

第2章 マウスを用いた動物モデルに関する研究

目 次

・研究結果の概要	319
1．低濃度ホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅上皮および嗅球の形態学的解析	319
2．低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露が視床下部 - 下垂体 - 副腎軸に及ぼす影響	319
3．脳内海馬での情報処理変化の検索	320
4．低濃度長期ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響についての検討	320
5．低濃度長期曝露の行動毒性への影響	320
6．その他の影響検索	321
(1) 化学分析による曝露指標	321
(2) 低濃度ホルムアルデヒド曝露によるマウス気道粘膜上皮細胞の変化と炎症細胞 の動態についての形態学的検索	321
・研究者及び研究協力者名簿	322
・研究結果報告	324
1．吸入曝露装置および曝露条件	324
(1) 吸入曝露装置	324
(2) 実験動物	324
(3) 曝露濃度評価	324
(4) 曝露方法	325
(5) OVA感作	325
(6) 体重変化	325
(7) Abstract	325
2．低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅上皮および嗅球の形態学的解析	329
(1) 研究要旨	329
(2) 研究目的	329
(3) 研究方法	329
1) 曝露実験	329
2) 組織標本作製	330
2 - 1) 光学顕微鏡観察	330
2 - 2) 電子顕微鏡観察	330
(4) 研究結果	330
1) 嗅上皮の構造	330

2) 低濃度ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅上皮の観察	331
2 - 1) 光学顕微鏡観察	331
2 - 2) 電子顕微鏡による観察	331
3) 嗅球の構造	331
4) 低濃度ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅球の観察	332
(5) 考察	332
3 . 低濃度ホルムアルデヒドの長期暴露が視床下部 - 下垂体 - 副腎軸に及ぼす影響	341
(1) 研究要旨	341
(2) 研究目的と経過	341
(3) 研究方法	342
1) 視床下部室旁核の CRH 免疫陽性細胞	342
2) 下垂体前葉の ACTH 細胞	342
2 - 1) 免疫組織化学による解析	342
2 - 2) 半定量的 RT-PCR 法による下垂体内 ACTH-mRNA の発現量の測定	343
3) Corticosterone の測定	343
(4) 研究結果	343
1) A 群 (C3H マウス OVA -)	343
2) C 群 (C3H マウス OVA -)	343
3) D 群 (C3H マウス OVA +)	344
4) E 群 (C57BL 系マウス)	344
(5) 考察	344
4 . 脳内海馬での情報処理変化の検索	351
(1) 研究要旨	351
(2) 研究目的	352
1) 今年度の研究目的	352
2) 細胞内シグナル定量解析の意義	352
(3) 研究方法	352
1) 反回 (側方) 抑制の検索	352
2) 長期増強	355
3) 細胞内シグナル伝達	355
(4) 研究結果	355
1) 抑制系の検索	355
2) 長期増強	359

3) 細胞内シグナル伝達	-----	362
(5) 考察	-----	363
(6) 結論	-----	364
(7) Abstract	-----	365
5 . 低濃度長期ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響についての検討	-----	367
(1) 研究要旨	-----	367
(2) 研究目的	-----	367
(3) 研究方法	-----	367
1) 実験動物	-----	367
2) アレルギー性炎症モデルの作成	-----	368
3) 炎症性細胞の算定とサイトカイン・ケモカイン産生の測定	-----	368
4) 抗体価の測定	-----	368
5) フローサイトメトリー分析	-----	368
6) 統計処理	-----	369
(4) 研究結果	-----	369
1) 体重と免疫臓器重量の変動	-----	369
2) 肺における炎症反応	-----	369
3) 脾臓でのリンパ球亜集団の変動と <i>in vitro</i> サイトカイン・ケモカイン産生	-----	369
4) 血中抗体価の変動	-----	370
5) 脳内サイトカインと神経成長因子の変動	-----	370
(5) 考察	-----	371
(6) 参考文献	-----	372
(7) Abstract	-----	372
6 . 低濃度長期曝露の行動毒性への影響	-----	379
(1) 研究要旨	-----	379
(2) 研究目的	-----	379
(3) 研究方法	-----	379
1) 移所運動活性の測定	-----	379
2) くしゃみの評価	-----	379
(4) 結果と考察	-----	379
1) 移所運動活性	-----	379
2) くしゃみの回数	-----	380
(5) 結論	-----	380

(6) Abstract	-----	380
7 . その他の影響	-----	386
7 - 1 . 化学分析による曝露指標	-----	386
(1) 研究要旨	-----	386
(2) 研究目的	-----	386
(3) 研究方法	-----	386
(4) 研究結果	-----	386
(5) 結論	-----	387
(6) 参考文献	-----	387
(7) Abstract	-----	387
7 - 2 . 低濃度ホルムアルデヒド曝露によるマウス気道粘膜上皮細胞の変化と炎症細胞 の動態についての形態学的検索	-----	389
(1) 研究要旨	-----	389
(2) 研究目的	-----	389
(3) 研究方法	-----	389
1) 上気道組織の検索	-----	389
2) 下気道ならびに全身性組織の検索	-----	389
(4) 研究結果	-----	390
1) 上気道粘膜上皮の変化と炎症性細胞の動態	-----	390
2) 下気道粘膜上皮の変化と炎症性細胞の動態	-----	390
3) その他の組織所見	-----	391
(5) 考察	-----	391
(6) 結論	-----	391
(7) 参考文献	-----	391
(8) Abstract	-----	392

・研究結果の概要

MCSは多種類の化学物質の低濃度長期曝露により神経系が過敏な状態になり、それに伴って免疫系や内分泌系にも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。昨年度から化学物質として過敏状態の誘導に関与している可能性の高いホルムアルデヒドをとりあげ、まず単一の低濃度曝露を行って過敏状態の指標になりえるものを探るために神経 免疫 内分泌軸に関与する分野での検討を始めた。昨年度は、実験動物の選択、曝露濃度、曝露期間、影響指標の選択を行い、本年度は本格的な実験に取り組んだ。実験動物としてC3Hマウスを用い、0、80、400、2000ppbホルムアルデヒドの低濃度長期曝露（3ヶ月）を行い以下の結果を得た。

1．低濃度ホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅上皮および嗅球の形態学的解析

嗅覚系での情報は、においを感知する嗅上皮から嗅神経を通過して嗅球にいき、そこから扁桃体に向かい、一部が視床を、他が視床下部を経て大脳皮質の嗅覚野へ向かう。昨年度は、2000ppbホルムアルデヒド曝露の嗅上皮への影響を調べた。今年度は、80と400ppbホルムアルデヒド曝露の嗅上皮、及び80、400、2000ppbホルムアルデヒド曝露の嗅球への影響について検討した。80と400ppb曝露では嗅上皮表面での形態異常はみられず、また嗅細胞のマーカーであるOMPの免疫細胞化学染色の結果から、細胞体は正常に保たれていると推測された。一方、嗅球のチロシン水酸化酵素免疫陽性（ドーパミン）ニューロンの観察結果では、曝露濃度依存的にドーパミンニューロンの数が増加している結果を得た。これは、持続的に刺激が嗅球に入力するため、これを抑制する必要から嗅球の活動が高まりドーパミンニューロンが増加したものと推測される。

2．低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露が視床下部 - 下垂体 - 副腎軸に及ぼす影響

低濃度ホルムアルデヒド長期曝露の視床下部 下垂体 副腎軸への影響について、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）細胞にどのような影響を与えるかを中心に解析している。昨年度は、視床下部室旁核におけるCRH免疫陽性ニューロンと下垂体でのACTHmRNAの発現の増加がみられた。今年度は、ホルムアルデヒド曝露群とOVA抗原感作したアレルギーモデルでのホルムアルデヒド曝露の影響について比較検討した。ホルムアルデヒド曝露のみでは下垂体のACTH免疫陽性細胞数は曝露量依存的に増加し、400と2000ppb曝露群では対照群の2倍以上に増加していた。アレルギーモデルでのホルムアルデヒド曝露群では80と400ppbでは対照群より増加するが、2000ppbでは対照より減少がみられた。このように、ホルムアルデヒドのみの曝露群では、CRHニューロンとACTH細胞は400ppb以上のホルムアルデヒド曝露により反応し、アレルギーモデル群ではホルムアルデヒド曝露によるストレスに対応できない状態になっている可能性がある。

る。

3．脳内海馬での情報処理変化の検索

低濃度ホルムアルデヒドの長期吸入曝露により、大脳辺縁系の一部である海馬における神経情報処理が、どのような影響を受けるかに注目した。昨年度は、海馬で 2000ppb 濃度においてシナプスの長期増強の低下、及び 400 と 2000ppb で抑制性シナプス回路の反回抑制系の減弱がみられた。神経細胞の形態には顕著な変化はみられず、シナプスの機能的変化が示唆された。今年度は、シナプスの機能的変化をさらに低濃度曝露条件 (> 80ppb) で検討し、細胞内のシグナル伝達蛋白分子 (MAP キナーゼ、CaM キナーゼ等) への影響についても検討した。その結果、海馬から皮質への出力領域である CA 1 の長期増強は 80ppb 以上で有意に減弱し、内嗅皮質から海馬への入力部位である歯状回における反回抑制が 80ppb でも減弱の傾向を示した。細胞内シグナルに関しては、2000ppb 濃度で実験を行い、CaM キナーゼ系と MAP キナーゼ系が影響を受けることが明らかとなった。また、synapsin や GluR1 に大きな変化がみられ、シナプス伝達の異常が惹起された可能性を強く示唆する結果を得た。

4．低濃度長期ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響についての検討

化学物質の曝露による過敏状態とアレルギー性炎症モデルでの反応との違いについて明らかにするために、昨年度は、ホルムアルデヒドのみの曝露群と抗原を腹腔内投与で感作しホルムアルデヒドを曝露した群における免疫応答を比較した。今年度は抗原の感作もホルムアルデヒド曝露と同様の吸入によるアレルギー性炎症モデルを作成して低濃度ホルムアルデヒド曝露の神経免疫関連機能について検討した。その結果、吸入抗原感作を行うアレルギー性炎症モデルでは 2000ppbホルムアルデヒド曝露による肺への炎症性細胞の集積や400と2000ppb曝露による脾臓細胞からのケモカイン産生の増加がみられたが、抗体価における増強は認めなかった。一方、脳内のサイトカイン量について下垂体、海馬、線条体での測定においては、炎症性のサイトカインレベルで顕著な差はみられなかったが、神経成長因子であるNGFにおいては海馬で400ppb曝露による増加が認められた。抗原の感作とホルムアルデヒド曝露により肺における炎症反応のみならず脳におけるNGFの動態が影響を受けやすいことが示唆された。

5．低濃度長期曝露の行動毒性への影響

MCS の動物モデルとして行動毒性試験が行われ中枢神経刺激薬に対する感受性亢進の有無が報告されている。昨年度は、移所運動活性へのホルムアルデヒド曝露の影響について検討した。2000ppb の3ヶ月曝露で運動活性の増加がみられ、また、くしゃみ様行動の増加も認められた。今年度は無刺激の自発運動のみを経時的に測定し、さらに昨年引き続き曝露中に観察されたくしゃみを定量化し、曝露の影響を評価するとともに、OVA 感作との関連についても検討した。その結果、移所運動活性の観察においては、低濃度ホルムアルデヒドの曝露影響は観察されなか

った。くしゃみ回数の変化に関しては、曝露2ヶ月時ですでに、曝露濃度依存的なくしゃみの増加が観察された。曝露終了時点でのくしゃみの回数はさらに増加し濃度依存性をきれいに認めた。また、OVAの感作により非感作群に比べ有意な増加を認めた。また、曝露期間の増加にしたがってくしゃみ回数が増加していること、さらに、くしゃみ回数だけでなく、くしゃみの発症率においても曝露濃度の増加に依存していることが観察された。

6. その他の影響検索

(1) 化学分析による曝露指標

低濃度ホルムアルデヒド曝露における曝露指標の開発を目的として、高速液体クロマトグラフィー(HCLP)によるマウス末梢血におけるホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度測定を試みた。反応試薬として cyclohexane-1,3-dione を用い蛍光検出器で測定する方法と 2,4-Dinitrophenylhydrazine Hydrochloride(DNPH)との反応による方法を試みた。しかしながら、本方法による測定結果はホルムアルデヒドを曝露しないでコントロールから 2000ppb 曝露群までいずれも、ほぼ同様の値を示し、この程度の曝露域においては、曝露後の生体内における速やかな代謝の影響もあり、化学分析による曝露指標を得ることが困難であり、今後さらに検出方法を改良して検討を加えていく必要性が示唆された。

(2) 低濃度ホルムアルデヒド曝露によるマウス気道粘膜上皮細胞の変化と炎症細胞の動態 についての形態学的検索

低濃度ホルムアルデヒド吸入曝露による病理的变化について検討した。今回用いた最大で 2000ppb までの吸入曝露では、マウスにおいて気道粘膜上皮細胞の著明な剥離や扁平上皮化生、腫瘍変化等を生じなかった。また明らかな炎症性細胞の浸潤もなく、肥満細胞の分布にも変化はみられなかった。一方、アレルギー性炎症モデルとして作成した OVA の吸入曝露群においては、気道粘膜変化として肥満細胞の浸潤が有意に多く観察されたものの、OVA とホルムアルデヒドの両者による相乗効果は光顕的に観察されなかった。

以上、昨年度と比べて今年度の結果から、80ppbや400ppbの低濃度ホルムアルデヒド曝露で嗅球におけるドーパミンニューロンや視床下部におけるCRHニューロンの増加、海馬CA1領域におけるLTPの減弱が示めされ、さらに抗原感作による炎症反応の増強より脳内でのNGFの増加がみられたことは、より低濃度ホルムアルデヒド曝露が嗅覚系を介して神経-内分泌-免疫軸を過敏な状態に導く可能性を示唆している。

・研究者及び研究協力者名簿

1．吸入曝露装置および曝露条件

保利 一	産業医科大学産業保健学部
石田尾 徹	産業医科大学産業保健学部
櫛田 尚樹	産業医科大学産業保健学部
嵐谷 奎一	産業医科大学産業保健学部

2．低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅上皮および嗅球の形態学的解析

市川 眞澄	(財)東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所
林 洋	(財)東京都神経科学総合研究所
岩崎 則子	(財)東京都神経科学総合研究所
瀧上 周	(財)東京都神経科学総合研究所

3．低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露が視床下部 - 下垂体 - 副腎軸に及ぼす影響

佐々木文彦	大阪府立大学大学院農学生命研究科
櫛田 尚樹	産業医科大学産業保健学部
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
アミン・ハッサン	大阪府立大学大学院
桑原 佐知	大阪府立大学大学院
ドゥイ・クマ・カ	大阪府立大学大学院

4．脳内海馬での情報処理変化の検索

笛田由紀子	産業医科大学産業保健学部
夏目季代久	九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報
福永 浩司	熊本大学医学部第一薬理学

5．低濃度長期ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響についての検討

藤巻 秀和	独立行政法人国立環境研究所
黒河 佳香	独立行政法人国立環境研究所
櫛田 尚樹	産業医科大学産業保健学部

6．低濃度長期曝露の行動毒性への影響

櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部

7．その他の影響

7 - 1．化学分析による曝露指標

櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部

7 - 2．低濃度ホルムアルデヒド曝露によるマウス気道粘膜上皮細胞の変化と
炎症細胞の動態について

佐藤 房枝 産業医科大学産業保健学部

菊池 亮 産業医科大学産業保健学部

櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部