

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学 (進学)

氏名 大塚 亮一

指導教官 土井 邦雄

論文題目 Studies on the responses of the rat respiratory system to environmental chemicals
and allergens

(環境化学物質およびアレルゲンに対するラットの呼吸器系の反応に関する研究)

近年問題となっているシックハウス症候群(SHS)は、気密性の高い住宅に住むことによって様々な体調の悪化が引き起こされる疾患で、ダニやカビなどの生物由来の因子、建材や家具に含まれる化学物質由来の因子など数多くの環境物質が原因になるといわれている。そのなかで、ホルムアルデヒド(HCHO)は最も重要な SHS 誘発物質と考えられ、喘息を引き起こしたり増悪させたりするといった報告から、アレルギーとの関連も強く疑われている。ところで、Brown Norway (BN)ラットは、アレルゲン感作に対する IgE の高産生能やアレルゲン吸入曝露に伴うアレルギー性気道平滑筋収縮反応の強さ、気道過敏性の獲得、遅発型喘息反応の発現、肺の反応におけるロイコトリエンの関与および気道への好酸球やリンパ球などの炎症細胞浸潤といったヒトの気管支喘息との類似性が証明され、アレルギー性喘息に関する研究に多く用いられている。しかし、HCHO のような化学物質の吸入に対する反応に関する報告はない。そこで、本研究では、BN ラットに SHS 関連物質である HCHO やアレルゲンを吸入曝露した際の呼吸器系の反応を明らかにする目的で、一般毒性試験に繁用されている Fischer 344 (F344)ラットを対照に、種々の検索を行った。本論文は3章から成るが、以下に各章の要旨を記載する。

第1章：呼吸器系の組織学的特性

BN ラットの呼吸器系の組織学的特性について、組織中のサイトカインの発現とあわせて検索した。BN ラットでは、気管上部から下部に至るまで、気管腺が F344 ラットに比べて顕著に発達していた。ただし、気管腺から産生される粘液の性状には両系統ラット間で差は認められなかった。また、鼻粘膜および肺におけるサイトカイン(IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-5)の mRNA の発現について検索したところ、肺では、有意ではないが、BN ラットで Th2 サイトカイン(IL-4 および 5)、特に IL-4 の発現が強く、F344 ラットでは Th1 サイトカイン(IFN- γ および IL-2)、特に IFN- γ の発現が強い傾向がみられ、鼻粘膜では BN ラットの方が F344 ラットよりも IL-2 および IL-4 の発現が高い傾向が認められた。

BN ラットの肺では好酸球やマクロファージを主体とする肉芽腫病変が高い頻度で認められたが、F344 ラットではそのような病変はまったく認められなかった。BN ラットの肺で認められた肉芽腫病変については、床敷に用いている木屑に由来する粉塵がその原因ではないかと考え、飼育条件を変えて加齢に伴う病変の発現頻度を検索した。その結果、飼育環境の違いに関係なく、加齢に伴い肺肉芽腫病変の発現頻度の増加が認められた。また、本病変は帝王切開で取り出した胎児を SPF ないし無菌状態で飼育した BN ラットの肺でも認められたとの報告がある。こうしたことから、BN ラットにおける自然発生性の肺の肉芽腫病変は、内因性の要因によるものであることが示唆された。

第2章：ホルムアルデヒド吸入に対する呼吸器系の反応

1% HCHO 水溶液を 1 日 3 時間、週 5 日の条件で、2 週間吸入させ、呼吸器系の反応を検索した。鼻腔では、両系統で、本来呼吸上皮の存在する鼻腔前部の中隔で扁平上皮化生がみられ、F344 ラットでは角化層が明瞭に認められた。同様に呼吸上皮が存在する頭蓋腔側では、BN ラットでは明らかな変化がみられなかったのに対し、F344 ラットでは線毛を失った丈の低い上皮細胞が重層化して認められた。鼻腔前部と同様に呼吸上皮が通常認められる鼻腔中部の中隔でも、両系統ラットで粘膜上皮の重層化や扁平上皮化生が認められたが、BN ラットでは病変は中隔の比較的下部に限られていたのに対し、F344 ラットではほぼ全域で病変が認められた。嗅上皮が存在する頭蓋腔側では、BN ラットではほぼ正常であったのに対し、F344 ラットでは上皮の変性、壊死および剥離像が認められた。鼻腔後部の本来呼吸上皮がみられる下部でも、BN ラットでは正常であったが、F344 ラットでは上皮の重層化ないしは軽度の扁平上皮化生が認められた。気管については、BN ラットでは粘膜上皮は多列線毛上皮

の形態を維持していたのに対し、F344 ラットでは上皮の線毛は消失し、扁平上皮化生への移行過程を思わせる丈の低い上皮の重層化がみられた。肺では F344 ラットの気管支で粘膜上皮の変性、重層化が認められたが、BN ラットの気管支は正常であった。また、BN ラットの肺では、第 1 章で述べたと同様な肉芽腫病変が認められたが、その出現頻度および強度は HCHO 吸入によって何ら影響を受けなかった。

上記と同様の条件で 3 日、5 日および 5 日間曝露後 3 日目の呼吸器系を組織学的に検索した結果、鼻粘膜においては F344 ラットで 3 日目から著しい炎症反応が認められたのに対し、BN ラットではより軽度の炎症が遅れて発現することが示された。また、サイトカインの産生量について検索したところ、吸入期間が延びるに従って BN ラットの鼻粘膜で IL-4 の mRNA のレベルが減少した。このように、HCHO の吸入曝露に対しては、BN ラットよりも F344 ラットの呼吸器系の反応の方が強かった。

第 3 章：アレルゲンの感作・吸入に対する呼吸器系の反応とホルムアルデヒド吸入の影響

アレルギー研究に多用されている卵白アルブミン(OVA) 1 mg を水酸化アルミニウムゲル 4mg とともに 1ml の生理食塩水に溶解した溶液を、2 週間おきに 2 回背部皮下に 1ml/匹投与して感作し、2 回目の感作の 2 週間後に 1%OA 生理食塩溶液を 30 分間吸入曝露した。吸入曝露は、超音波式ネブライザで生成された噴霧質を、エアポンプによって 1 l/min の流量で約 10 l のチャンバーに送り込んで全身的に行った。その結果、BN ラットでは 6 時間後には比較的大きな巣状出血が散在性に認められ、その周囲に好酸球、マクロファージを主体とする細胞浸潤がみられた。F344 ラットでは BN ラットでみられたような出血巣は認められず、血管や気管支周囲に軽度の好酸球、リンパ球等の集簇がみられるのみであった。吸入曝露 12 時間後の肺では、BN ラットでは出血巣は縮小し、一方で肉芽腫様病変の形成が認められた。それに対し、F344 ラットでは顕著な病変は認められなかった。24 時間後になると、BN ラットでは出血巣はほとんど消失し、肉芽腫様病巣の形成がより顕著になった。一方、F344 ラットでは、病変はごく軽微となった。また、24 時間後までのサイトカイン・ケモカイン(IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、eotaxin および MCP-1)の発現の動態を検索した結果、両系統ラットともにサイトカイン・ケモカインの発現が亢進したが、BN ラットではとくに IFN- γ の値が曝露後 24 時間目まで高値を維持していた。また、BN ラットの対照群(非感作・アレルゲン曝露)で肉芽腫が認められた 1 例では、IFN- γ が対照群の中で最も高値を示した。

ついで、BN および F344 ラットに HCHO と OVA を組み合わせて曝露し、それに対する反

応について検索した。すなわち、0.1% HCHO 水溶液または蒸留水イオン交換水を 1 日 3 時間の条件で 5 日間吸入曝露し、HCHO あるいはイオン交換水曝露 5 日目の直後およびその 2 週間後に、両群に 0.5% OVA 生理食塩水溶液を鼻部曝露して感作し、さらに 1 週間後に 1% OVA を鼻部曝露し、その 3 日後に腹大静脈から採血して血清を得るとともに、肺を採材した。肺の組織学的検索の結果、F344 ラットでは顕著な変化はみられなかった。一方、BN ラットでは、上記の OVA のみの曝露実験と同様の肺病変が認められたが、HCHO 群と水曝露群の間には顕著な差は認められなかった。また、ELISA を用いた抗体産生反応に関する解析の結果、F344 ラットの HCHO 曝露群で血清中の総 IgE レベルが水曝露群に比べて有意に上昇していた。一方、実験 1 と同様のサイトカインに関する解析の結果、BN ラットで IL-2 が有意に高値を示したのをはじめ、Th1/Th2 サイトカインの値が HCHO 群で水曝露群よりも高い傾向がみられた。このように、OVA 曝露に対しては BN ラットが F344 ラットよりも高い反応性を示し、IgE 抗体産生に関しては F344 ラットが HCHO 曝露の影響をより受けやすいことが示唆された。

以上、本研究の結果から、BN ラットは F344 ラットとは異なり、呼吸器系に直接的な傷害作用を持つ HCHO に対しては抵抗性を示すが、OVA のようなアレルゲンに対しては強い反応性を示すことが示唆された。その原因としては、BN ラットの呼吸器系で IL-4 が高度に発現していることが影響している可能性が示唆された。また、BN ラットの肺の自然発生性肉芽腫病変に関しては、HCHO のような化学物質によっては誘発されることも影響を受けることもなく、OVA の感作・曝露により増強されることから、本来内因性の要因によって惹起される病変がアレルゲンの吸入によって増強されること、および、その病変の形成過程に IFN- γ が関与していることが示唆された。

このように、BN ラットは従来から指摘されている気道過敏症の動物モデルとしてのみならず、肉芽腫性肺炎の成因を解明する上でも非常に有用な動物モデルであることが示された。今後は、BN ラットの自然発生性の肺肉芽腫病変の病理発生を解明し、併せて、アレルゲンとして作用する各種環境物質の呼吸器系、特に肺の肉芽腫病変、への影響を検索していきたい。