

の観察ではあきらかになっていない。今後、電子顕微鏡の観察の主体を嗅上皮表面から深部に移し、嗅細胞あるいは幹細胞であるところの基底細胞の観察により前感作の効果を確かめる。また、これら様々な症例が個体間で差があることも考えられるのでこの検討も必要となる。

今回の観察から、低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露により嗅上皮に少なからず変性の症状がみられた。嗅上皮は嗅覚系の受容部であるから嗅覚機能に異常をきたしていると考えられる。一方、鼻腔内には別の感覚系の受容器が存在する。それは、鋤鼻系の受容部である鋤鼻器である。鋤鼻器はフェロモンの受容に関わる器官である。フェロモンは動物の社会行動に重要な役割を演じている。したがって、鋤鼻器に障害が生ずると社会生活に異常が生ずる可能性が高い。今後、鋤鼻器に障害が起きているかどうかの検討も行う必要がある。

7. 結論

ホルムアルデヒドの嗅上皮に対する低濃度長期曝露（3ヶ月）の影響をしらべた。観察数が少ないため、明確な結論は得られないが、これまでの結果から以下のようなことがいえる。2000ppb の曝露により、マウス嗅上皮中嗅細胞の繊毛および支持細胞の微絨毛の顕著な脱落が認められる。この結果ニオイ物質の受容に障害が起きているとおもわれる。今後、機能障害を確かめるために生理学および行動学的研究の必要があると考える。

8. Abstract

Title: Morphological analysis of mouse epithelium after a long-term exposure of low concentrated formaldehyde

Author: Masumi Ichikawa (Tokyo Metropolitan Institute for neuroscience, Tokyo 183-8526, Japan)

Abstract: To study the role of olfactory function in the induction of multiple chemical sensitivity, fine structure of olfactory mucosa has been examined in mice after long-term exposure of low concentration of formaldehyde. After a long-term exposure (2000ppb, 3 months) the surface of olfactory epithelium showed a characteristics of degeneration. The number of olfactory cilia on the olfactory cell decreased. The microvilli of supporting cell shortened and thinned down. The cell bodies of olfactory and supporting cells did not show any changes. These results indicated that the olfactory function shows disorder whereas the effect of exposure was limited in the surface of olfactory epithelium. It is necessary to examine the olfactory function by use of physiological or behavioral technique.

1-2. 低濃度のホルムアルデヒドを長期曝露の脳—神経系への影響について —視床下部と下垂体からのホルモン産生に関する研究—

研究協力者：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・
獣医解剖学研究室）

1. 研究要旨

低濃度ホルムアルデヒドの長期（3ヶ月間）曝露がマウス視床下部室旁核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）ニューロンと下垂体副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）細胞へどのような影響を与えるかを免疫組織化学とRT-PCR法により解析した。マウスは、A群とB群に分け、それぞれの群は、ホルムアルデヒドの曝露量によりさらに4群に分けた。A群は、ホルムアルデヒドを0ppb曝露したA-0群を対照に80ppb、400ppb、2000ppbを曝露したA-80群、A-400群、A-2000群から成る。B群はホルムアルデヒド曝露に先立って同薬を腹腔内に投与し、A群同様に処理したB-0群、B-80群、B-400群、B-2000群から成る。

対照群（A-0）の室旁核には、少数のCRH免疫陽性ニューロンが見られた。A-80群のCRH免疫陽性ニューロン数は、A-0群のものと明白な形態学的差異は見られなかったが、A-400群とA-2000群のCRH免疫陽性ニューロン数はA-0群のものより増加していた。さらに、B群それぞれの群のCRH免疫陽性ニューロン数はA群それぞれの群のものに比べて増加していた。

ホルムアルデヒド曝露により、下垂体のACTH免疫陽性細胞には形態学的な変化は見られなかったが、下垂体内ACTH-mRNAの発現量は400ppb群から曝露量依存的に高くなり、A群よりB群の方でより強い発現が見られた。

この様に、視床下部のCRHニューロンと下垂体のACTH細胞は400ppb以上のホルムアルデヒド曝露によるストレスに反応していると考えられる。

2. 研究補助者

小川和重（大阪府立大学大学院）

塚本康浩（大阪府立大学大学院）

桑原佐知（大阪府立大学大学院）

3. 研究目的

ヒトや動物は、日常生活の中で多くの有害刺激（ストレス）を受けている。恐怖、不安感、懸念などのストレスが加わると、下垂体の副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）細胞からのホルモンすなわちACTH分泌増加を介して副腎皮質から糖質コルチコイド分泌が増加し、この結果、生命の維持が保たれる¹⁾。しかし、異常なストレスは、糖質コルチコイドが過剰に分泌され、喘息や高血圧²⁾、うつ病³⁾やアルツハイマー病⁴⁾の病因となると考えられている。

さらに、ストレスに対する反応の中核は、脳の一部である視床下部の室旁核にあり、そこに存在する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）ニューロンから分泌されるホルモンすなわちCRHがACTH細胞の働きを制御しているといわれている。この様にストレスに対しては、

視床下部—下垂体—副腎軸が対応している⁹⁾。この様に、多種類の化学物質が直接的あるいは間接的に有害刺激物質（ストレス）として視床下部—下垂体—副腎軸どれかの器官をまず傷害し、他に及ぶとともにMCSに発展していく可能性が考えられる。

今回の実験では、ストレスの一つと考えられるホルムアルデヒドガスを長期間吸入する事により、マウスの視床下部のCRHニューロンと下垂体ACTH細胞が如何なる影響を受けるかを免疫組織学的並びに分子生物学的に解明することを目的としている。

4. 研究方法

4-1) 動物

マウスは、2群（A群とB群 $n=25$ ）からなり、それぞれの群は更に次のように分かれる。A群は、ホルムアルデヒドを0ppb曝露した群（A-0）を対照として用い、80ppb、400ppb、2000ppb曝露したそれぞれA-80 A-400 A-2000群から成る。B群は、ホルムアルデヒド曝露前に腹腔内に同試薬を投与し、その後A群同様に曝露したB-0、B-80、B-400、B-2000群から成る。

マウスを体重測定後屠殺し、視床下部、下垂体と副腎を採取後、以下の処理を行った。

4-2) 視床下部

視床下部をブアンの液で固定し、アルコール系列で脱水後、パラフィンに包埋した。光学顕微鏡用のマイクロームで $10\mu\text{m}$ の連続切片とし、ガラススライドに塗付した。切片をキシロールで脱パラフィン後、ヒトCRH抗体（希釈倍率：1:1,000）を用いて、免疫染色（ABC法）し、核はヘマトキシリンで対比染色した。二次抗体としては、ビオチン標識抗ウサギIgG（Vector Laboratories, Inc., USA）を用い、ジアミノベンチジン（DAB; Zymed Laboratories, Inc., USA）で発色させた。結果を光学顕微鏡で観察した。

4-3) 下垂体前葉のACTH細胞

4-3-1) 免疫組織化学による解析

下垂体を10%ホルマリンで固定し、アルコール系列で脱水後、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックを $10\mu\text{m}$ の連続切片とし、キシロールで脱パラフィン後、ヒトACTH抗体（希釈倍率：1:1,000）にて視床下部のCRHと同様の方法（ABC法）を用いて免疫染色し、光学顕微鏡で観察した。

4-3-2) 半定量的RT-PCR法による下垂体内ACTH-mRNAの発現量の測定

下垂体を採取後直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで -70°C の冷凍庫中で保存した。組織をTRIZOL（Life Technologies, Inc., USA）中でホモジナイズし、total RNAを抽出した。 $2\mu\text{g}$ のtotal RNA、オリゴdTプライマーおよび逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。このcDNAを鋳型DNAとして、マウスACTHに対するプライマーを使い、PCRにより増幅させた。PCR産物は、アガロースゲルで電気泳動し、得られたそれぞれのバンドについてその強度を比較することにより、ACTH-mRNAの発現量の測定を行った。なお、得られたPCR産物は、DNAシーケンシングによりマウスACTHのものであることを確認している。

4-4) 副腎

副腎をブアンの液で固定し、液を濾紙で十分吸収後その重量を測定した。パラフィンに包埋後、 $10\mu\text{m}$ の切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色かアザン染色を行った。

5. 研究結果

5-1) 体重と副腎の重量

各群マウスの体重ならびに副腎の絶対重量、相対重量を表1に示した。体重と副腎の重量は、A-0群のものに比較して有意の差は見られなかった。但し、A-80群の副腎重量は、A-0群並びにB-0群のものとは有意の差は見られなかったが、A-400群、A-2000群のものより小さかった ($P < 0.05$)。

5-2) 視床下部の室旁核

A-0群では、室旁核のニューロンの内、上部に位置する少数がCRH免疫陽性を示していた(図1、2)。A-80群のCRH免疫陽性ニューロンは、質・数共に対照群のものと差異は無かった(図3)が、A-400群とA-2000群ではCRH免疫陽性ニューロンが増加していた(図4と5)。B-0群のCRH免疫陽性ニューロンの数はA-0群に比べて増加していた(図6)。同様に、B-80群(図7)、B-400群(図8)とB-2000群(図9)のCRH免疫陽性ニューロン数はそれぞれA-80群、A-400群、A-2000群のものより増加していた。

5-3) 下垂体のACTH細胞

5-3-1) 免疫組織学的解析

A-0群のACTH免疫陽性細胞は下垂体前葉全域に散在する。その形状は卵円形や星状のものが多く、その多くは核周辺で細胞質の乏しく、長い突起を持っている(図10)。対照群のACTH免疫陽性細胞に比較して他の7群のものには形態学的な差が見られなかった(図11-17)。

5-3-2) 半定量的RT-PCR法による下垂体内ACTH-mRNAの発現量の測定

結果を図18に示した。A群とB群共に曝露量依存的に発現量が高くなっていった。A群とB群を比較すると、80ppb群を除いて、B群でより強い発現が見られた。

5-4) 副腎

A-0群に比べて他の群(A-80、A-400、A-2000、B-0、B-80、B-400、B-2000)の副腎皮質の束状体と網状体を構成する細胞の形態と数で差が見られなかった(図19-26)。

6. 考察

視床下部の室旁核のニューロンは、抗利尿ホルモンやオキシトシンと共にCRHを合成・分泌する。CRHを合成するニューロンは、ストレスによりCRH免疫陽性ニューロン数として増加する⁶⁾。今回の実験のCRH免疫陽性ニューロン数から判断すると、ホルムアルデヒド80ppbの処理量では室旁核のCRHニューロンには形態学的な影響を与えないが、400ppbと2000ppbではCRHの合成・分泌が増加していることを示唆している。又、A群とB群の結果からホルムアルデヒド曝露実験に先立って腹腔内に投与したホルムアルデヒドは、室旁核のCRHニューロンにストレスとしての作用を更に付加したと考えられる。

ACTH陽性細胞は、ストレスにより細胞質が拡大する⁷⁾が、ACTH細胞の免疫組織化学的方法による本結果は、A群とB群共に形態学的には強い影響を受けているように思われなかった。しかし、下垂体内ACTH-mRNA発現量は、A群とB群共にホルムアルデヒドの曝露量依存的に高くなり、又、B群の方がより増加していたことは、ホルムアルデヒド曝露がストレスとしてACTH細胞に作用していることを示している。更に、現在の光学顕微鏡による免疫組織化学的方法ではACTH細胞にホルムアルデヒド曝露の影響を観察できなかったが、電子顕微鏡による細胞小器官の観察や血中のACTH含有量の測定などが必要であろう。