

図 10 くしゃみとペアパルス比の傾向

曝露濃度 2000ppb 群で、くしゃみ回数が少ないマウスと多いマウスでペアパルス比を比較した。くしゃみ回数が多いマウスでは、ペアパルス比が増加する傾向があるようだ。

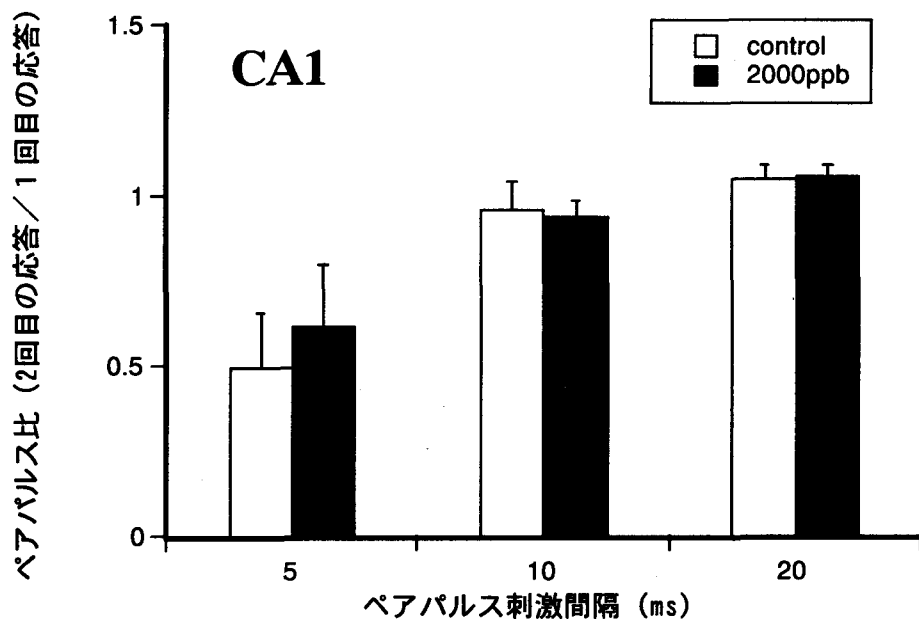


図 11 CA1 野のペアパルス比

歯状回とは異なり、CA1 野では、対照群とホルムアルデヒド曝露群のペアパルス比に差はなかった。

4-2) Long Term Potentiation の形成不全

コントロールの LTP は、TBS により、pEPSP の傾きが約 6 倍に増強 (post tetanic potentiation) し、その後減少したが、約 4 倍程増強したまま維持された。従って、LTP が生成したと考えられる (図 12 (a))。LTP が生成したスライスは、11 例中 10 例あった。一方、2000ppb 曝露したマウスからは、LTP が起こりにくかった。起こった例もあり、それを図 12 (b) に示したが、コントロール LTP に比べて、その増強度は小さかった。LTP が起こったのは、11 例中 5 例であり、コントロールの半分の割合だった。ホルムアルデヒド曝露群では、LTP が顕著に抑制されていた。曝露によりマウスがくしゃみをするようになり、2000ppb 曝露群の LTP の起こった 5 例のスライス中、3 例がくしゃみをしないマウスからのものであった。くしゃみをしたスライスでは、図 12 (c) に示すように、LTP は生成しなかった。

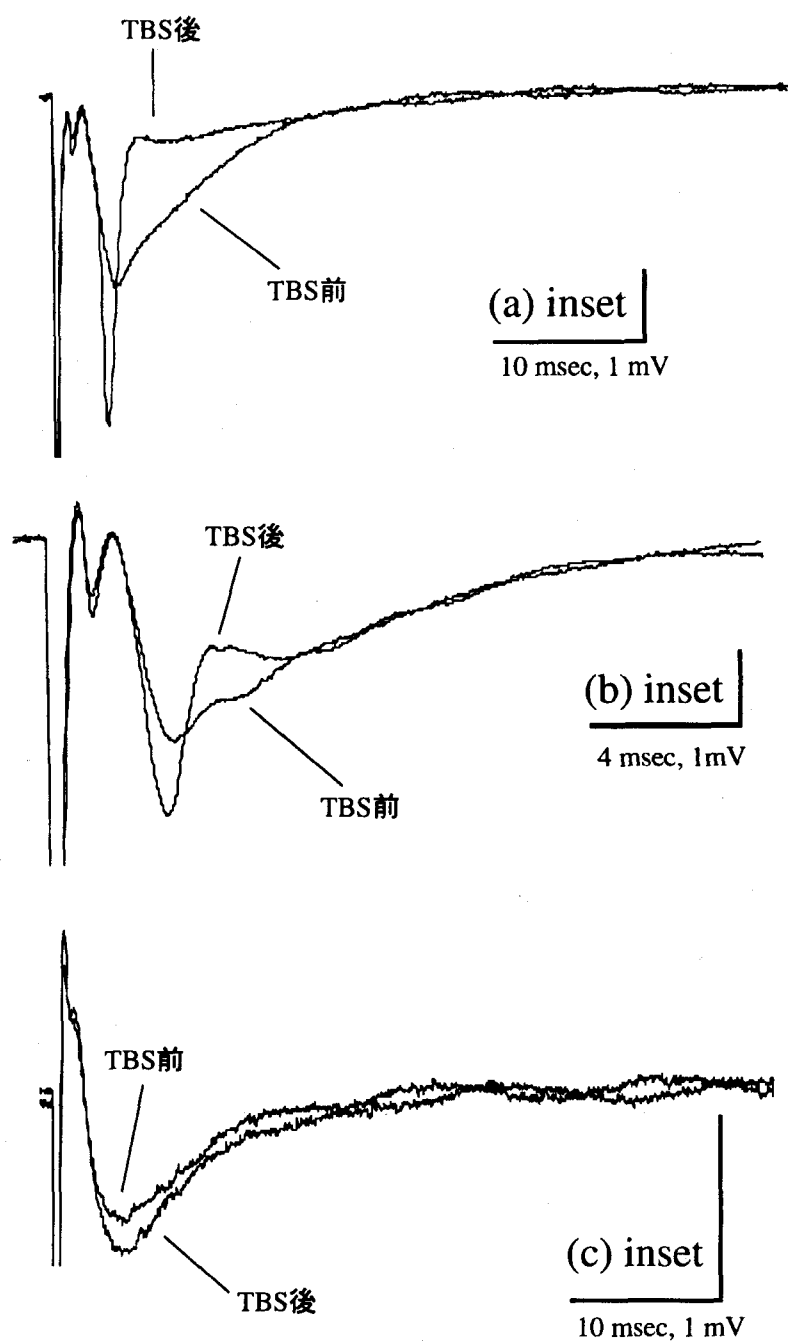


図 12. コントロールのマウスにおける TBS 前後における pEPSP (a)、2000ppb ホルムアルデヒド曝露マウス中非くしゃみ群における LTP 誘導前後の pEPSP (b)、2000ppb 曝露マウス中くしゃみ群における LTP 誘導前後での結果。

コントロール群とホルムアルデヒド曝露群との pEPSP の傾きの経時変化は図 13 に示した。TBS35-40 分後の LTP 増強度を、コントロール、曝露で比較すると、図 14 に示すように有意差 ($p < 0.0001$) が存在した。従って、曝露により有意に LTP が抑制されると考えられる。図 15 には、くしゃみ群と非くしゃみ群での LTP の結果を示した。非くしゃみ群では、TBS35-40 分後の pEPSP 傾きの増強度は、約 2.0 であるが、くしゃみ群では、標準誤差が大きい、約 1.5 と非くしゃみ群に比べて小さかった。

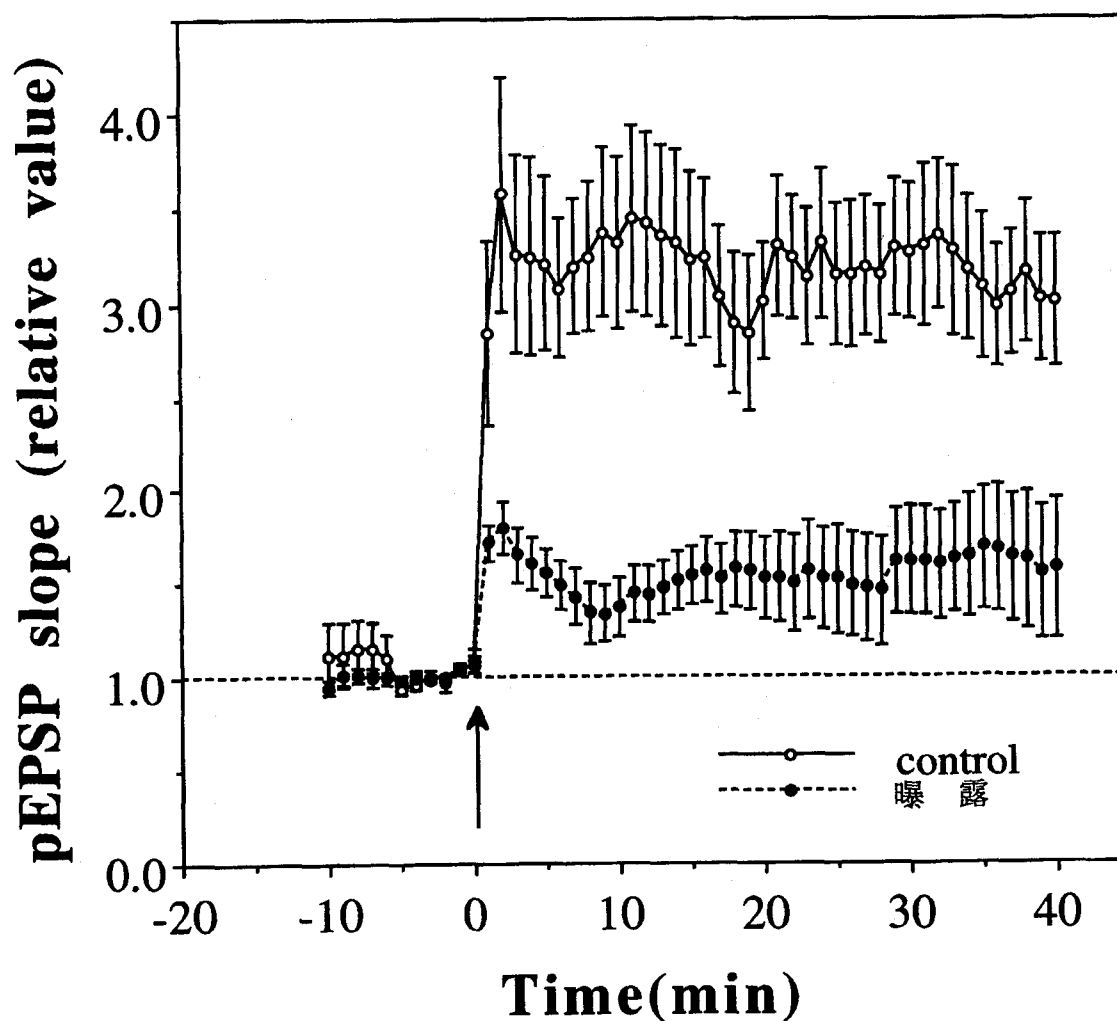


図 13 コントロール及び曝露群マウスにおける pEPSP 経時変化。矢印の場所で TBS を行った。

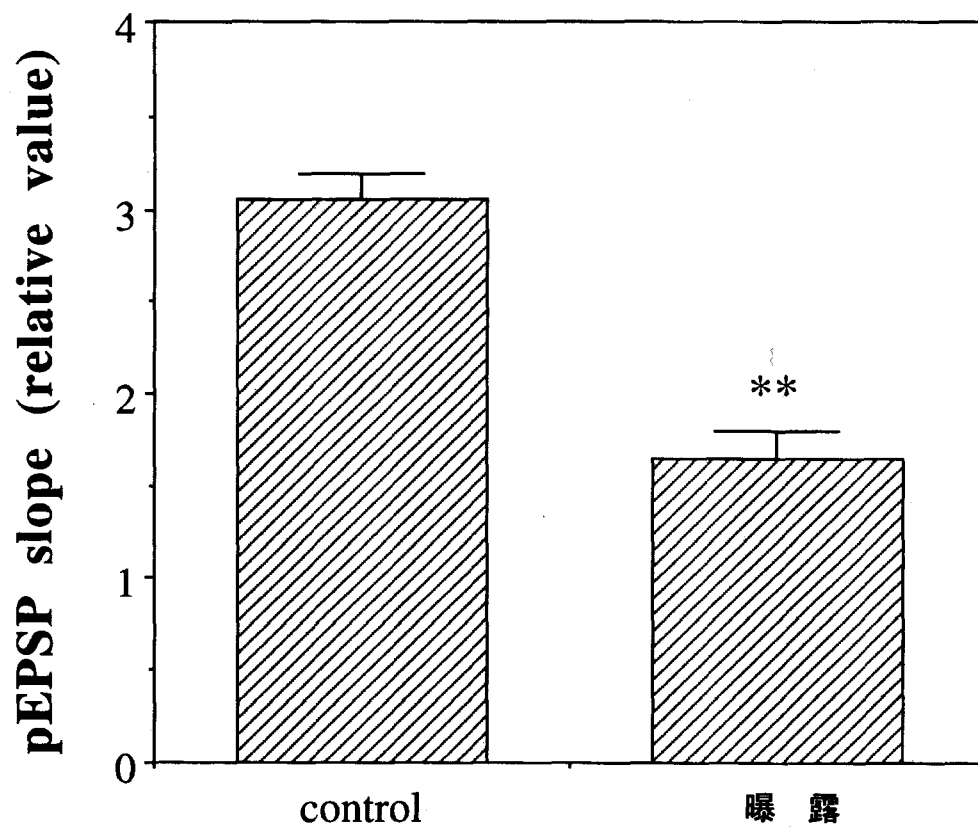


図 14 コントロール群と曝露群のスライスにおける LTP の平均。コントロール群 8 例、曝露群 7 例。

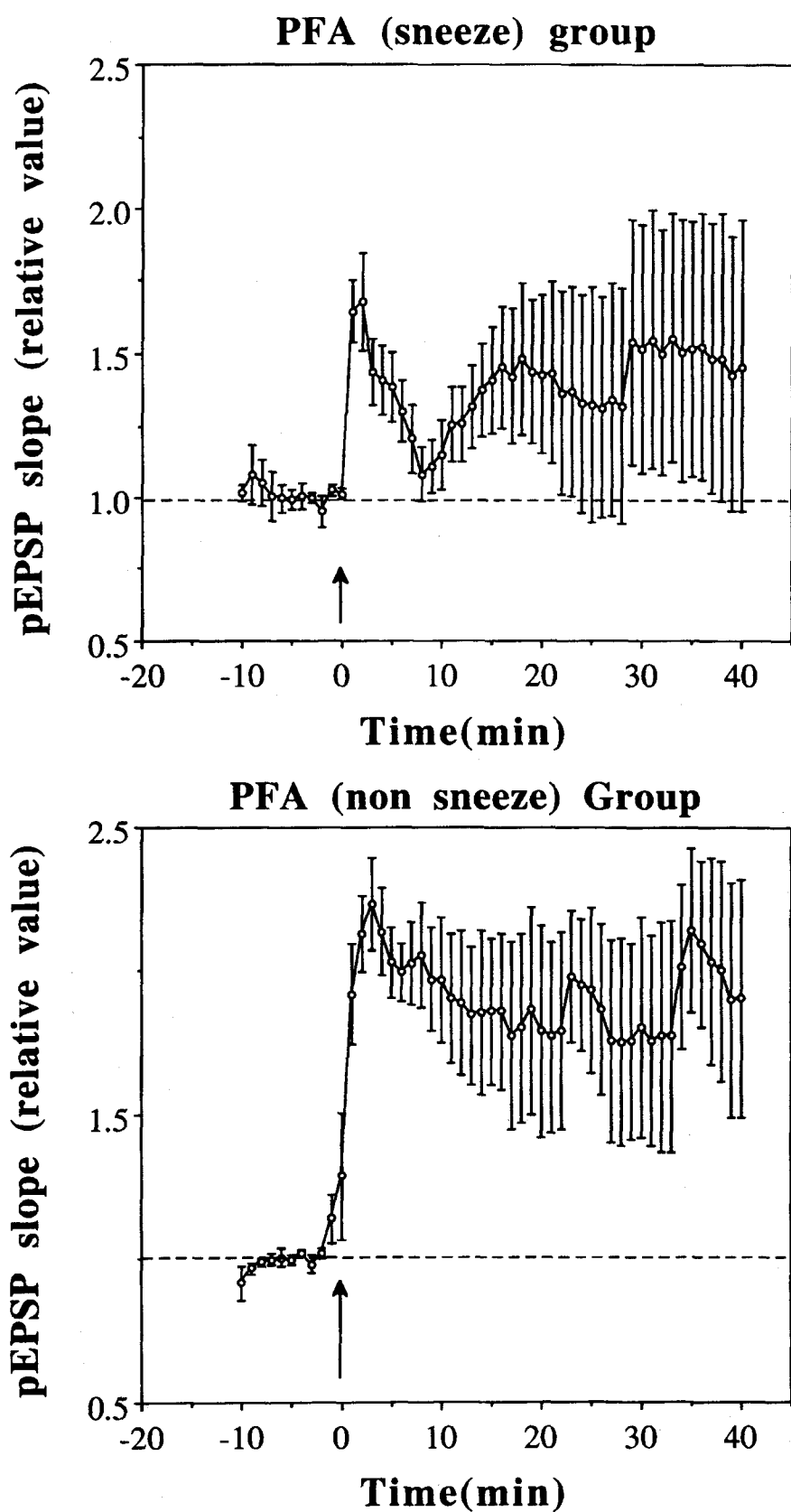


図15 くしゃみ群 (sneeze) と非くしゃみ群 (non sneeze) における pEPSP 経時変化

4-3) 海馬神経細胞形態への影響

はじめに海馬の神経細胞構築に対する曝露の影響を広くとらえるために、細胞の核を染色する色素である propidium iodide (PI) による海馬切片の染色像を比較検討した (図 16)。海馬を構成するアンモン角 (CA1、CA3 野) と歯状回のいずれにおいても、対照群と曝露群で違いは認められず、神経細胞の変性像や壊死による脱落、および炎症その他の組織傷害像も観察されなかった。共焦点レーザー顕微鏡の倍率を上げて、PI により染色される核の形態を高解像度で観察し、神経細胞死に伴う種々の形態変化 (ネクロシス、アポトーシス、どちらにも属さない第 3 のタイプ) を起こしつつある像の検出 (Fukuda et al., *Neurosci Res* 33: 49-55) を試みたが、いずれのタイプも観察されなかった。次に海馬の神経細胞の中で、抑制性介在神経細胞 (GABA ニューロン) の分布を、GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) に対する抗体による免疫組織化学染色によって調べた (図 17)。GAD 陽性の細胞体の分布も、両群で明らかな差は認められなかった。さらに神経組織傷害に付随して生じるグリア細胞の反応性変化を、星状膠細胞のマーカーである GFAP に対する抗体 (図 18)、および貪食細胞であるミクログリアのマーカーである F4/80 抗体 (図 19) を用いた染色で比較検討した。これは PI や GAD で観察される現在の細胞構築が一見正常に近いものであっても、軽度の組織障害が存在している場合、あるいは過去に障害が起っていた場合には、グリアの反応像として検出できることが期待できるからである。結果は、アンモン角と歯状回のいずれにおいても、対照群と曝露群で違いは認められなかった。以上から、今回の曝露条件下では海馬の細胞構築に変化を来すような大きな組織傷害は認められなかったと結論した。

次に神経細胞の形態を比較検討した。海馬の神経細胞は興奮性細胞である錐体細胞 (CA1、CA3 野) および顆粒細胞 (歯状回) と、抑制性細胞である GABA 作働性神経細胞に大別されるが、それぞれについて解析を行った。前者の細胞体と樹状突起の形態を、細胞骨格蛋白の一つである MAP2、および CA1 錐体細胞と顆粒細胞のマーカーである calbindin (図 20) のそれぞれに対する抗体を用いて描出した。GABA 作働性神経細胞の細胞体は、GABA の合成酵素 GAD に対する抗体による染色 (図 17, 24, 25) で観察した。さらに GABA 作働性神経細胞を構成する複数のサブグループを、それぞれのマーカー分子 (parvalbumin、calretinin、nitric oxide synthase) に対する抗体を用いて免疫染色した (図 21, 22)。これらのマーカーによって GABA 作働性神経細胞の細胞体と樹状突起がよく描出されるので、その形態もあわせて観察した。一方、神経細胞の出力部位である軸索終末の形態は、そこに豊富に存在する synaptotagmin の免疫染色により観察した (図 23)。特に GABA 作働性神経細胞の軸索終末を、GAD の免疫染色における陽性点状構造物として検出した (図 24, 25)。これらのそれぞれについて、対照群と曝露群で比較検討したが、明らかな違いは認め

られなかった。したがって、興奮性細胞と抑制性細胞のいずれにおいても、形態学的な変化として現れるような影響は見られなかったといえる。

最後に、GABA 作働性神経細胞において重要と考えられる機能分子の免疫染色性を比較した。GABA の合成に対する検討は、合成酵素である GAD の免疫染色性により行ったが、実際にはこれは上述の検討と同一であり（図 17, 24, 25）、それを別の観点から意義づけてとらえていることになる。一方 GABA transporter-1 (GAT1) は、神経細胞の興奮により軸索終末からシナプス間隙に放出された GABA が、終末内に再取り込みされる過程を媒介する膜蛋白である。仮にその染色性が大きく変化していれば、GAT1 によるシナプス間隙の GABA の濃度調節機構が異常になり、シナプスにおける GABA の作用に変化をもたらす可能性が生じる。対照群と曝露群で GAD および GAT1 の免疫染色性を比較したが（図 26）、いずれにおいても明らかな違いは認められなかった。