

．研究結果報告

1．吸入曝露装置および曝露条件

研究協力者：保利 一，石田尾徹，櫻田尚樹，嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

ホルムアルデヒドの吸入曝露は、昨年同様に産業医科大学・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。

（１）吸入曝露装置

吸入曝露実験装置の概略図（図 1）を示す。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)を通じ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。

（２）実験動物

実験動物には、昨年購入した日本エスエルシー株式会社において感染事故発生のため生産が中断したため今年度は日本チャールスリバーより購入したマウスを用いた。今年度は遺伝的な差を検討するために、マウスの系統は C3H/HeN および C57BL/6N の雌、10 週齢の 2 系統を用いた。マウスは 8 週齢で入荷し、馴化させるために約 2 週間動物センター内で飼育した。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動物センター SPF 環境下で飼育継続し実験に供した。

（３）曝露濃度評価

チャンバー内曝露濃度は化学分析により評価した。すなわち 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) を含浸したシリカゲルカラム（Waters Sep-Pak XPoSure™ Aldehyde Sampler）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。その結果、曝露期間中の濃度は、2000ppb 曝露では 1874 ± 240 ppb、400ppb 曝露では 393 ± 34 ppb、80ppb 曝露では 82 ± 6 ppb であった（図 2）。

(4) 曝露方法

曝露時間は午後 6 時から翌朝 10 時までの夜間帯 16 時間とし、最大 3 ヶ月の曝露を行った(図 3)。また、曝露中は自由飲水・摂食(CE-2 日本クレシア株式会社)とした。なお曝露室の照明は午前 7 時点灯、午後 7 時消灯の 12 時間サイクルとした。

(5) OVA 感作

アレルギー性炎症モデルの作成を目的に、一部の群のマウスにおいては卵白アルブミン(OVA)の感作を行った。昨年は、腹腔内投与のみによる方法を実施したが、肺内の炎症が非常に軽度であったため、今年度はエアロゾル投与によるアレルギー炎症の誘発を行った。すなわち、初回はホルムアルデヒド曝露開始時に OVA とアルミニウムの混合液を腹腔内投与を行い、その後は曝露期間中に 3 週間毎に生理食塩水に溶解した OVA のみを、臨床用吸入器を改良したエアロゾル発生装置と曝露装置を用いて 1 回あたり 6 分間吸入曝露した(図 4)。

(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 5 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。

(7) Abstract

Exposure apparatus and experimental procedure

Hajime Hori, Toru Ishida, Naoki Kunugita, Keiichi Arashidani

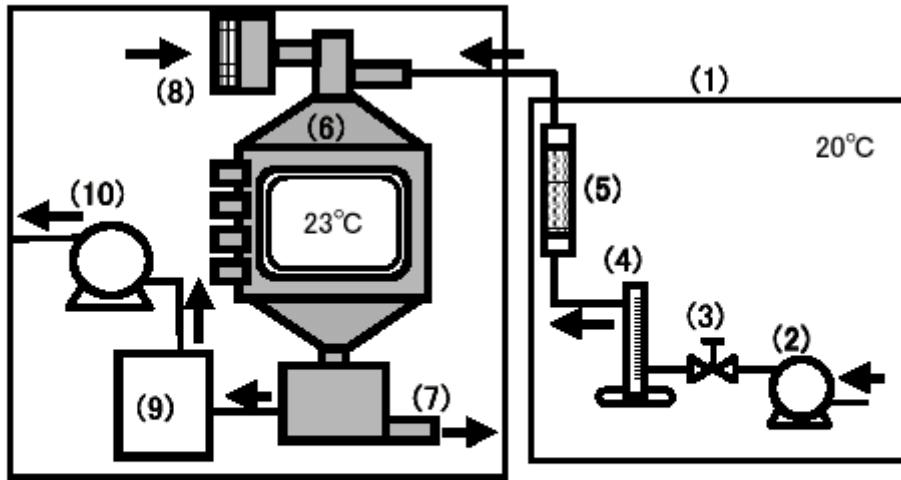
School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan.

Exposure: A formaldehyde gas obtained from a generator packed with solid paraformaldehyde was introduced into an exposure chamber (volume 400L) made of stainless steel from the top. By introducing dry air from a compressor into a column of the generator, solid paraformaldehyde decomposes and releases formaldehyde gas. The gas generation rate is affected by several factors, such as, air flow rate, temperature and the packed amount of paraformaldehyde. After the gas concentration became constant, the mice were put into the chamber. The exposure period was 16 hours, 5 days a week, for 12 weeks.

Animals: Female mice (C3H/He and C57BL/6, 10 weeks old) were used in the inhalation study after 2 weeks of acclimation. The mice were divided into 4 groups, that is, control, 80 ppb exposure, 400 ppb exposure and 2000 ppb exposure groups.

Analysis of formaldehyde gas concentration: The formaldehyde gas concentration in the chamber was measured by a 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) - high performance liquid chromatography (HPLC). The concentrations of 80, 400 and 2000 ppb exposure groups were 82 ± 6 , 393 ± 34 and 1874 ± 240 ppb, respectively. The body weights of animals exposed to formaldehyde were similar to those of their controls.

図1 吸入曝露装置の概略図



(1):ホルムアルデヒドガス発生装置 (2):ポンプ (3):バルブ
 (4):流量計 (5):試料充填セル (6):吸入曝露チャンバー
 (7):セパレータ (8):HEPAフィルター (9):排ガス処理装置
 (10):ブロー

図2 濃度設定値と測定濃度

設定値	実測値
80ppb	82 ± 6
400ppb	393 ± 34
2000ppb	1874 ± 240

図3 タイムスケジュール

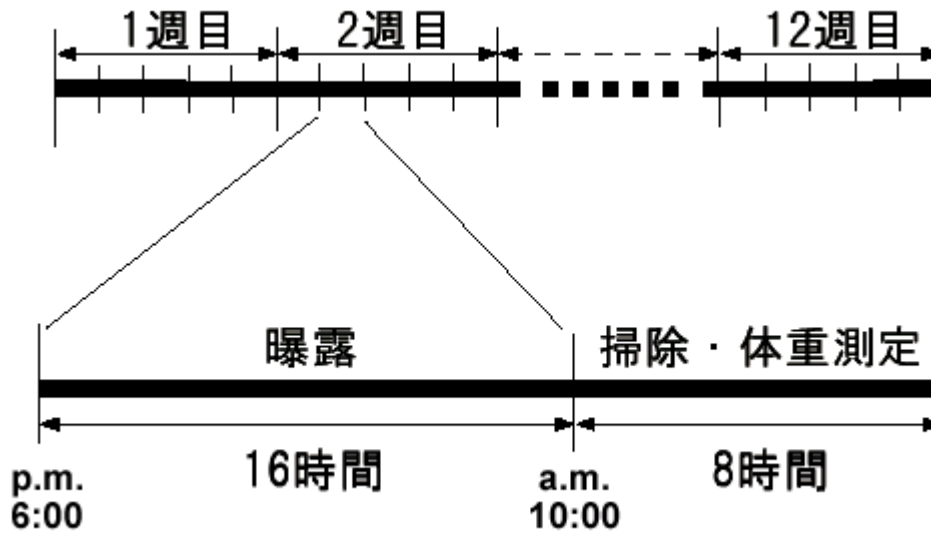
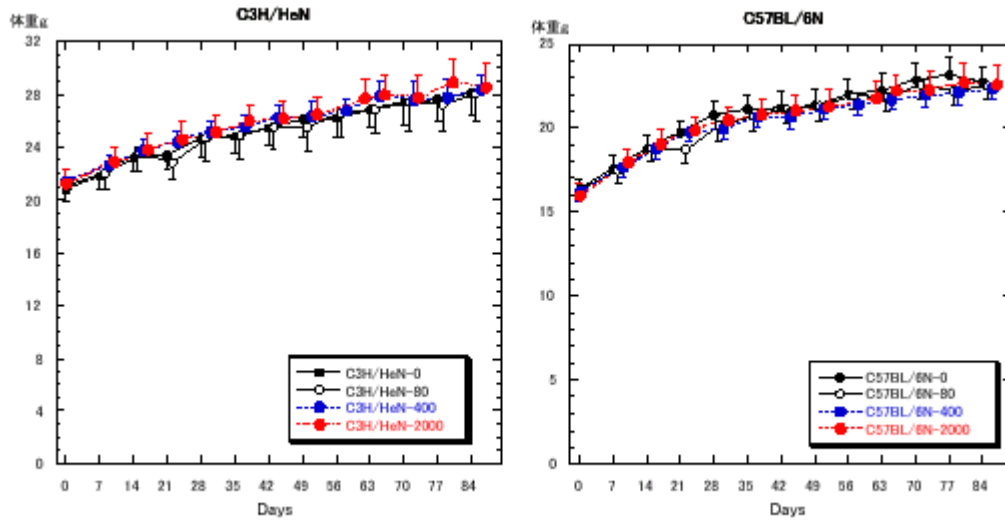


図4 アレルギー性疾患モデルのOVA感作

曝露開始時 (第0週)	第3週	第6週	第9週	第11週	第12週終了後
↑	↑	↑	↑	↑	↓
OVA + Alum (ip)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	解剖

図5 各週におけるマウス体重変化



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)
研究協力者

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)

(1) 研究要旨

化学物質の低濃度長期曝露による嗅細胞に与える影響を調べるため、ホルムアルデヒド (0、80、400、2000ppb) に3ヶ月間持続的に曝露した、マウスの嗅上皮を光学および電子顕微鏡で、嗅球を光学顕微鏡で免疫組織学的に解析した。この結果、曝露マウスの嗅上皮では、嗅上皮の厚さや嗅細胞の数に変化は認められなかった。しかし、2000ppb 曝露マウスの嗅上皮表面の嗅細胞の嗅小胞や繊毛および支持細胞表面にある微絨毛は軽微な変性が認められた。細胞の壊死などの大きな変性はなく、どの程度、嗅覚の感覚障害を引き起こしているかについては、機能的解析が必要とされる。嗅球におけるドーパミンニューロンを観察した。この結果、0ppb に比べて80ppb、400ppb さらに2000ppb 群というように曝露濃度依存的ドーパミンニューロンの数が増え、免疫染色性も強くなる傾向が見いだされた。ドーパミンの機能は明らかでないが、刺激依存的に増加し、嗅球ニューロンの抑制効果を調節していると考えられる。

(2) 研究目的

嗅覚はいわゆる5感とよばれるもののひとつで、ニオイを感受する感覚系である。ニオイは化学物質により引き起こされるので、5感のうちでは味覚とともに化学受容系に分類される。このニオイ物質は吸気とともに鼻腔に取り込まれ鼻腔の奥にある嗅覚器に到達する。ここで、感覚細胞 (嗅細胞) に受容され、その情報は嗅覚系を經由して高次脳中枢へと運ばれる。このように、嗅覚器の特徴は、嗅細胞が外界に接していることである。この理由から、外界の様々な物質に曝露されてその影響を直接を受けることである。そこで、本研究プロジェクトでは化学物質の長期曝露による嗅細胞を含めた嗅覚系ニューロンにおこる変化を形態学的に解析することを目的とする。

(3) 研究方法

1) 曝露実験

平成12年度に、C3H/He の雌マウスを9週齢で高濃度前感作 (ホルムアルデヒド溶液 20mg/kg 体重を1回腹腔内投与する) ののち、10週齢より低濃度曝露を開始したグループと、前感作なしで低濃度曝露をおこなった2グループを作成した。各グループの低濃度曝露は、0、80、400、2000ppb とし、各グループ5匹とした。曝露期間は3ヶ月とした。ほかに、完全コントロールとして別室飼育グループを5匹作成した。各グループ5匹のうち3匹は電子顕微鏡観察そして残り2匹は光学顕微鏡観察用標本とした。

平成13年度は、C3H/He の雌マウスを、前感作なしで、10週齢より3ヶ月、12年度同様

の低濃度曝露をおこなった。各グループ5匹とした。5匹のうち3匹は電子顕微鏡観察そして残り2匹は光学顕微鏡観察用標本とした。また、C57BLの雌マウスを10週齢より3ヶ月同様の低濃度曝露をおこなった。各グループ5匹とした。各グループ5匹のうち3匹は電子顕微鏡観察そして残り2匹は光学顕微鏡観察用標本とした。

すでに解析を終了した標本数を表1に記した。

2) 組織標本作製

各グループとも、低濃度ホルムアルデヒド3ヶ月曝露終了後灌流固定をおこない、嗅上皮は、鼻中隔上部から第一鼻口蓋部分の嗅粘膜を取り出した(図1)。また、脳を取り出し、嗅球を標本とした。

2-1) 光学顕微鏡観察

クリオスタットで嗅粘膜の凍結切片を作成し、組織染色(HE染色、ニッスル染色)および免疫細胞化学染色をおこなった。免疫細胞化学染色は神経細胞を染めるためにN-CAM抗体、成熟嗅細胞を染めるためにOlfactory marker protein (OMP)に対する抗体を用いておこなった。

嗅球は凍結切片を作成し、OMPおよびチロシン水酸化酵素(TH)に対する抗体を用いて、免疫組織学的検索をおこなった。THはドーパミン合成酵素でドーパミンニューロンのマーカーとして用いた。ドーパミンニューロンは嗅球の傍系球体細胞に存在する(後述)。

2-2) 電子顕微鏡観察

嗅細胞の超微形態を観察するため、組織を樹脂に包埋し超薄切片を作成の後、電子顕微鏡を用いて観察した。特に、鼻腔表面に接する部位の観察を中心におこなった

(4) 研究結果

1) 嗅上皮の構造

嗅覚器は、鼻腔の深部に存在し(図1)、その組織は鼻粘膜とよばれ、いわゆる粘膜構造を示す。嗅粘膜の粘膜上皮は嗅上皮とよばれ、嗅細胞、支持細胞、基底細胞から構成される(図2)。

嗅細胞は受容細胞としての役割を有する。その形態は双極細胞型を示し、一方の突起は上皮の表面に達している。突起は樹状突起とも呼ばれ、微小管を含む。突起の先端は膨らみを有し、嗅小胞と呼ぶ。嗅小胞からは鼻腔にむかって数本から数十本の繊毛を発している。嗅小胞あるいは繊毛の表面に嗅受容体が局在する。細胞体からは軸索が基底部にむかって伸び、さらに基底膜を貫いて粘膜固有層で、束を形成し嗅球に向かう。支持細胞の細胞体は比較的表層近くに存在し、表層には多くの微繊毛を有する。電子顕微鏡の観察では、細胞質は嗅細胞より暗調でミトコンドリアを多く含む。嗅細胞と支持細胞との間には、接着装置(接着複合体)が認められる。基底細胞は上皮の底部の基底膜に接して存在し、分裂能を有し嗅細胞を新生する、いわゆる幹細胞の役割を持つ。嗅粘膜にはボウマン氏腺と呼ばれる腺組織があり、これから分泌される粘液により上皮表面は覆われている。嗅物質はこの粘液に溶けることにより受容される。

嗅細胞は、一般の上皮細胞同様つねにターンオーバーしている。嗅細胞の寿命はネズミでは2・3ヶ月と報告されている。新しい細胞は基底細胞の細胞分裂により生じ、樹状突起を表層に伸ばすとともに新しい軸索は嗅球に向かう。このように、嗅細胞は感覚細胞および上皮細胞でありながら、軸索を有する神経細胞としての役割ももつ、大変ユニークな細胞である。

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

2-1) 光学顕微鏡観察

ヘマトキシリン-エオジンおよびニッスル染色で嗅上皮を観察した結果、細胞数の減少や上皮の厚さについて、グループ間で差は認められなかった。Olfactory marker protein (OMP) は嗅細胞に特有に存在する蛋白質で、成熟嗅細胞のマーカーとして利用されている。OMP の抗体を用いて、曝露嗅粘膜を観察した。嗅上皮下半層部に OMP 陽性細胞が観察され、粘膜固有層には OMP 陽性の嗅神経の束が走っているのが観察される。これらの染色性に関して、グループ間で染色性に特に有意な差はみとめられなかった(図3)。これは、嗅細胞は、曝露の影響で変性死滅することにより、成熟が止まったりその数を減少することなく、嗅上皮に存在することを意味する結果である。

2-2) 電子顕微鏡による観察

嗅細胞の上皮表面に突出している嗅小胞や繊毛および支持細胞の微絨毛の形態異常を示すマウスは2000ppb 曝露グループで認められた(表2)。嗅小胞からの繊毛の突出が少なく、小胞突起内に空胞を形成しているものが多く、変性過程の形態学的特徴を示す。また、支持細胞の微絨毛の長さが短くなっているものが多く、ある場合は微絨毛の数が減少しており、まばらに残っているものも、その長さが短い(図4)。認められた形態異常は変性像としては軽微なもので、変性像を示す嗅上皮がどの程度機能障害を示すかに関しては、他の研究手法で解析する必要がある。

3) 嗅球の構造

光学顕微鏡で観察すると、主嗅球は他の大脳皮質と同じように層構造を形作っている事がわかる。図5に示すように表層から嗅神経層(ONL)、糸球体層(GL)、外叢状層(EPL)、僧帽細胞層(ML)、内叢状層(IPL)、顆粒細胞層(GRL)とよばれる層により構成されている。嗅球を構成するニューロンは、嗅球から軸索を高次中枢に投射する出力ニューロン(中継ニューロンあるいは投射ニューロンともよばれる)である僧帽細胞(m, MC)と房飾細胞(t)、そして嗅球内に限局する介在ニューロンの顆粒細胞(g, gc)と傍糸球体細胞(pg, pgc)がおもなものである(図6)。その他に嗅球を構成する神経要素としては、嗅球に入力する線維である。代表は、嗅上皮に存在してにおいを受容する嗅細胞の軸索である嗅神経(ON)で、ほかには、高次中枢からの入力線維がある。これらの神経要素が組織的に構成され、6層構造が形成される。

嗅神経は嗅上皮の基底膜を通過した後、束となり篩板を貫いて嗅球に入り、主嗅球の表層を表面に平行に走行し、次第に束がほぐれてお互い混ざり込む。嗅球表層で嗅神経により構成される部位を嗅神経層と呼ぶ。嗅神経は束がほぐれた後、糸球体に入り枝分かれして糸球の形となる。

また、糸球体はまわりを小型の傍糸球体細胞(直径6-8 μ m)で取り巻かれて、ユニットを形成している。このことから糸球体という名前がついた。嗅神経終末は糸球体内の他の神経要素とシナプスを形成する(図7)。糸球体の中には、僧帽細胞、房飾細胞および傍糸球体細胞の樹状突起が存在し、それぞれが嗅神経終末とシナプスを形成している。傍糸球体細胞は伝達物質としてGABAをもっており、中継ニューロンの興奮を抑制する機能を持つ。さらに、このニューロンの一部はドーパミンを共存させている。(THはドーパミン合成酵素群の律速酵素である)。ドー

パミンの存在意義はいまだ不明であるが、GABA の抑制機能を修飾していると推測されてる。たとえば、嗅上皮を破壊したりあるいは鼻腔をふさぐなどして嗅神経の活動を抑制すると、TH 量あるいは TH 陽性細胞が減少することが知られている。したがって、嗅神経の活動をモニターするには、大変有効である。このように、糸球体は嗅神経からのにおい情報に関して、最初に情報処理をする部位である。糸球体の数はウサギやネズミでおおよそ 1700 - 2000 個といわれている。これらが、主嗅球に同心円状にほぼ一列に並んでいる。

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

OMP の免疫細胞化学染色により嗅細胞の軸索である嗅神経が特異的に染色される。したがって、嗅球の神経細胞層および糸球体が染まる。染色像で見ると、各グループ間で差はなく、2000ppb グループでも嗅神経は嗅球に正常に投射しているものと考えられる (図8)。嗅球におけるチロシン水酸化酵素(TH)免疫細胞化学法によりドーパミンニューロンを観察した。糸球体に存在するドーパミンニューロンを免疫染色して、曝露の効果を解析した。この結果、0ppb に比べて 80ppb、400ppb さらに 2000ppb 群というように曝露濃度依存的 TH 陽性ドーパミンニューロンの数が増え、また TH の免疫染色性も強くなる傾向が見いだされた (図9、10)。現在、染色性を定量的に計測する方法を検討中である。

PGN におけるドーパミンの機能は明らかでないが、刺激依存的に増加し PGN の抑制効果を調節していると考えられる。

(5) 考察

ホルムアルデヒド 2000ppb 曝露群の約半数のマウス嗅上皮表面で、嗅小胞および繊毛そして支持細胞表面の微繊毛が脱落していることが電子顕微鏡観察で明らかになった。一方、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、各群とも嗅上皮の嗅細胞は OMP 陽性であることから、細胞体は正常に保たれていると推測される。また、上皮の厚さも差が認められないことから、2000ppb 長期曝露で上皮の表面近傍のみが変性しているものと思われる。したがって、どの程度嗅感覚が異常をきたしているかは生理学あるいは行動学的研究を必要とする。一方、嗅球のドーパミンニューロンが曝露濃度依存的に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 PGN の活動が高まりドーパミンニューロンも TH 含有量も増加したものと推測される。結果として、ドーパミンの増大が動物の脳にどのような影響を与えているか推測の域を出ないが、少なくとも嗅覚系においては、ホルムアルデヒドの持続的な刺激を解除するような脳内メカニズムが働いていると思われる。この作用がさらにストレスとして働いている可能性もある。

嗅覚器

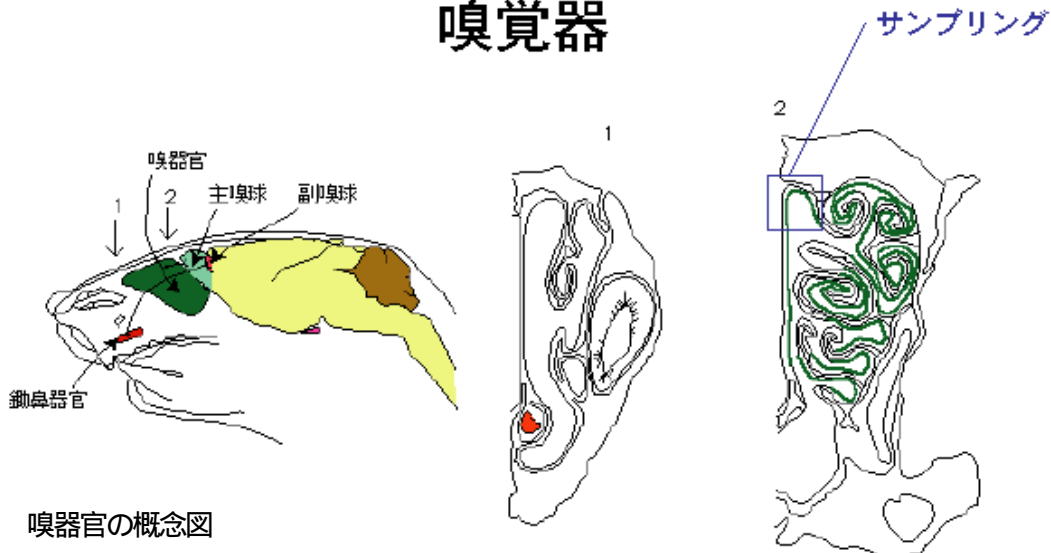


図1 嗅器官の概念図

(左図) ネズミの頭部を横から見たもの。嗅器官、鋤鼻器官、脳(主嗅球、副嗅球)の位置を図示してある。(右図) 鼻腔の構造。左図の矢印1および2のレベルの横断面。鋤鼻器官(赤色で示す)および嗅器官(嗅粘膜)(緑色で示す)の位置を描いてある。

嗅粘膜および嗅上皮の概念図

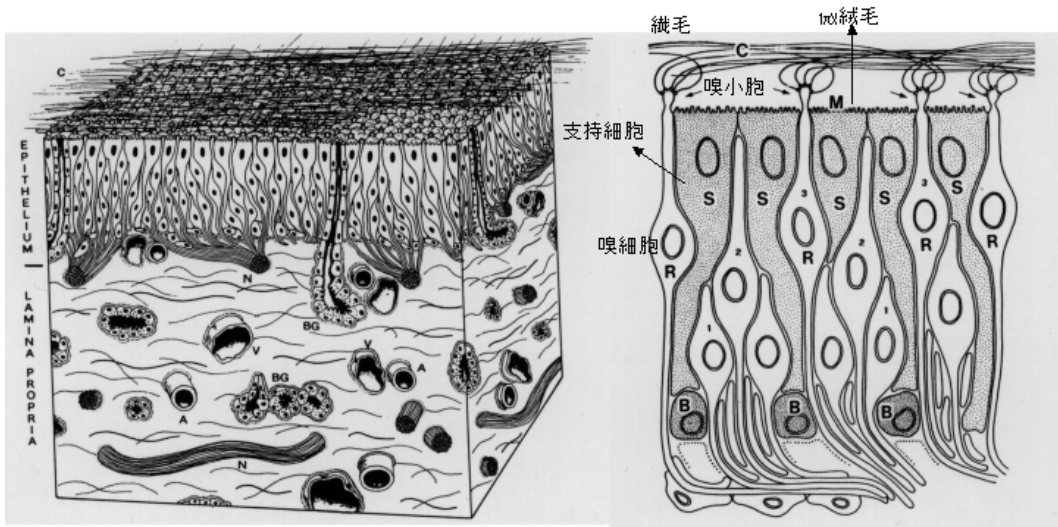


図2 嗅粘膜の構造

(左) 嗅粘膜の組織像 嗅上皮(epithelium)と粘膜固有層(lamina propria)から構成される。嗅上皮と粘膜固有層は基底膜で境とされる。嗅上皮は3種の細胞(嗅細胞、支持細胞、基底細胞: 図BのR、S、B)より構成され、上皮の中にボウマン氏腺(BG)が侵入している。嗅上皮表面には繊毛(C)と微繊毛が密に存在する。嗅細胞の軸索が束となって固有層を走る(N)固有層には他に細い動脈(A)と静脈(V)が侵入している。

(右) 嗅上皮の断面像 嗅細胞(R)、支持細胞(S)と基底細胞(B)からなり、幹細胞である基底細胞が分裂することにより新しい嗅細胞となる。次第に表層へと移動し、突起の一部を表層に突出することにより成熟した嗅細胞となる。突出部分を嗅小胞とよび繊毛が存在する。支持細胞表面には微繊毛が存在する。(図は Farbman A: Cell Biology of Olfaction, 1992 より引用)