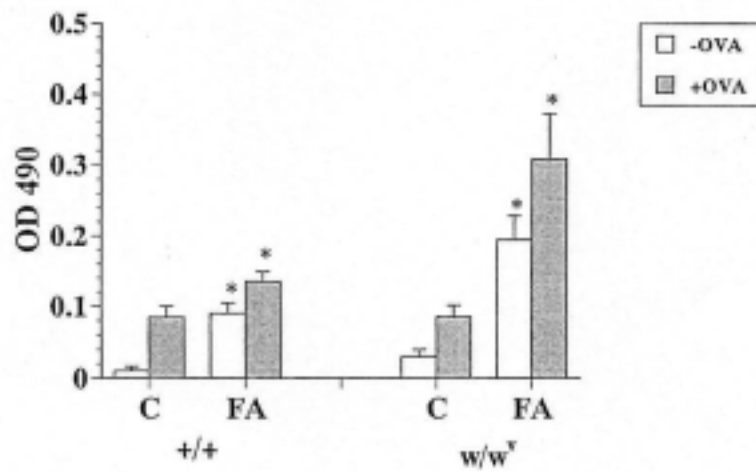


図1 FA曝露した肥満細胞欠損マウスの脾細胞の増殖反応

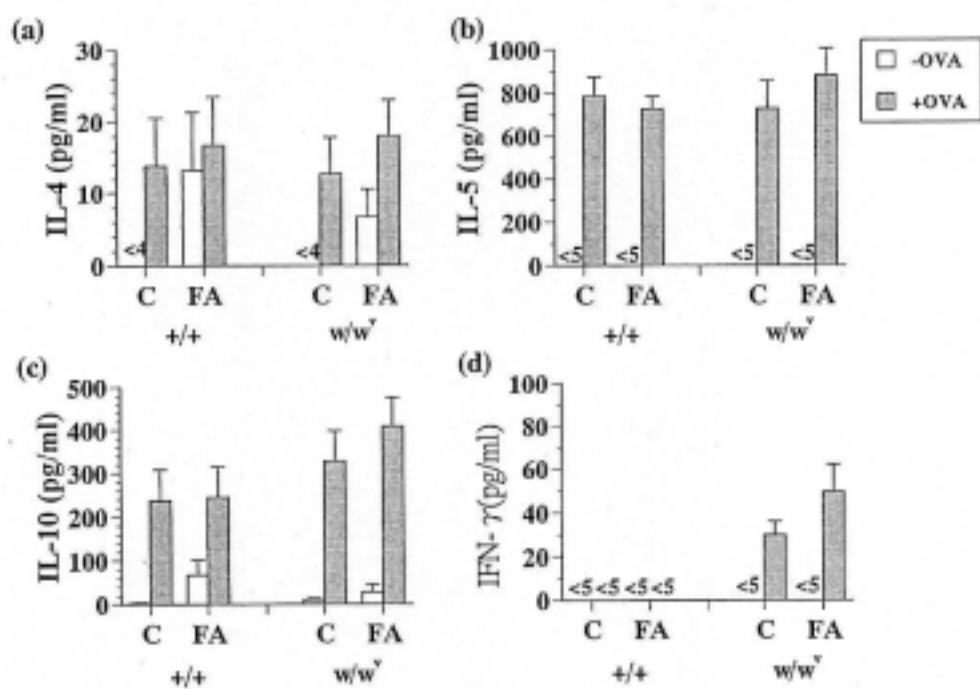


図2 FA曝露した肥満細胞欠損マウスの脾臓細胞培養上清中のサイトカイン産生

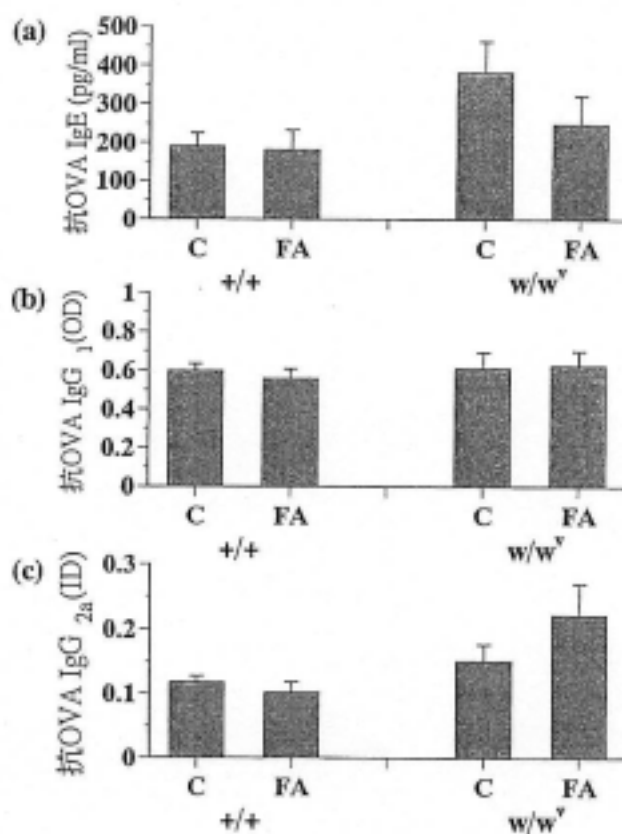


図3 FA曝露による血漿中の抗体価の変動

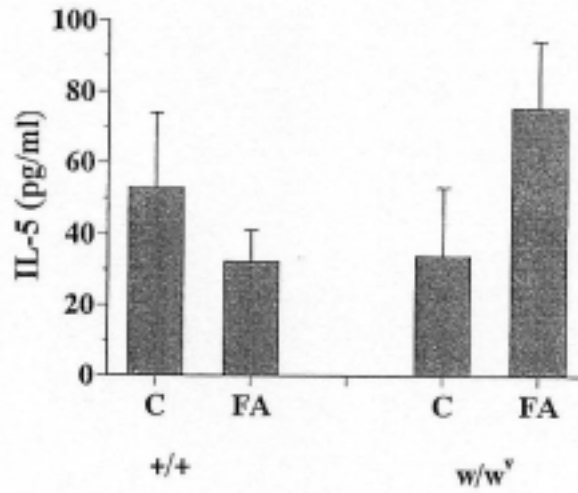


図4 FA曝露した肥満細胞欠損マウスの plasma中のIL-5産生

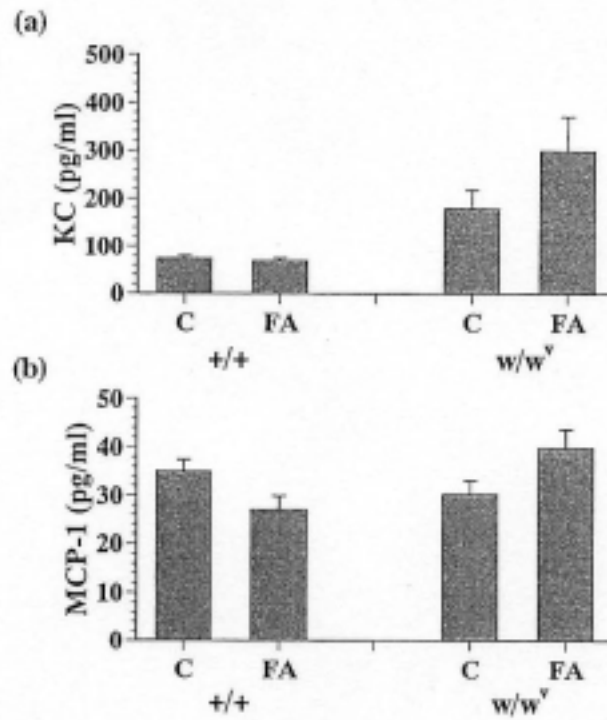


図5 FA曝露した肥満細胞欠損マウスの血漿中の KC(a)と MCP-1(b)産生



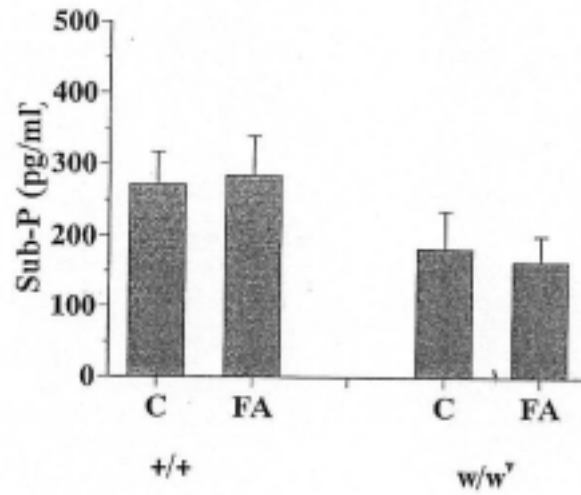


図6 FA曝露した肥満細胞欠損マウスの血漿中のSubstance-P量

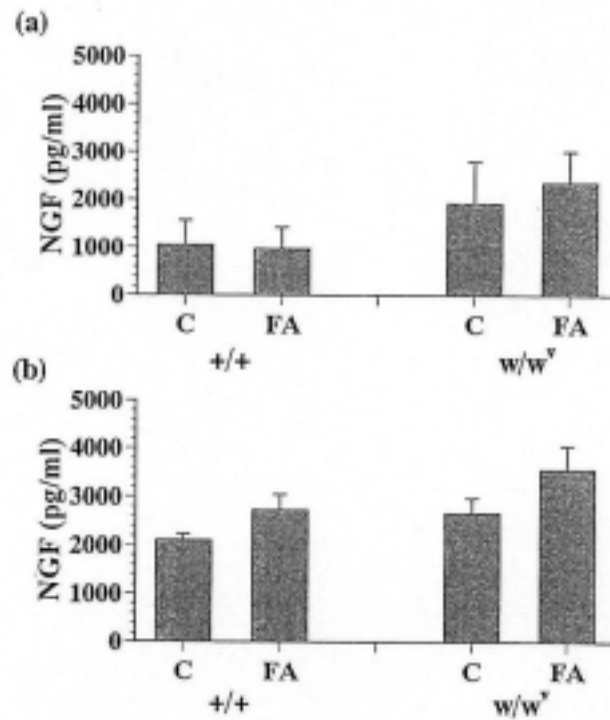


図7 FA曝露した肥満細胞欠損マウスのBALF中(a), 血漿中(b)のNGF量