

## II. マウスの動物モデルに関する研究

## 概 要

本態性多種化学物質過敏状態 (Multiple Chemical Sensitivity; MCS) は多種類の化学物質の低濃度曝露により神経系、免疫系あるいは内分泌系が過敏な状態になり、それらの間の情報伝達に異常状態を引き起こすことがその発症に関与していると考えられている<sup>1)</sup>。中枢神経系に作用点を持つ薬物群 (向精神薬) を反復して投与した場合、作用の強度が減弱する場合を耐性toleranceと呼び、増大する場合は感受性亢進sensitizationあるいは逆耐性reverse toleranceと呼ばれ耐性や感受性亢進が生じる事は良く知られている。C3Hマウス (10週雌) を材料として用い、化学物質の脳・神経-免疫系への影響についてsensitizationを検討することによって非アレルギー性の過敏状態に関する知見を得ることにより「MCS」の実態の究明を目指す実験的研究を行った。本年度は、化学物質としてホルムアルデヒドを取り上げ、0, 80, 400, 2000ppb低濃度長期曝露 (3ヶ月) により以下の結果を得た。

### ・嗅細胞における化学物質の受容体への影響

主嗅覚系はにおいなどの揮発性の化学物質の受容体として、鋤鼻系はフェロモンの受容体としてそれぞれ主嗅球、副嗅球への情報を伝達しており、この伝達系への化学物質の影響について検討した。その結果、2000ppb曝露では嗅上皮の厚さや嗅細胞数に顕著な差はみられなかったが、嗅細胞の嗅小胞や繊毛の変性、支持細胞表面の微絨毛の脱落がみられ嗅覚の感覚障害を引き起こしている可能性が支持された。

### ・視床下部、下垂体からのホルモン産生の検討

ストレッサーに対する反応経路として視床下部-下垂体-副腎皮質の経路が提唱されており、低濃度化学物質がこの経路をどのように修飾するか検討した。その結果、視床下部室旁核における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 免疫陽性ニューロンの増加が400 と2000ppb曝露群で観察された。下垂体でのACTH mRNAの発現は曝露量依存的に増加した。副腎皮質における形態学的変化はみられなかったが、血清中のコルチコイド量では、80ppbで有意差がみられた。なお、本項目においては今後一群あたりの匹数を多くして再検討する必要があると示唆された。

### ・脳内海馬での情報処理変化の検索

海馬は脳辺縁系の一部で、学習、記憶などの高度情報処理に重要な役割を果たすと考えられる。その複雑な情報処理の生理学的基盤は、シナプスの可塑的变化、情報処理の変化であると考えられる。本研究では、化学物質曝露を受けた動物の海馬の入出力応答、ペアパルスプロファイル、シナプスの長期増強を電気生理学的に

検討した。その結果、すべての曝露で海馬における形態学的変化はみられなかったが、400と2000ppbで神経細胞の興奮を効率よく制御する抑制性シナプス回路の反回抑制系の減弱が認められた。また、海馬での長期増強の低下が2000ppbでみられ、これらの結果は神経細胞の情報処理への影響を示唆するものである。

#### ・低濃度長期曝露の免疫系への影響

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、それぞれホルムアルデヒドを曝露し脳内、呼吸器、血中におけるサイトカイン、抗体価の変動を比較検討した。その結果、肺における炎症性反応については、マクロファージ数の増加はみられたが、洗浄液中で好中球、好酸球、リンパ球の集積、炎症性サイトカインの増加はみられなかった。免疫臓器である脾臓でのサイトカイン産生においては、Th1タイプのIL-2とIFN- $\gamma$ においては顕著な抑制が400ppbでみられたが、Th2タイプのIL-4とIL-5ではみられなかった。免疫グロブリンサブクラスの変動では、ホルムアルデヒドのみの曝露では総IgG2aの低下が400ppbでみられ、抗原で免疫してホルムアルデヒド曝露した群では抗原特異的な抗体産生に変化はみられなかった。さらに、脳内での炎症性サイトカイン量の測定では、IL-6とTNF $\alpha$ では検出できなかったが、IL-1 $\beta$ では曝露濃度依存的で2000ppbで有意な増加が認められた。

#### ・低濃度長期曝露の行動毒性への影響

平面上での運動活性の指標としての移所運動活性において化学物質曝露によりsensitizationが誘導されるか検討した。その結果、3ヶ月曝露では、2000ppbで移所運動活性の増加がみられたが、anti-depressantのbupropionによる感受性の亢進には対照群と曝露群とで差はみられなかった。

さらに、曝露途中から観察されたくしゃみ様行動については、2000ppbでホルムアルデヒド曝露濃度に依存した増加を示したので、呼吸上皮の電顕観察や自律神経作用との関連について今後検討するつもりである。

以上、これらの結果から、嗅覚からの情報の入力障害、視床下部一下垂体系の活性化、海馬における興奮性増大の可能性が示唆され、さらに免疫系における細胞性免疫にかかわるTh1タイプの抑制、ならびに脳内における炎症性サイトカインの変動などから、400ppbといった比較的低濃度ホルムアルデヒド曝露が神経—内分泌—免疫間のバランスに混乱を生じて過敏になる可能性が示されたが、WHOの基準値に相当する80ppbではおおむね明らかな反応はみられなかった。

#### 引用文献

1. Rowat, SC (1998) Environ Health Perspect, 106, 85-109

## 吸入曝露装置および曝露条件

### 1. ホルムアルデヒド吸入曝露

ホルムアルデヒドの吸入曝露は、産業医科大学・産業保健学部において行った。なお、動物実験の実施にあたっては、産業医科大学・動物実験および飼育倫理委員会に申請を行い許可を得たうえで実施した。

以下に曝露方法の概要を示す。

### 2. 吸入曝露装置

吸入曝露実験装置の概略図を図1に示す。装置はホルムアルデヒドのガス発生装置と、曝露チャンバーとから構成されている。

ホルムアルデヒドガスの発生には、パラホルムアルデヒドからの昇華現象を利用したホルムアルデヒドガス発生装置(1) (Hori and Arashidani, 1997) を用いた。この装置を一定温度の室内 (20℃) に設置し、空気を通じることにより、一定濃度のホルムアルデヒドガスを発生させた。ガスの発生量はパラホルムアルデヒドの充填量および空気流量でコントロールした。

曝露チャンバー (容積 400L) (6) はステンレス製で、下部に尿・糞を廃棄処理するための容器と配管(7)が取り付けられている。また、チャンバー側面には、内部の空気をサンプリングするためのガス採取口が取り付けられている。このチャンバーの下部は常設の排ガス処理装置(9)に接続されており、プロア(10)を用いて処理された空気を排気することにより、チャンバー上部から HEPA フィルター(8)を通した室内空気を希釈空気として導入する。ホルムアルデヒドガスを含む空気は、チャンバー上部の T 字型の配管部の側面から導入され、希釈空気と混合されてチャンバー内に入る。

### 3. 実験動物

実験動物には、日本エスエルシー株式会社より購入したマウス (C3H/He、雌、10週齢) を用いた。マウスは8週齢で入荷し、馴化させるために約2週間チャンバー内で飼育した。これを2000ppb曝露群、400ppb曝露群、80ppb曝露群およびコントロール群の4群に分け、曝露群には調整したホルムアルデヒドガスを、また、コントロール群には清浄空気のみを曝露した。また、一部のマウスはルーム・コントロールとして入荷時より特定病原体除去 (specific pathogen free; SPF) 環境下で飼育継続し実験に供した。

### 4. 濃度調整と分析

濃度調整には、ホルムテクター (高感度ポータブル型ホルムアルデヒド検知器、XP-308、新コスモス電機株式会社) を用いて測定した値を基準に調整した。この検知器には定電位電解式センサーが用いられており、ホルムアルデヒドガスを特定の電位で電気分解し、その際に生じる電解電流を検知してガス濃度に換算する

ことができる。最小目盛りは0.01ppmで検知範囲は3.00ppmまでである。

一方、化学分析による濃度測定は、2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)を含浸したシリカゲルカラムに気中ホルムアルデヒドを捕集し、アセトニトリルで溶出後、高速液体クロマトグラフィーにて分離・定量を行った。ホルムテクターと化学分析による濃度を比較した結果を図2に示す。ホルムテクターの指示値は化学分析による値よりもやや高い値を示したが、両者には良い相関( $r=0.997$ )が見られた。本実験では化学分析による値を採用したが、日々の濃度調整およびチャンバー内濃度のモニタリングはホルムテクターで行い、図2を用いて化学分析の値に換算するとともに、定期的に化学分析を行い濃度を確認した。ホルムテクターによる濃度の日内変動の測定結果の一例を図3、4に示す。16時間にわたり、ほぼ一定濃度でホルムアルデヒドガスが発生していることがわかる。化学分析による濃度は、2000ppb曝露では $1840 \pm 180$ ppb ( $n=9$ )、400ppb曝露では $440 \pm 40$ ppb ( $n=10$ )、80ppb曝露では $80 \pm 10$ ppb ( $n=9$ )であった。また、コントロール群のホルムアルデヒド濃度は溶媒ブランクを差し引くとほとんど検出されなかった。

## 5. 曝露方法

マウスをチャンバー内に入れ、ホルムアルデヒドガスを含む空気および希釈空気をチャンバー内に導入したのち、チャンバー側面からホルムテクターを用いて空気を定期的に採取し、濃度を経時的にモニターした。

曝露のタイムスケジュールを図5に示す。曝露時間は午後6時から翌朝10時までの16時間とし、最大3ヶ月の曝露を行った。また、曝露中は自由摂食とした。

上記、チャンバー内による曝露のみの群をA群(無前感作群)として、一部のマウスにおいてはチャンバーによる曝露開始前に一度だけ高濃度で感作曝露したB群(前感作群)を設けた。B群の高濃度感作としてはパラホルムアルデヒド溶液20mg/kgを1回腹腔内投与した。

## 6. 体重変化

各チャンバーのマウスを週1回ずつ体重を測定した。体重の変化を図6に示す。いずれの群のマウスも特に有意な相違なく体重の増加が観察された。

曝露条件等の要約を下記に示す。

曝露チャンバー；図1

曝露条件

曝露期間 2000年10月30日 2001年2月9日  
月曜日から金曜日の週5日間曝露  
2001年1月18日より随時解剖に入った。

曝露時間 1日16時間 PM6:00~AM10:00 (図5)

温度 室温20℃ チャンバー内23℃

湿度 40-50%

照明 AM7:00 ON PM7:00OFF

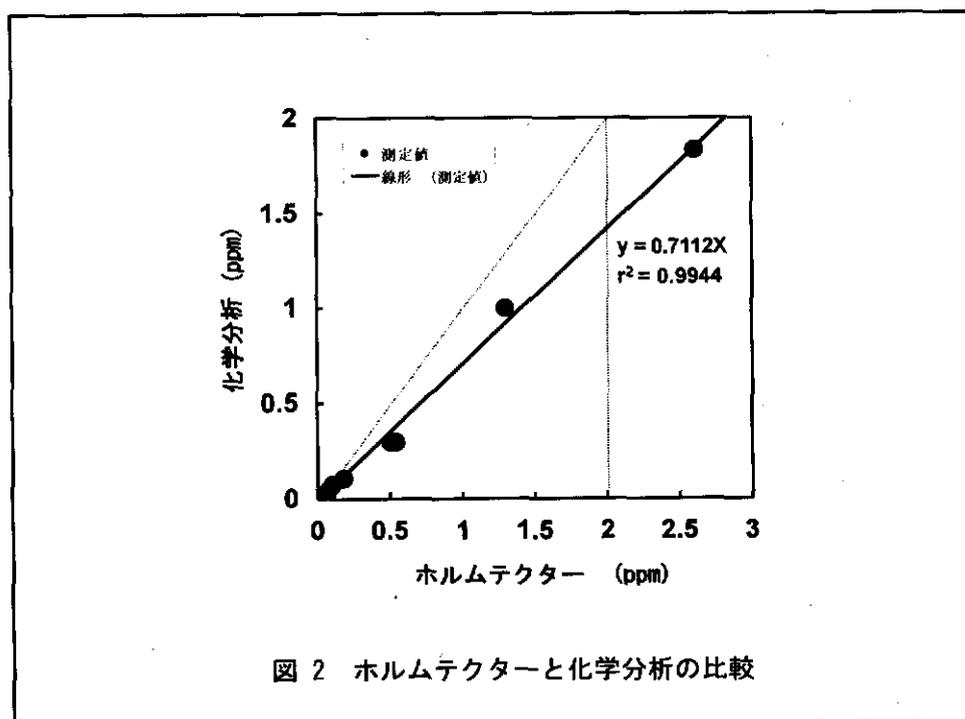
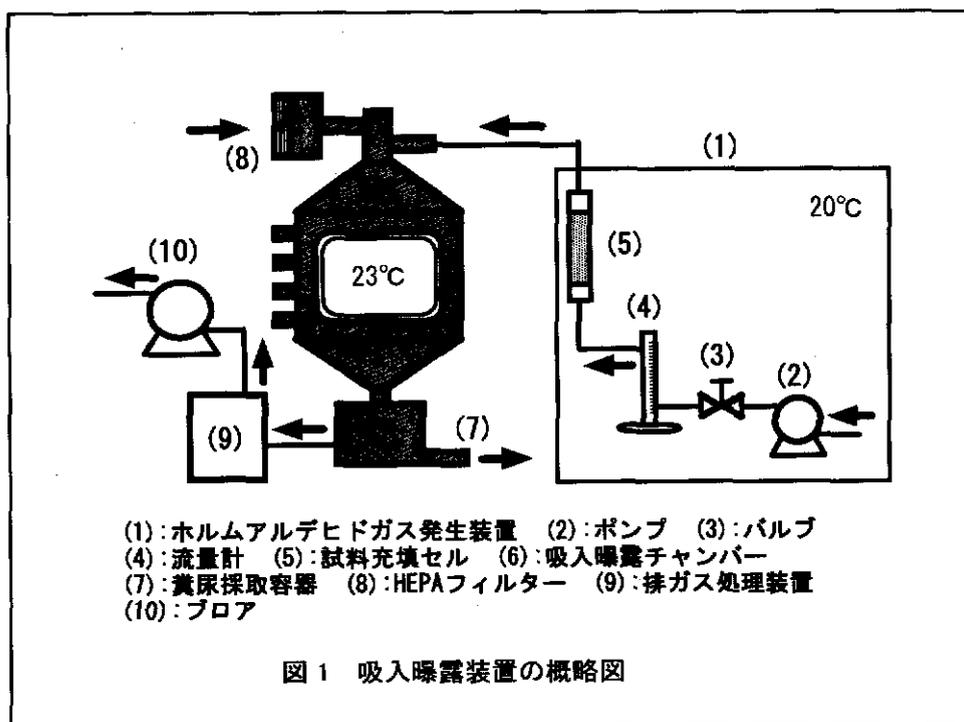
チャンバー内換気流量	0ppb	70 l/min
	80ppb	90 l/min
	400ppb	80 l/min
	2000ppb	100 l/min

動物の種類 C3H/He Slc female (日本エスエルシー株式会社)  
8週齢で入荷、10週齢より曝露開始

餌 CE-2 日本クレア株式会社

7. 参考文献

Hajime HORI and Keiichi ARASHIDANI : Basic Characteristics of a Formaldehyde Gas Generator Using Solid Paraformaldehyde, J. UOEH, 19(2), 123-131 (1997)



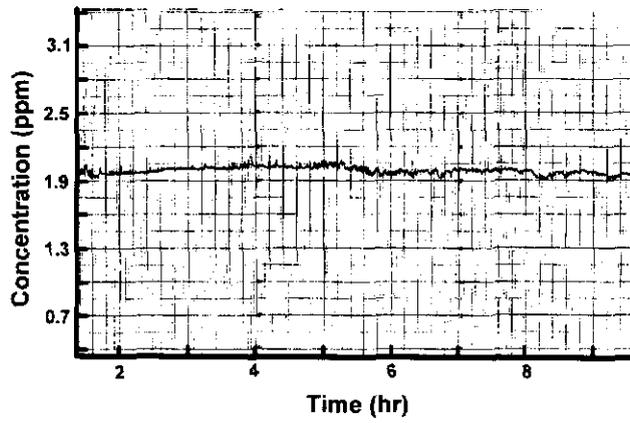


図 3 チャンバー内の濃度変動の一例 (2000ppb)

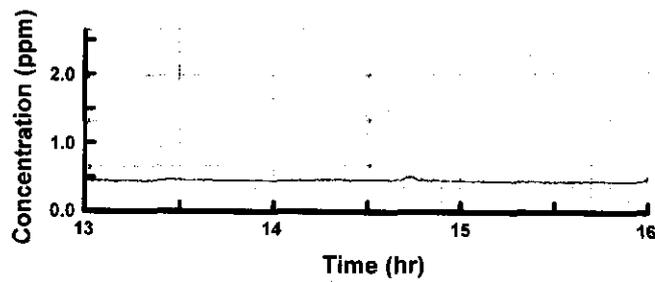


図 4 チャンバー内の濃度変動の一例 (400ppb)

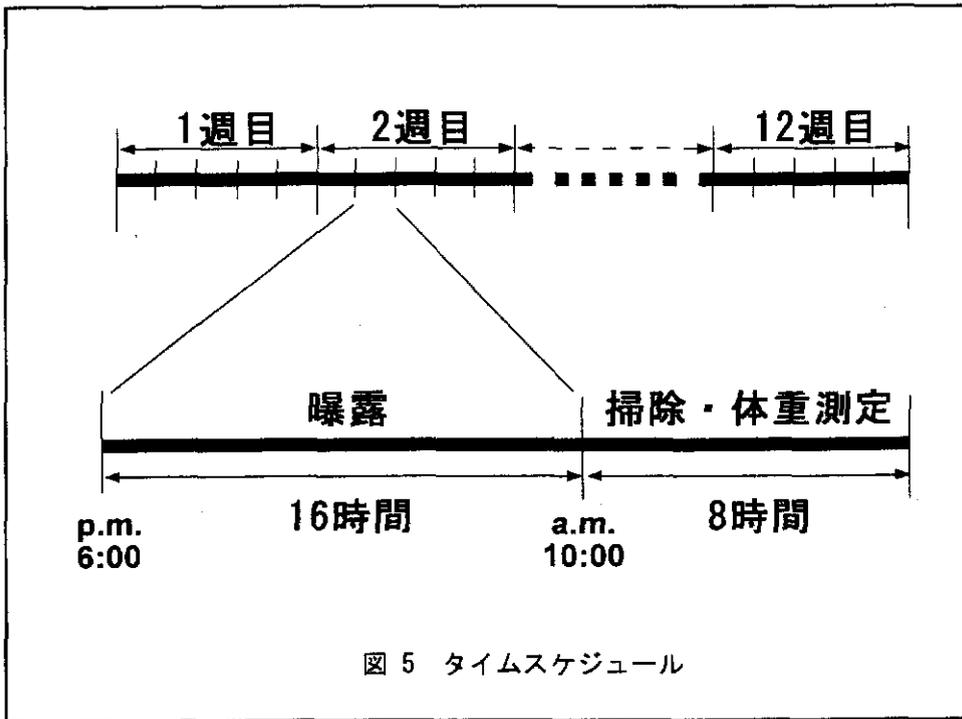


図 5 タイムスケジュール

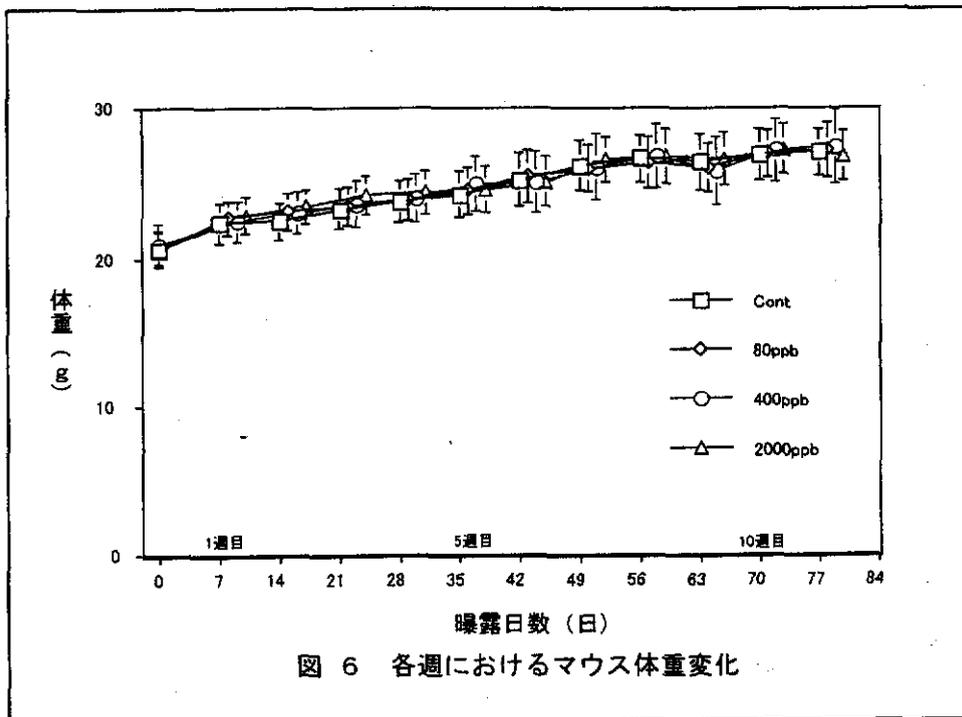


図 6 各週におけるマウス体重変化

## 研究者及び研究協力者名簿

### 研究者

藤巻 秀和 国立環境研究所環境健康部生体機能研究室長

### 研究協力者

市川 眞澄 財団法人東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所主任研究員<sup>1-1)</sup>

佐々木文彦 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻獣医解剖学教授<sup>1-2)</sup>

笛田由紀子 産業医科大学産業保健学部第一生体情報学講師<sup>1-3)</sup>

夏目季代久 九州工業大学大学院生命体工学助教授<sup>1-3)</sup>

福田 孝一 九州大学大学院医学研究院神経形態学助手<sup>1-3)</sup>

黒河 佳香 国立環境研究所環境健康部生体機能研究室主任研究員<sup>2-1)</sup>

樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部保健情報科学助教授<sup>2-1)</sup>

佐藤 房枝 産業医科大学産業保健学部第二生体情報学助手<sup>2-2)</sup>

菊池 亮 産業医科大学産業保健学部第二生体情報学助手<sup>2-2)</sup>

樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部保健情報科学助教授<sup>2-2),3),4)</sup>

嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部第二環境管理学教授<sup>2-2),3),4)</sup>

笛田由紀子 産業医科大学産業保健学部第一生体情報学講師<sup>3)</sup>

保利 一 産業医科大学産業保健学部第一環境管理学教授<sup>4)</sup>

石田尾 徹 産業医科大学産業保健学部第一環境管理学助手<sup>4)</sup>

(\*) は研究課題)