

## 5. トルエン吸入曝露によるマウスへの生体影響に関する 病理組織学的検索 －気道粘膜上皮の変化と炎症細胞の動態を中心として－

研究協力者：佐藤房枝・櫻田尚樹・嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

### （1）研究要旨

トルエン曝露およびアレルギーモデルとしての OVA 感作群における気道系を中心とした病理学的検索を実施した。その結果、鼻腔呼吸上皮において OVA 感作群では好酸性変化と好酸球の浸潤を認めたがトルエン曝露の影響は観察されなかった。また粘液産生細胞である杯細胞の出現頻度は、個体差はあるものの呼吸上皮領域においてトルエン単独群でも OVA 感作群でも認められ刺激物質の吸入に対する共通的な鼻道上皮の変化と考えられた。すべての群において、肥満細胞の浸潤はなかった。気管・肺の組織においては OVA 感作により杯細胞の増生、肥満細胞の上皮内浸潤を認めたが、トルエン曝露による修飾作用は観察されなかった。以上、OVA 感作によるアレルギー炎症所見は観察されたが、トルエン曝露によってこれらが修飾される様子は観察されなかった。

### （2）目的

溶剤やガソリンの添加剤として広く利用されているトルエンは、眼、皮膚、気道に刺激性を示し、高濃度長期吸入曝露では中枢神経毒性が指摘されている化学物質である。また、化学物質過敏状態やシックハウス症候群においては、アレルギーの発症に関与している可能性も懸念されている。

今回、本態性多種化学物質過敏状態への関与を探る一端として、トルエンの曝露濃度を作業環境評価基準の管理濃度である 50ppm とし3ヶ月間吸入曝露して、マウスへの生体影響を気道粘膜上皮の変化と炎症細胞の動態を中心に、病理組織学的に検索した。さらに、アレルギーモデルとして卵白アルブミン（OVA）を前投与したマウスでも同様にトルエンの吸入曝露をおこない、アレルギー発症におけるトルエンの二次的効果についても検討した。

### （3）方法

別項に述べられているように、10週齢、雌の C3H/HeN マウス 20匹を用いた。マウスは1群を5匹とし、OVA もトルエンも曝露しない対照群、トルエンの単独曝露群、OVA の単独曝露群、OVA とトルエンの重複曝露群の4群に分けた。トルエンは、濃度 50ppm のチャンバー内で6時間/日、5日/週で3ヶ月間吸入曝露した。OVA 感作に関しては曝露の項目を参照いただきたい。

曝露終了後、マウスをネンブタール深麻酔下に失血死させてから断頭し、気管・肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、心臓、膵臓、腸管（食道・胃・小腸・大腸）、卵巣・子宮、膀胱を採取して、4%パラホルムアルデヒド/0.1M 磷酸緩衝液(pH7.4)にて浸漬固定

した。頭部は、皮膚、下顎、脳を取り除き同固定液で浸漬固定した後、EDTA 脱灰液（和光純薬）にて脱灰して4つの部位に切り出した（図1）。すべての臓器は、型どりのパラフィン包埋と薄切をおこない、HE 染色標本を作製した。さらに、肺・気管ならびに頭部の組織は、PAS 反応、Giemsa 染色、Toluidin blue 染色を施した。

#### （4）結果

鼻腔では、呼吸上皮の細胞質内に HE 染色でエオジンに好染した小体が出現する好酸性変化（写真1）が、対照群の2匹、トルエン単独曝露群の2匹、OVA 単独曝露群の5匹、OVA・トルエン重複曝露群の5匹に観察された。好酸性変化を示す部分の PAS 反応は陰性であった。その他に、トルエン単独曝露群では鼻道の粘膜に組織学的な変化は確認されなかったが、OVA 単独曝露群と OVA・トルエン重複曝露群では、呼吸上皮の粘膜下に少数の好酸球の浸潤が確認された（写真2）。好酸球の浸潤は、OVA 単独曝露群と OVA・トルエンの重複曝露群で同程度であった。また、OVA を曝露した2つの群において、呼吸上皮領域に PAS 反応にて陽性を示す粘液物質を含有した杯細胞が多数観察されたが、これはトルエン単独曝露群でも頻繁に出現し、かなり出現頻度は下がるものの対照群にも同様の陽性像が観察された（写真3）。これら杯細胞の過形成には、個体差があった。Toluidin blue 染色にて、肥満細胞の上皮内への浸潤を検索したが、すべての群において、肥満細胞は上皮下組織に分布しており、扁平上皮、呼吸上皮、嗅上皮のいずれの上皮内にも肥満細胞の浸潤はなかった。

気管・肺の組織においても、トルエンの単独曝露群と対照群との間に組織学的な差はみられなかった（写真4）。OVA 単独曝露群と OVA・トルエン重複曝露群では、気管支から末梢の終末細気管支領域の上皮に著明な杯細胞の増生（写真5）を認め、気管支ならびに血管周囲にはリンパ球・形質細胞の浸潤（写真6）が観察された。Toluidin blue 染色にて、頭部と同様に気管・気管支上皮内への肥満細胞の浸潤を検索した結果、OVA を曝露した2つの群に肥満細胞の上皮内浸潤がみられた（写真7）が、トルエン曝露群ではみられなかった。OVA 単独曝露群と OVA・トルエン重複曝露群との間で、気管支の杯細胞の増生、炎症細胞の浸潤、上皮内への肥満細胞の浸潤所見に差はなかった。

肝臓では、トルエン曝露群の1匹、OVA 単独曝露群の1匹、OVA・トルエン重複曝露群の1匹において、肝細胞間に好酸球を含む炎症細胞の小さな集簇像が少数観察された（写真8）。

その他、心臓、脾臓、胸腺、腎臓、膵臓、腸管（食道・胃・小腸・大腸）、卵巣・子宮、膀胱には、組織学的な変化はみられなかった。

#### （5）考察

マウスを用いたトルエンの吸入曝露試験では、120、600、1200ppm 濃度にて、6.5 時間/日、5 日/週で2年間曝露した結果、鼻・気道において炎症、びらん、呼吸上皮の変性や嗅上皮の化生等の所見は見られず、がん原性も認められなかったという報告がある<sup>1)</sup>。

今回、本態性多種化学物質過敏状態へのトルエンの関与を探る一端として、マウスに曝露実験としては比較的低濃度（50ppm）トルエンを6.5時間/日、5日/週で3ヶ月間吸入曝露し、その生体影響について検討した結果、トルエン単独曝露群で観察された組織学的変化は、鼻道を覆う呼吸上皮の好酸性変化ならびに杯細胞の過形成、肝臓における好酸球を含む炎症細胞の集簇の3つであった。

呼吸上皮の好酸性変化は、老齢動物によく観察されることより加齢変化と考えられているが、化学物質の投与でも増強するという報告もある<sup>2)3)</sup>。今回、トルエン曝露群は対照群と出現頻度に差がなく加齢変化とみなされるが、OVA曝露群においてはすべてのマウスにこの好酸性変化が出現していたことから、加齢変化のみではなくOVA曝露による増強があったことが推測される。

トルエン吸入曝露にみられた呼吸上皮の杯細胞過形成は、OVA曝露群においてもみられ、また対照群でも出現頻度は低いものの同所見が観察されることから、刺激物質の吸入に対する共通的な鼻道上皮の変化と考えられる。杯細胞の過形成は、多量の粘液産生と鼻腔内放出を示唆し、鼻汁の亢進が推察される。

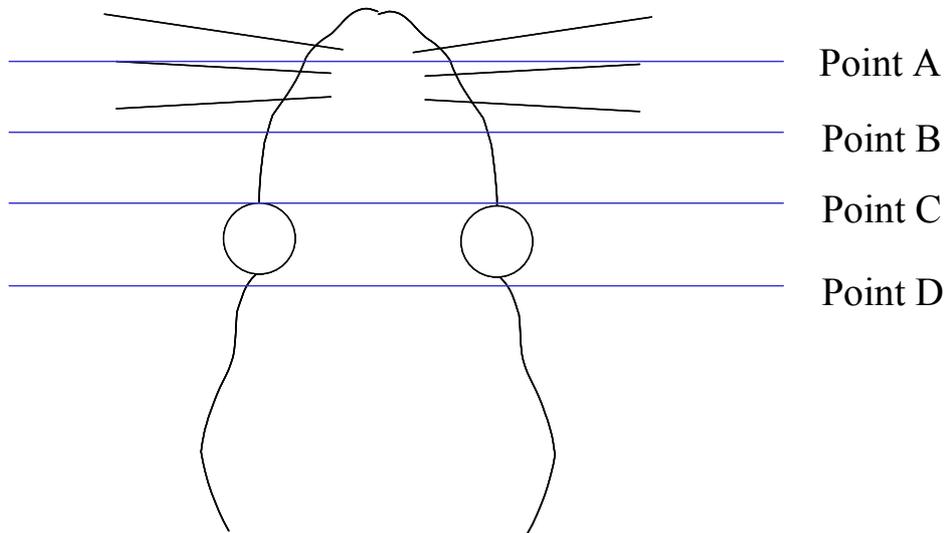
また、肝臓における好酸球を含む炎症細胞の小集簇像は、トルエン曝露群、OVA単独曝露群、OVA・トルエン重複曝露群において、それぞれ5匹中の1匹に観察されている。いずれも所見に差はなく、その散発的な発生は感受性の個体差を考えさせるが、肝臓で観察されたこの好酸球を含む炎症細胞の小さな集簇像が、トルエンあるいはOVAに関係したアレルギー性の変化であるかどうかを考察するには個体数が少ないと思われる。

OVAを吸入曝露した群の組織学的な変化は、鼻道内呼吸上皮における好酸性変化と杯細胞過形成の他に、鼻道上皮下での好酸球の増加、気管上皮内への肥満細胞の浸潤、気管支から終末細気管支領域での著明な杯細胞の増生と気管支・血管周囲のリンパ球・形質細胞の浸潤に特徴づけられていた。鼻道上皮下の好酸球の増加ならびに気管上皮内への肥満細胞の浸潤はアレルギー性変化と考えられ、また気管支・血管周囲へのリンパ球・形質細胞の浸潤は、慢性の気管支炎の存在を示唆する所見である。これらの組織学的な変化のうち、鼻道呼吸上皮での好酸性変化と杯細胞過形成を除いては、トルエン単独曝露群には認められておらず、OVA曝露による生体変化と考えられる。また、OVA単独曝露群とOVA・トルエン重複曝露群との間でこれら所見に差がみられなかったことより、病理組織学的な検索からは、アレルギーの発症にトルエンの吸入曝露が二次的な影響を及ぼしているという結果は得られなかった。

## （6）参考文献

- 1) James H et al: Absence of Carcinogenic Activity in Fisher Rats and B6C3F1 Mice Following 103-Week Inhalation Exposures to Toluene. *Int J Occup Environ Health*. 2003; 9(2):138-146
- 2) 日本毒性病理学会編: 上部気道. 毒性病理組織学. 2000; 99-116
- 3) Buckley LA et al: The toxicity of dimethylamine in F-344 rats and B6C3F1 mice following a 1-year inhalation exposure. *Fundament Appl Toxicol* 1985; 5: 341-352

図1 頭部の切片作成部位



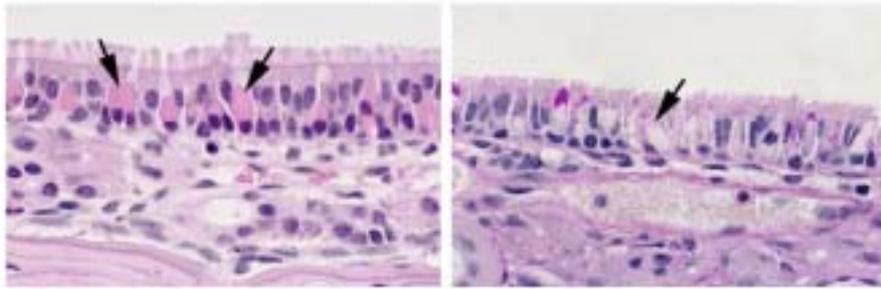


写真1 鼻中隔呼吸上皮の好酸性変化 (OVA 単独曝露群, point B)  
 左:呼吸上皮の細胞質内に好酸性小体(矢印)がみられる。HE染色 40×4  
 右:好酸性小体(矢印)はPAS反応で陰性を示している。PAS反応 40×4

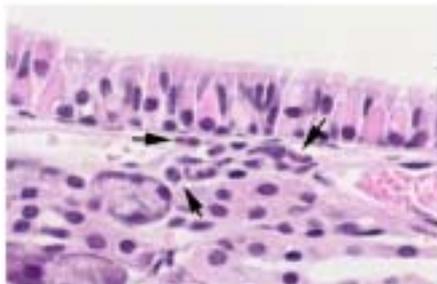


写真2 鼻中隔呼吸上皮下の好酸球浸潤像  
 (OVA 単独曝露群, point B)  
 呼吸上皮下の間質に好酸球(矢印)  
 の浸潤がみられる。  
 HE染色 40×4

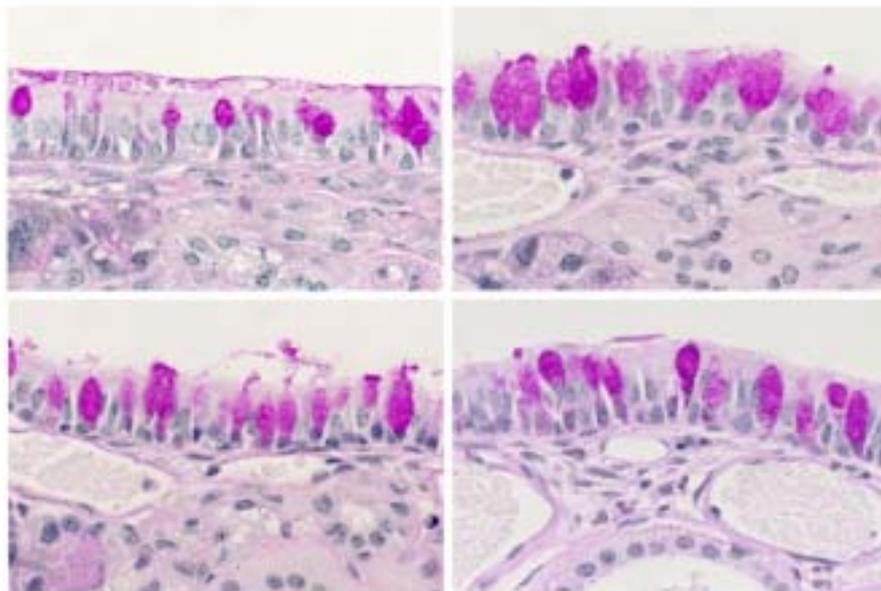


写真3 鼻中隔呼吸上皮の杯細胞過形成  
 左上:対照群, point B  
 右上:トルエン単独曝露群, point B  
 左下:OVA単独曝露群, point B  
 右下:OVA・トルエン重複曝露群, point B  
 対照群の一部でも杯細胞の粘液産生がみられるが、曝露群では一様に著明な  
 粘液産生を示す杯細胞の増加がみられる。 PAS反応 40×4