

4 . 脳内海馬での情報処理変化の検索

研究協力者

笛田由紀子(産業医科大学産業保健学部第1生体情報学)

課題研究全般と抑制系の電気生理学的検索

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)

シナプス可塑性の電気生理学的検索

福永浩司(熊本大学医学部第1薬理学)

細胞内シグナル伝達の神経化学的検索

研究補助者

新井潤(九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報)

野村和美(熊本大学医学部第一薬理)

(1) 研究要旨

本態性多種化学物質過敏状態の機構として、神経系の関与が示唆されている。とくに、嗅覚の経路と大脳辺縁系や視床下部での神経情報処理の変化が注目される。我々の研究班は、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いて、神経情報処理がどのような影響を受けるかに注目した。平成 12 年度は、0ppb、2000ppb 濃度において、抑制性の変化とシナプスの可塑性の変化を検討した。さらに、それらの変化が海馬の神経細胞の形態変化によるのかどうか、免疫組織化学の手法で調べた。その結果、海馬から皮質への出力領域である CA1 において、シナプスの長期増強が減弱されていることがわかった。また、内嗅皮質から海馬への入力部位である歯状回では、反回抑制の減弱を示唆する結果を得た。また、免疫組織化学で調べたかぎりでは、細胞やシナプスの脱落等の形態学的に顕著な変化はみられず、機能分子の分布にも顕著な変化はなかった。今年度は、曝露濃度を 0ppb、80ppb、400ppb、2000ppb とした。CA1 の長期増強は 80ppb 以上で減弱し(図 7、表 1)、歯状回における抑制も 80ppb でも減弱の傾向をしめした(図 2)。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(図 8)。また、synapsin I や GluR1 に大きな変化がみられ(図 9)、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。個体差が大きい結果については、遺伝子よりも環境による影響が低濃度化学物質に対する感受性に差を生じさせていることと関連するかもしれないが、今後、同一個体試料での多方面からの解析も考慮に入れた実験が望ましい。

(2) 研究目的

1) 今年度の研究目的

今年度は、長期増強の減弱についての量-反応関係を明らかにするとともに、反回抑制系の減弱についてデータの蓄積と再現性の検討を行った(長期増強、反回抑制の意味と生理学的意義については平成12年度の報告書を参照されたい)。さらに、今年度は、機能変化に関連すると思われる細胞内シグナル伝達についての検討を追加し、神経細胞機能分子を免疫ブロットにて定量解析し、機能変化に関連する分子を検索した。

2) 細胞内シグナル定量解析の意義

カルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II)、プロテインキナーゼ C (PKC)、増殖因子活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) は海馬を介する記憶学習の獲得過程に関与している。特に、CaM キナーゼ II は海馬の興奮性入力である錐体細胞の樹状突起に高濃度発現しており、スパインの形態変化を引き起こすこと、あるいはシナプスのグルタミン受容体 (GluR1) の量を変化させることによってシナプス伝達効率を長期的に変化させる。すなわち、シナプス伝達長期増強 (LTP)、長期抑制 (LTD) などのシナプス可塑性に主要な役割を果たしている。一方、MAP キナーゼは核内の CREB (cAMP response element binding protein) 蛋白質をリン酸化して、神経の回路形成や生存に関与する蛋白質発現を調節している。PKC に関してはその標的は不明である。本態性多種化学物質過敏状態の中樞神経症状として、ヒトにおいて疲労感、集中力の低下、記憶力の低下など、精神的ストレス状態とてんかん様症状を引き起こすことがあると報告されている。本研究では微量ホルムアルデヒドの長期曝露による中樞神経系への影響についてマウスを用いて検討した。特に海馬において記憶、学習に関する CaM キナーゼ II、PKC、MAP キナーゼ系について解析した。

(3) 研究方法

1) 反回 (側方) 抑制の検索

ホルムアルデヒド (80ppb、2000ppb) を 12 週間 (12-16 週間) 曝露した C3H/HeN 雌マウスを用いて、スライス標本の作成方法は昨年同様に行った。ジエチルエーテル麻酔下で断頭した後、両側の海馬を脳より速やかに取り出し、McIlwain tissue chopper で 450 μ m の厚さで海馬スライスを作成した。スライスは、O₂/CO₂ 混合ガス (95%/5%) で飽和した人工脳脊髄液を灌流したインターフェイス型チャンバーで1時間インキュベートした後、実験に用いた。人工脳脊髄液の組成は、124mM NaCl、2mM KCl、1.25 mM KH₂PO₄、2mM CaCl₂、2mM MgSO₄、26mM NaHCO₃、10mM グルコースを使用した。

CA1 錐体細胞層に微小ガラス電極を置き、CA3 細胞の軸索である Schaffer の側枝が走行する放線層に刺激電極を配置した。歯状回(dentate gyrus, DG) では、顆粒細胞に微小ガラス電極を置き、貫通線維軸索が走行する外側分子層に刺激電極を配置した。最大の集合スパイク電位を誘発する大きさ(すなわち最大刺激)で電気刺激して、ホルムアルデヒド曝露群マウスと対照群マウスからえられたスライスの実験条件を合わせた。

平成 12 年度同様に、反回(側方)抑制を誘発する方法として、2回連続電気刺激(ペアパルス刺激、間隔 5、10、20ms)を与えた。そして、一回目の電気刺激に対する電位の応答が2回目の電気刺激に対する応答にどの位影響しているかを調べた。影響の評価は、一般的に広く用いられているペアパルス比で行い、下式のように計算した。

集合スパイク電位(population spike, PS)のペアパルス比 = PS_2 / PS_1

PS の振幅の測り方は図 1 参照。前年度報告書に説明したように、短い刺激間隔(5-20ms)におけるペアパルス比の減少は、反回または側方抑制の存在を示すと理解されている。

スライス実験に使用したマウスの数は、2000ppb 曝露群 12 匹、80ppb 曝露群 6 匹、対照群 8 匹であった。各マウスから 2-4 枚のスライスを実験にもちいた。一個体から得られたスライスの平均値をもって、その個体の値とした。

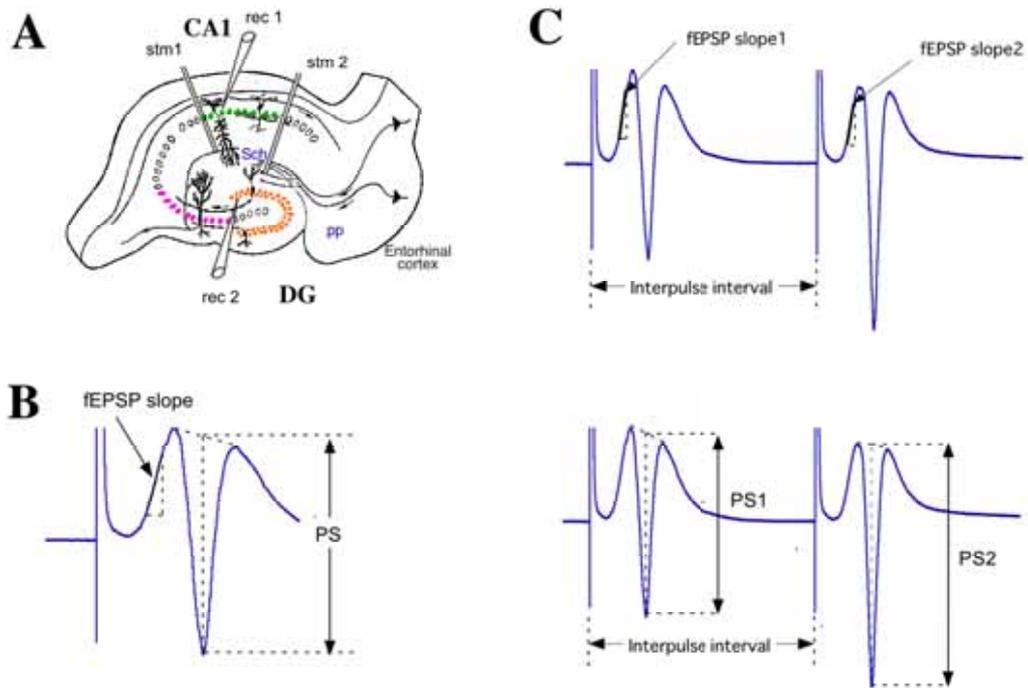


図 1 電極の位置とペアパルス応答の計測のしかた

A: CA1 と歯状回(DG)での刺激電極と記録電極の位置。 B: 単一刺激で誘発される集合スパイク電位(PS)。 C: 一定の刺激間隔(interpulse interval)で入力線維を電気刺激する。1回目の電気刺激に対する細胞の応答(集合スパイク電位、PS1)と2回目の電気刺激に対する細胞の応答(集合スパイク電位、PS2)が記録される。PS2/PS1 の比をペアパルス比と定義する。

2) 長期増強

ホルムアルデヒド(0, 80, 400, 2000ppb)に 12 週間曝露したマウスをジエチルエーテルで麻酔し、断頭した後、海馬を取り出し、スライスチョッパー(McIlwain tissue chopper)及びマニュアルで 4-500 μm の海馬スライスを切り出した。スライスは、海馬体の真ん中 1/3 から切り出した。切り出したスライスを人工脳脊髄液溶液(124mM NaCl, 5mM KCl, 1.25mM NaH_2PO_4 , 2mM MgSO_4 , 26mM NaHCO_3 , 10mM Glucose, 2mM CaCl_2)に浸し、スライスして1時間後から測定を開始した。LTP の測定は、CA1 への入力繊維である Schaffer 側枝を両極性のタングステン刺激電極にて刺激して、CA1 のシナプス層(stratum radiatum)にガラス微小電極(抵抗 1-2 $\text{M}\Omega$)を指した。テスト刺激は、1/60Hzで行い、LTP を誘導する刺激には、バースト刺激(theta burst stimulation; TBS; 100Hz X 5, 5Hz X 5)を使用した。テスト刺激、TBS 共に、最大集合シナプス後電位(pEPSP)の半分の振幅を与える刺激強度に設定した。LTP の増強度は、pEPSP の傾きの変化で示した。

3) 細胞内シグナル伝達

C3H マウスをホルムアルデヒドの 2000 ppb に 12 週間曝露した。最終曝露後に大脳皮質(頭頂部)、海馬を摘出した。海馬においては CA1, CA3, 歯状回(DG)の各領域に分割して液体窒素で凍結後、 -80°C に保存した。各組織を 0.5 % Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤を含む可溶化バッファーでホモゲナイズ後、遠心分離して細胞抽出液を得た。CaM キナーゼ II、プロテインキナーゼ C、MAP キナーゼの活性変化を免疫プロット法で調べた。活性型プロテインキナーゼの定量はそれぞれの活性化に必要な分子内リン酸化反応を認識する抗体で免疫プロットして測定した。平成 12 年度の笛田、夏目らの研究により、シナプス伝達効率が海馬で変化することが明らかにされたことから、神経終末において興奮性伝達物質、グルタミン酸の放出に關与する synapsin I の量、後シナプスにおいてはグルタミン酸受容体のうち AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate)受容体 (GluR 1)の量を免疫プロットにて測定した。

(4) 研究結果

1) 抑制系の検索

海馬への入力部位である歯状回において、ペアパルス抑制を 80ppb 群、2000ppb 群と対照群と比較した(図 2)。いずれの濃度においても、対照群より、ペアパルス比が増加(抑制が減弱する)していた。しかし、個体間のばらつきが大きく、平均値の差は有意ではなかった。昨年、くしゃみとの関係が議論されていたので、くしゃみ回数とペアパルス抑制の相

関を調べた(図 3)。くしゃみを測定したタイミングがマウスによって多少ことなり、正確さに若干かけるが、図 3 から、くしゃみとペアパルス抑制には相関が無いことがわかった。くしゃみ回数は、今年度も、濃度依存性かつ曝露期間依存性に増加した(曝露の行動への影響の章を参照)ことと、80ppb 群の C3H/HeN マウスで脱抑制傾向がみられたことから、くしゃみと脱抑制に相関はなかった。

CA1 領域では、昨年同様に、2000ppb 曝露群と対照群のペアパルス比に差は認められなかった(図 4)。

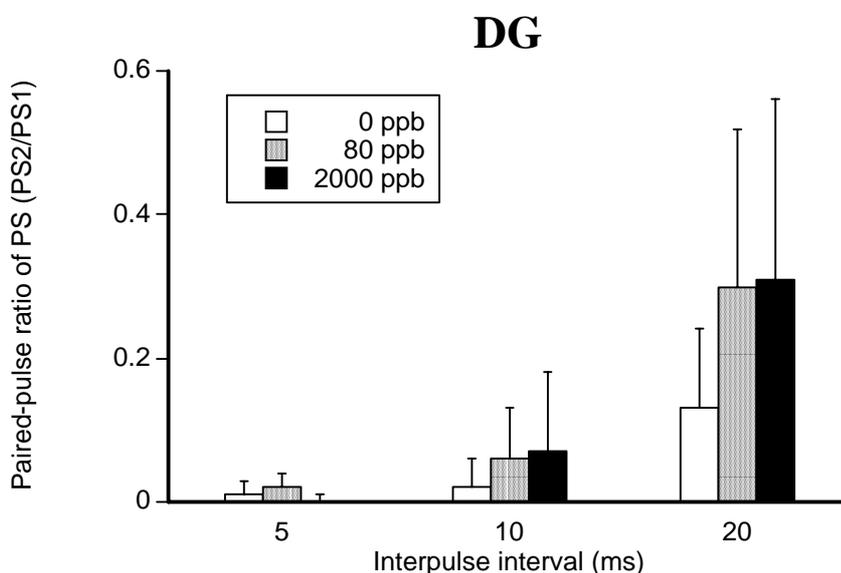


図 2 歯状回におけるペアパルス抑制

短い刺激間隔(5、10、20ms)において、80ppb (6 匹)、2000ppb 曝露群 (12 匹) で対照群 (8 匹) よりも、ペアパルス比の増加(抑制が減弱する)傾向がみられた。しかし、個体で得られる値にばらつきがみられたため、標準偏差が大きくなり有意な差には達しなかった。値は、平均±標準偏差である。

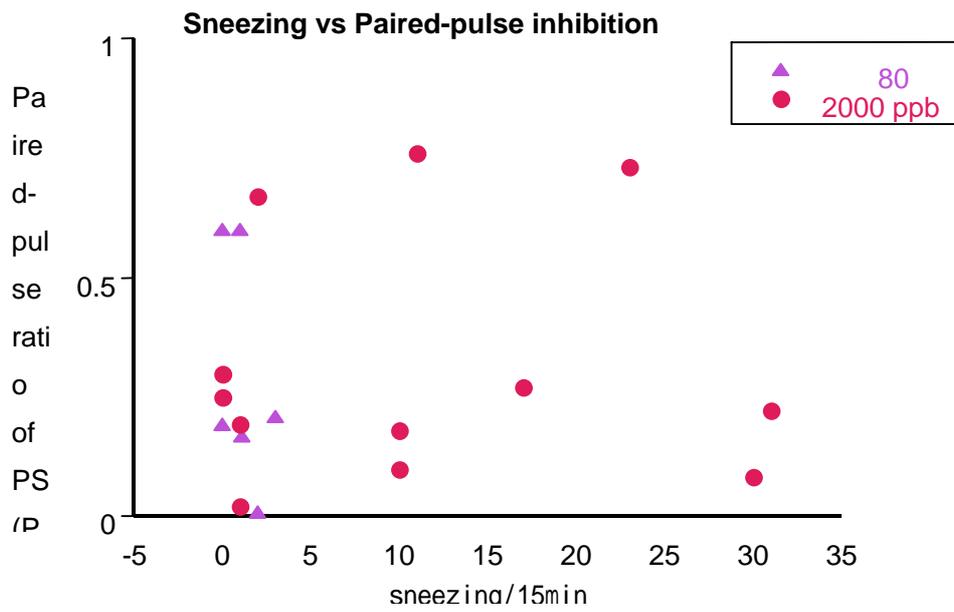


図 3 くしゃみと歯状回のペアパルス抑制の減弱には相関がなかった。ただし、平成13年度の80ppb群は曝露11週でくしゃみ計測をして16週でスライスをした。2000ppbは、曝露13-15週のスライス当日-2週間前にくしゃみを計測した。

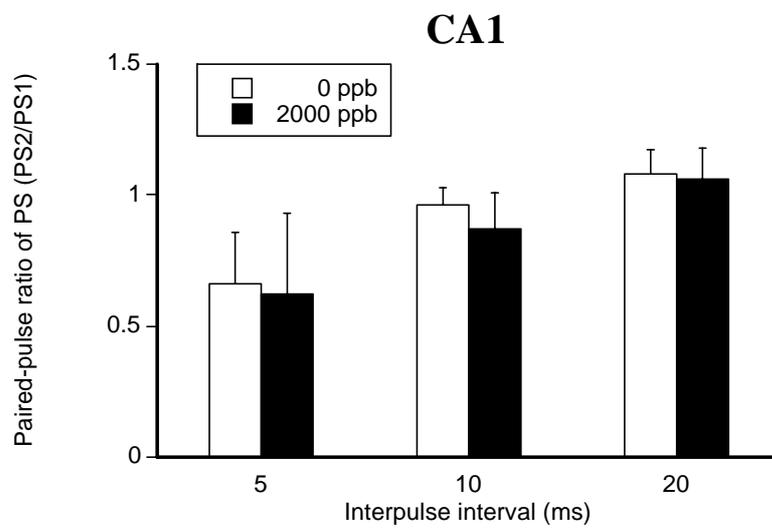


図 4 CA1 領域における集合スパイク電位のペアパルス比
ペアパルス比は 2000 ppb 曝露群と対照群で差がなかった。すなわち CA1 では脱抑制はみられなかった。値は平均±標準偏差である。

2) 長期増強

コントロール群と2000ppb FA曝露群とで、刺激によって誘導されたpEPSPの大きさ(傾き、振幅)には観察されなかったが、TBSによってLTPを誘導すると、コントロール群のLTPでは、TBSによってpEPSPの傾きが約3倍に増強(post tetanic potentiation)し、その後、少なくとも40分間維持された。従ってLTPが生成したと考えられる(図5(a))。コントロール群において、LTPが生成したスライスは11例中10例あった。一方、2000ppb FA曝露したマウスからの海馬スライスにおいては、LTPは起こりにくかった。中には起こった例もあり、それを図5(b)に示した。図に示したように、コントロール群のLTPに比べて、その増強度は小さかった。2000ppb FA曝露マウスにおいてLTPが起こったのは12例中5例であり、コントロールの半分の割合であった(表1)。LTPの大きさについて統計解析を行うとFA曝露群では、LTPが顕著に抑制されていた(図6)。TBS後30-40分間のLTP増強度の平均を、0, 80, 400, 2000 ppb FA曝露群で比較すると、80ppb以上のFA曝露によって、有意($p < 0.0001$)に減少していた(図7)。以上の結果より、FA曝露により有意にLTPが抑制されると考えられる。

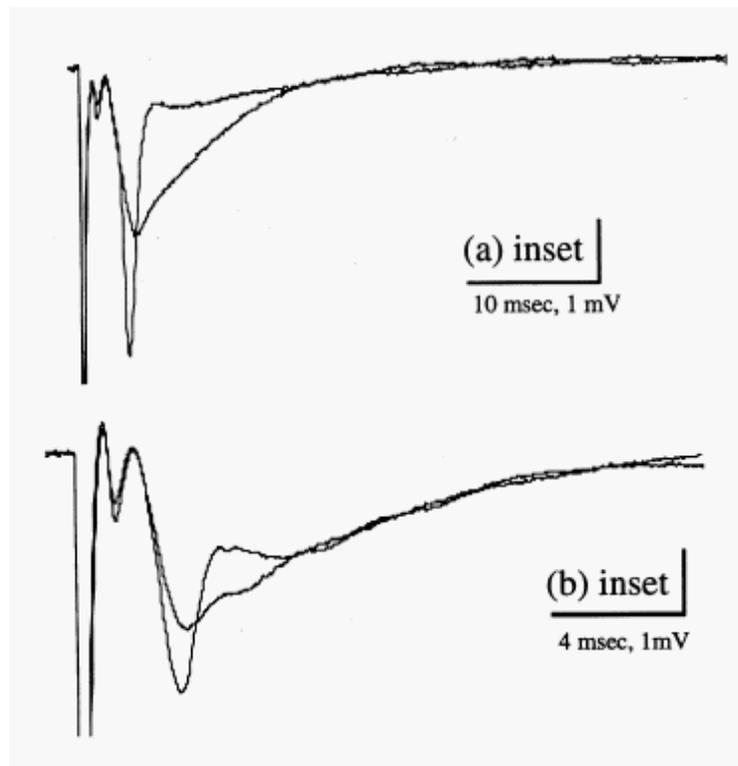


図 5: コントロールのマウスにおける TBS 前後における pEPSP(a)、2000ppb FA 曝露マウスにおける TBS 前後の pEPSP(b)の結果。

	LTP が誘導されたスライスの枚数	LTP が誘導されなかったスライスの枚数
コントロール群	10	1
2000ppb FA 曝露群	5	7

表 1 ; コントロール群と 2000ppb FA 曝露群における LTP 誘導されたスライスの枚数の比較(p=0.0272; Fisher の直接確率法)

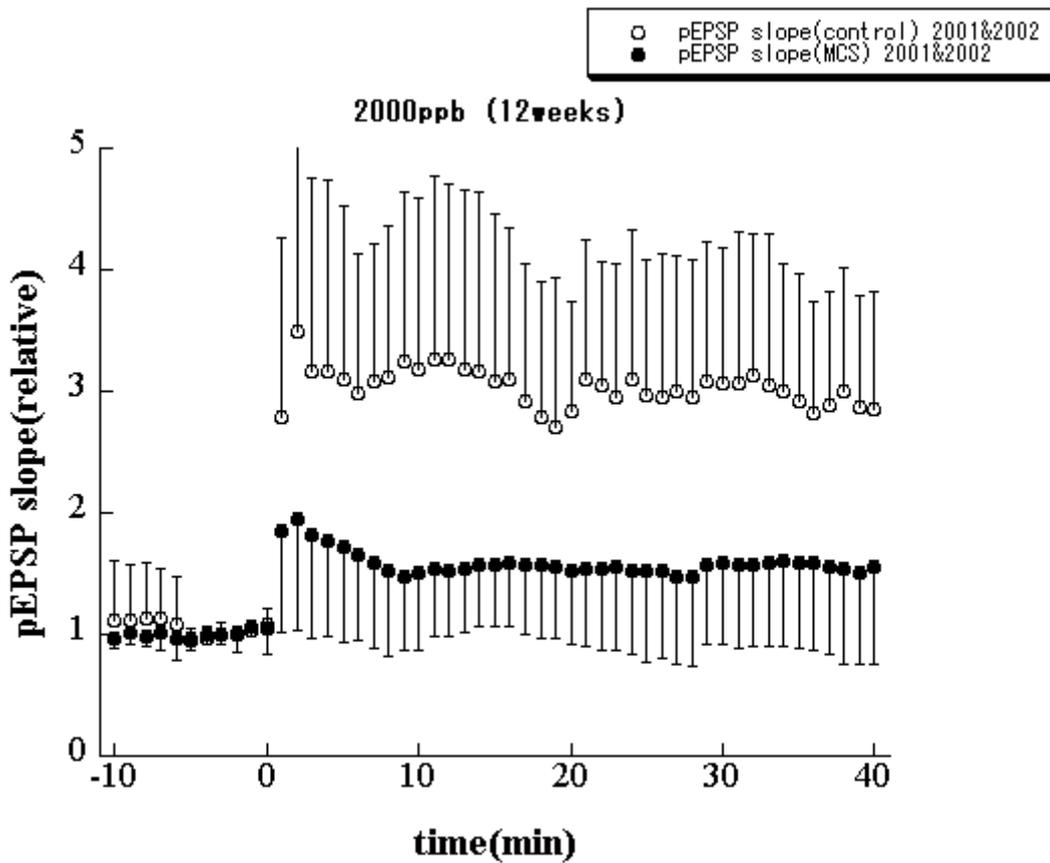


図 6: コントロール及び FA2000ppb 曝露マウスにおける pEPSP 経時変化。時間 0 分において TBS を行った。白丸、黒丸共に TBS 前の pEPSP 傾きの平均値で規格化し、全てのデータの平均値を表示した。バーは標準誤差を示す。白丸がコントロール(11 例)、黒丸が FA 曝露群(12 例)。

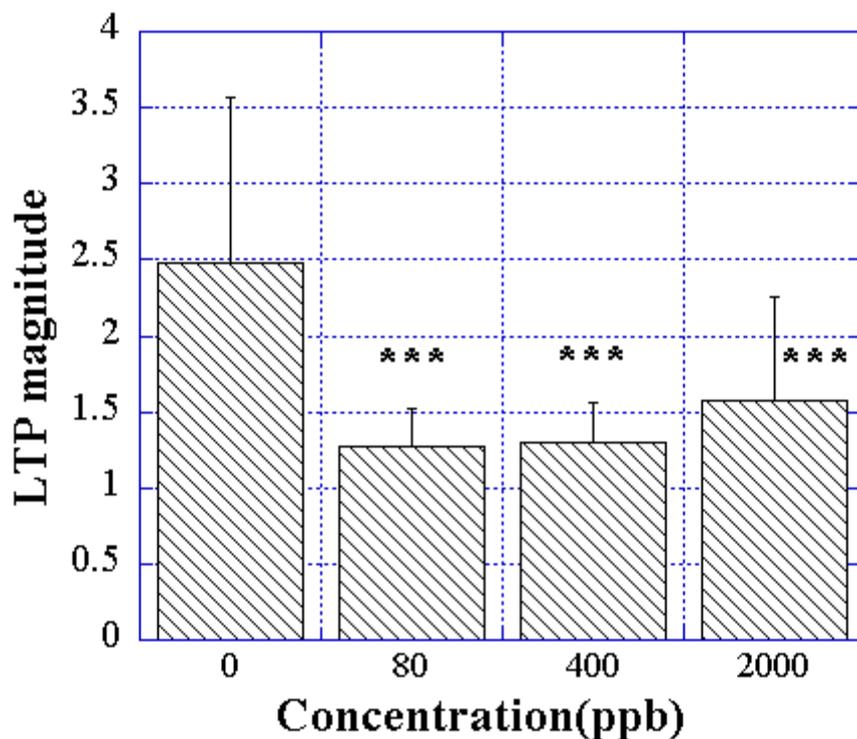


図 7 LTP の大きさの FA 濃度依存性。バーは、下記に示される LTP の大きさを表示し、縦棒は、標準偏差を示す。FA 濃度 80ppb 以上で、海馬 CA1 領域の LTP は有意に抑制されていた (***) $p < 0.0001$, ANOVA, Scheffe's method as post-hoc test)。各濃度群で LTP が生じたのは、80ppb 曝露群では、6 例中、4 例、400ppb 曝露群では、17 例中 6 例であった。この頻度データに関して、 χ^2 乗検定を試みたが、80ppb における期待値が 5 以下になってしまい、適用する事が出来なかった。

$$\text{LTP magnitude (LTP の大きさ)} = \frac{(\text{TBS30 - 40分後の } pEPSP \text{ の大きさの平均値})}{(\text{TBS前10分間の } pEPSP \text{ の大きさの平均値})}$$

3) 細胞内シグナル伝達

CaM キナーゼ II は分子量約 5~6 万の γ 、 β 、 α 分子が 10~12 分子会合するオリゴマーとして存在する。今回は興奮性シナプスに局在する α 型 CaM キナーゼ II の活性変化を調べた。CaM キナーゼ II の活性型を特異的に認識する抗体で免疫プロットして活性型 α 型 CaM キナーゼ II の量を測定した。2000 ppb 曝露によって海馬の CA1 と CA3 領域において CaM キナーゼ II の活性は有意に上昇した(図 8)。同様に、活性型のキナーゼを認識する特異抗体を用いて、PKC と MAP キナーゼ (MAPK) の活性を測定した。いずれの部位においても PKC の活性には変化がない。一方、MAP キナーゼにおいては DG で有意な活性の上昇が見られた(図 8)。

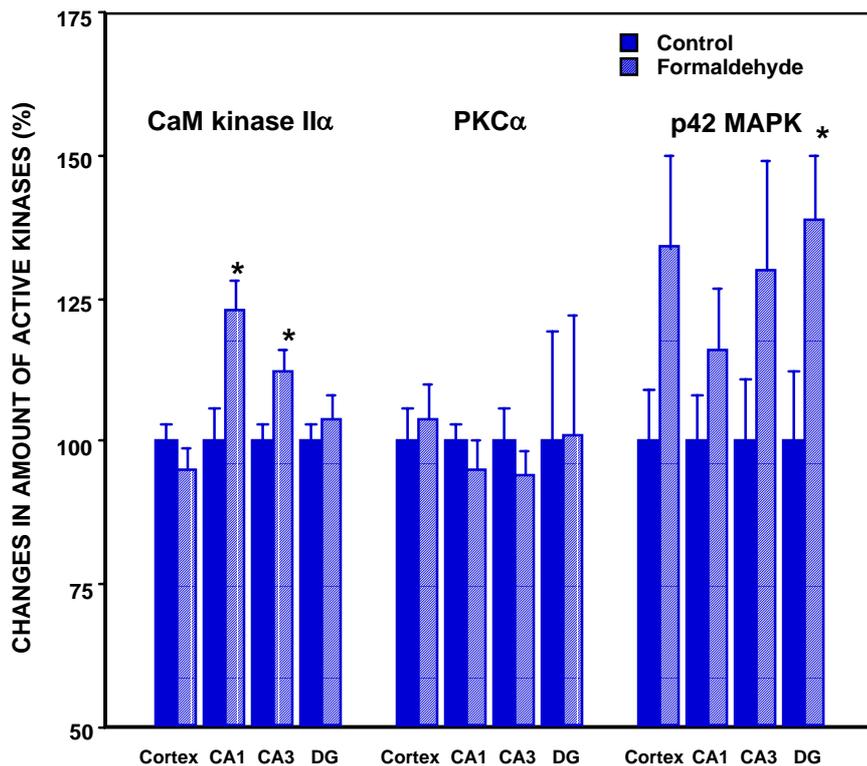


図 8 ホルムアルデヒド曝露に伴う活性型プロテインキナーゼの変化

次に、synapsin I とグルタミン酸受容体の GluR1 の定量を行った(図 9)。海馬 CA1 と DG 領域において synapsin I が有意に上昇した。GluR1 においては CA1 領域のみで有意に上昇した。

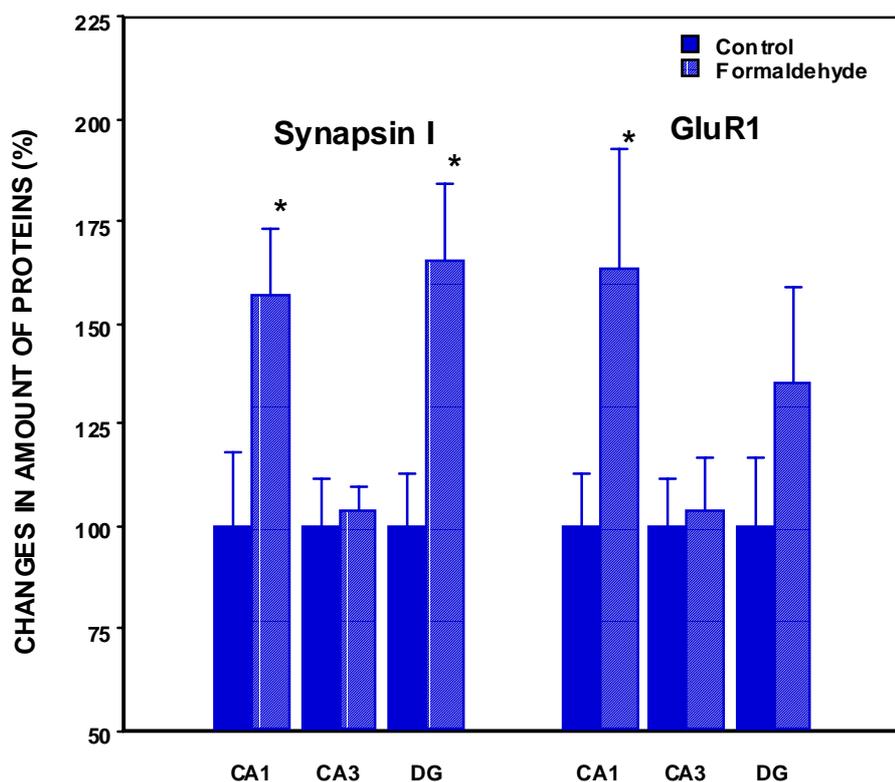


図 9 ホルムアルデヒド暴露に伴う synapsin I と GluR1 の変化

(5) 考察

80ppb 以上の濃度による長期ホルムアルデヒド暴露によって、海馬 CA1 領域における LTP は抑制する傾向と、歯状回における反回抑制は減弱する傾向にあると考えられる。LTP に関しては、ホルムアルデヒド暴露により、海馬内のシナプス可塑的变化が阻害されるので、個体レベルでの記憶学習過程が阻害される可能性が示唆される。福永らの結果によると、2000ppb 曝露群の CA1 領域において、CaM キナーゼ II 活性が有意に増加している。CaM キナーゼ II は、LTP 誘導に關与するキナーゼであるが、ホルムアルデヒド

ド曝露による活性化型 CaM キナーゼ II 増加と LTP の抑制との関係に関しては、現在の所不明である。曝露群におけるペアパルス比の増加は、反回抑制の減弱から海馬の興奮性が増加したことを示唆する。興奮性増加に関して個体差が大きいことは、本態性化学物質過敏状態の個体差に関係するかもしれないので、同一個体での試料を、海馬だけでなく多方面から調べる必要性が今後の課題であろう。

細胞内機能分子に関しては、2000ppb のホルムアルデヒド曝露によって、特に、CaM キナーゼ II 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。これらのシグナル伝達系の異常がヒトにおけるどの症状に関連するのか結論づけることはできないが、ホルムアルデヒドが脳においてストレスや過敏状態など異常な状態を引き起こすことは想像できる。特に、MAP キナーゼ活性において、個体差が大きいことは、動物における本態性化学物質に対する感受性に差があることと関連するかもしれない。また、シナプス伝達効率に直接影響する、synapsin I や GluR1 においても大きな変化が見られたことから、シナプス伝達の異常も惹起される可能性が高い。今後、得られたシグナル伝達系の異常がシナプス伝達効率の変化やさらに高次脳機能の異常にどのように関連するのか検討する。

(6) 結論

80ppb 以上のホルムアルデヒド曝露は、海馬 CA1 シナプス LTP に対して抑制効果があると考えられ、海馬が関与する記憶学習過程に影響を及ぼす可能性が予想される。80ppb 以上の曝露における抑制の減弱傾向は興奮性の増加を示唆する。また、2000 ppb のホルムアルデヒド曝露によって、特に、CaM キナーゼ II 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。

(7) Abstract

Electrophysiological and neurochemical analysis on disturbance of neuronal information processing in mice chronically exposed to a low concentration of formaldehyde

Yukiko FUETA¹, Kiyohisa NATSUME², Kohji FUKUNAGA³

¹Department of Medical Technology I, School of Health Sciences, University of Occupational and environmental Health

² Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

³Department of Pharmacology, School of Medicine, Kumamoto University

To investigate effects of long-term inhalation (12w) of a low concentration of formaldehyde (FA) on neuronal information processing in the hippocampal formation, we analyzed paired-pulse responses of population spike and long-term potentiation (LTP) using slices, and then combined the electrophysiological results with neurochemical study of intracellular signaling. Tendency of granule cell disinhibition in the dentate gyrus was observed in mice exposed to 80ppb and 2000ppb tested, while there was no changes in paired-pulse inhibition in the CA1 at 2000ppb. LTP induced by a -burst stimulation applied to Schaffer collaterals in the CA1 was significantly suppressed in the mice exposed to 80,400 and 2000 ppb FA. The electrophysiological results suggest that inhibitory system and memory processing can be impaired in the mice exposed to FA. Since the suppression of LTP induction was observed following exposure to FA, we next investigated amount of the active forms of CA^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) which are involved in the hippocampal LTP induction. We also assessed amount of the synaptic components such as synapsin I and an AMPA type glutamate receptor (GluR1 subunit). The amount of active CaMKII significantly increased in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus without changes in the active PKC . In contrast, a significant increase in the active

MAPK was seen in the dentate gyrus. Significant increases in amount of synapsin I and GluR1 in the CA1 region and synapsin I in the DG were also evident in the FA-exposed mice. The abnormalities in the expression of the signaling molecules and synaptic components may be associated with the suppression of LTP induction and disturbance of the neural functions by exposure to FA.

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

研究者：藤巻 秀和（独立行政法人国立環境研究所）
研究協力者：黒河 佳香（独立行政法人国立環境研究所）
 樺田 尚樹（産業医科大学）

（1）研究要旨

昨年度の再現性の検討と抗原の吸入感作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免疫関連機能への影響について検討した。その結果、昨年同様ホルムアルデヒド曝露のみでは免疫機能に大きな変動はみられなかった。吸入抗原感作を行うことにより誘導される炎症モデルでは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脾臓細胞におけるケモカイン産生で増加がみられたが、抗体価における増強は認めなかった。脳においては、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においては低濃度ホルムアルデヒド曝露による増加が認められた。

（2）研究目的

MCSの発症と極低濃度化学物質曝露との関連について検索するためには、アレルギー反応とは異なる過敏状態の誘導の有無について調べることは重要である。そこで、低濃度ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響と抗原感作により誘導される即時型、あるいは遅発型のアレルギー反応との差異や関連について明らかにすることを目的とした。MCS患者の中にはアレルギー疾患の既往歴のある人が60%近く含まれるという報告もみられているので、MCSの発症と免疫系との何らかの関連性が推測される。昨年度は低濃度ホルムアルデヒド曝露による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、ホルムアルデヒド曝露とは異なる経路で抗原を投与して全身感作した群としない群にそれぞれホルムアルデヒドを曝露し、脳内、呼吸器、脾臓、血中におけるサイトカイン、抗体価の変動について比較検討した。本年度は、昨年度と同様の濃度でホルムアルデヒド曝露を行い、呼吸器を介した抗原エアロゾル感作によるアレルギー性炎症モデルへの影響について検討した。

（3）研究方法

1）実験動物

8週齢の雌 C3H/HeN（日本チャールスリバー）マウスを購入し、2週間馴化後10週齢より曝露実験に供した。ホルムアルデヒドの曝露は、昨年同様2000ppb 曝露群、400ppb 曝露群、80ppb 曝露群、コントロール群の4群で12週間行った。

2) アレルギー性炎症モデルの作成

抗原の吸入感作を繰り返すことにより肺への炎症性細胞の集積と抗原特異的 IgE 抗体産生増強を示すマウスモデルを作成した。まず、ホルムアルデヒド曝露前に 10 µg/マウスの濃度で卵白アルブミン(OVA)を 2 mg alum とともに腹腔内投与し、以後ホルムアルデヒド曝露期間中 OVA のみのエアロゾル感作を 3 週間に 1 回の割合で行った (表 1 exp.3)。最終投与の 1 週後、ネンブータル麻酔下で肺胞洗浄液、胸腺、脾臓の採取と採血を行った。また、脳内のサイトカイン量等を測定するため、マウスより下垂体、海馬、線条体とを取り出し冷 ELISA 緩衝液(1%BSA,0.05%Tween 20,0.1%NaN₃を含んだ PBS)中でホモジェナイズして遠心後上清を集めた。なお、抗原感作なし群は各群 5 匹、抗原感作群は各群 6 匹を用いた。

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

肺胞洗浄液中の炎症性細胞の集積については、洗浄液を遠心後に細胞数を算定しサイトスピン標本を作成し、ディフクイック (国際試薬) で染色して検索した。脾臓細胞は、スライドガラスを用いて細胞をばらばらにし、遠心により洗浄したあと細胞数を算定し in vitro で OVA と共に 24 時間と 48 時間培養した。肺胞洗浄液中、培養上清中、あるいは脳内のサイトカイン・ケモカイン産生量について、IL-1 , IL-4, IL-5, IL-6, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 , tumor necrotic factor (TNF) (Endogen, R&D Systems,あるいは Biosource International)と nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), transforming growth factor (TGF) (Promega)の ELISA キットを用いてそれぞれ測定した。

4) 抗体価の測定

血漿中の抗原特異的 IgE 抗体価は、anti-mouse IgE, biotinylated OVA を用いての ELISA 法で測定した。抗原特異的 IgG1,IgG2a は、HRP 標識した anti-mouse IgG1,IgG2a をそれぞれ用いて ELISA 法で測定した。また、総 IgE(ヤマサ)も ELISA 法により測定した。

5) フローサイトメトリー分析

細胞膜上の表面抗原の分析による脾臓細胞、および血中のリンパ球亜集団の解析は、PE 標識 anti-mouse CD3e hamster IgG、PE 標識 anti-mouse CD4 rat IgG2b、FITC 標識 anti-mouse CD19 rat IgG2a、FITC 標識 anti-mouse CD8a rat IgG2a (BD PharMingen)と対照抗体を用いて Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer で行った。

6) 統計処理

測定データは平均値 \pm SEで表示し、全体の分散分析と個々の対照群と暴露群間の有意差の検定は、それぞれANOVAとDunnnettによる検定を行った。

(4) 研究結果

1) 体重と免疫臓器重量の変動

低濃度ホルムアルデヒド曝露による体重と胸腺の重量への影響はみられなかった(表2)。これは、抗原の感作を行った炎症モデルマウスでも同様であった。脾臓の重量においては、湿重量では400と2000ppbの曝露で、体重あたりの重量ではいずれの曝露群でも低下がみられたが、抗原感作群では差はなかった。

2) 肺における炎症反応

肺における炎症反応の指標として考えられる肺胞洗浄液における炎症性細胞の集積とその中のサイトカイン・ケモカイン産生について調べた。ホルムアルデヒド曝露のみ(-Ag)では肺胞洗浄液中の総細胞数で変動はみられなかったが、抗原感作群(+Ag)の2000ppb曝露群では有意な増加が見られた(表3)。集積した炎症性細胞の分類では抗原感作群の2000ppb曝露群でマクロファージ(M ϕ)と好酸球(Eo)の数の有意な増加がみられたが、ホルムアルデヒド曝露のみでは顕著な変動はみられなかった。

次に、肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン産生について、IL-1産生ではホルムアルデヒド曝露のみでの80ppb曝露群で増加傾向がみられたが有意な差はみられなかった(図1a)。しかしながら、抗原感作群でのホルムアルデヒド曝露では濃度依存的な低下がみられ2000ppb曝露群で有意に低下した(図1b)。IL-6とTNF産生でも抗原感作群へのホルムアルデヒド曝露では同様に低下の傾向がみられたが、統計学的には差はなかった。炎症性細胞の集積や活性化に關与するケモカイン産生では、MIP-1とMCP-1産生においては抗原の感作の有無に關係なくホルムアルデヒド曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

3) 脾臓でのリンパ球亜集団の変動とin vitro サイトカイン・ケモカイン産生

リンパ性器官である脾臓におけるリンパ球亜集団のホルムアルデヒド曝露による変動を調べた。FACSによるCD3陽性T細胞の比率では、ホルムアルデヒド曝露のみの群では差はみられなかったが、抗原感作群でのホルムアルデヒド曝露では濃度依存的な低下がみられた。しかしながら、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞とCD19陽性B細胞では顕著な変動はみられなかった。また、血中でのリンパ球においても同様にCD3陽性T細胞、CD3CD4陽性T細胞、CD3CD8陽性T細胞、CD19陽性B細胞の測定をおこなったが、ホルムアルデヒドのみの曝露群と抗原感作とホルムアル

ルデヒド曝露群ともにそれぞれのコントロール群との差はみられなかった。

次にサイトカイン・ケモカインの産生への影響を抗原感作とホルムアルデヒド曝露した群の脾臓細胞を48時間培養してその上清中で調べた。In vitro 抗原刺激の誘導で今回 IL-4 では高い産生がみられなかった。IL-5 ではホルムアルデヒド曝露による産生の低下傾向がみられたが、有意な差ではなかった。IFN- γ 産生においては、ホルムアルデヒド曝露による有意な変化はみられなかった(図2)。

次にマクロファージ、樹状細胞、抗原提示細胞から主に分泌されるケモカインのうち、Th1 タイプの誘導にかかわるケモカインである MIP-1 と Th2 タイプの誘導にかかわる MCP-1 について24時間培養後の培養上清で調べた。MIP-1 では抗原刺激による差はみられなかった(図3a)が、Th2 タイプの誘導にかかわる MCP-1 の産生では、濃度依存的に上昇し400ppb と2000ppb 曝露群で有意な増加が認められた(図3b)。

4) 血中抗体価の変動

血漿中の抗原特異的な抗体価を ELISA 法によって測定した結果では、総 IgE 抗体価においてホルムアルデヒド曝露のみの群では増加傾向がみられたが、抗原感作群へのホルムアルデヒド曝露では有意な差はみられなかった。抗原特異的 IgE 抗体価では80ppb 曝露で増加傾向が(図4a)、血漿を100倍希釈して測定した抗原特異的 IgG2a 産生においては400ppb 曝露で低下傾向が(図4c)みられたが、共に有意な差は認められなかった。血漿を500倍希釈して測定した抗原特異的 IgG1 産生においては、400ppb 曝露群で有意な低下がみられたが、他の80ppb と2000ppb 曝露群では差はなかった(図4b)。

5) 脳内サイトカインと神経成長因子の変動

脳における炎症性サイトカイン等の産生への影響を調べるために、ホルモン分泌の調節機能をもつ下垂体、記憶にかかわる海馬、情報の受け取りに重要な線条体を取り出しそれぞれの領域における産生量を測定した。ホルムアルデヒドのみの曝露、あるいは抗原感作とホルムアルデヒド曝露によるそれぞれの領域での産生において、IL-6、TNF、IL-1、IL-12p40、TGF β のいずれにおいても曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。しかしながら、図5には抗原感作とホルムアルデヒド曝露したマウスのそれぞれの領域における IL-1 産生量が示してあるが、下垂体では80ppb にピークがみられ、海馬と線条体では2000ppb で最も高い産生パターンを示した。脳における神経成長因子産生への影響を調べるためにホルムアルデヒドのみの曝露(表1 exp.1) あるいは腹腔内のみの抗原感作とホルムアルデヒド曝露(表1 exp.2) したマウスの全脳組織で測定した NGF 産生の結果が、図6に示してある。ホルムアルデヒド曝露のみではコントロール群と比べて変化はみられなかった(図6a)が、

抗原感作が加わることで80ppbと400ppbの濃度で有意な増加がみられた(図6b)。次に、下垂体、海馬、線条体の組織でのNGF産生についてホルムアルデヒドのみの曝露、あるいは抗原吸入感作しホルムアルデヒド曝露したマウスで検討した。その結果、図7にみられるように抗原吸入感作しホルムアルデヒド曝露したマウスの海馬において400ppbで有意な増加が認められるパターンが観察された。下垂体と線条体では海馬と比べると低い産生量を示し曝露群とコントロール群との間に変化はみられなかった。ホルムアルデヒド曝露のみのマウスでは、下垂体や線条体と同様海馬においても差はみられなかった。NGFと同様な働きをもつBDNFの産生量についても下垂体、海馬、線条体で検討した。BDNF産生量はホルムアルデヒドのみを曝露したマウス、あるいは抗原感作とホルムアルデヒド曝露したマウスでも下垂体と線条体での産生量は非常に低く、また海馬においても曝露群と対照群とで差はみられなかった。

(5) 考察

本研究で用いた80, 400, 2000ppbの低濃度ホルムアルデヒド曝露のみでは、呼吸器、胸腺、脾臓、血液中の今回検索した免疫指標に顕著な変化はみられなかった。しかしながら、抗原の吸入感作により免疫系を活性化したアレルギー性炎症モデルマウスにホルムアルデヒド曝露を行うといくつかの指標において変動が認められた。2000ppb曝露群で抗原の吸入感作を行うことにより炎症性細胞の集積が肺胞洗浄液中でみられ、400ppbと2000ppb曝露マウスの脾臓細胞からのMCP-1産生の増加もみられた。また、IL-1の肺胞洗浄液中の低下も認められた。しかしながら、これまでに報告されたホルムアルデヒド曝露によるI型アレルギー反応の亢進作用¹⁾についてはIgE産生、Th2タイプのサイトカイン産生では認められなかった。この理由として、実験動物の系統差、ホルムアルデヒドの曝露期間、抗原感作条件などの違いが関与している可能性が考えられる。なお、炎症反応の増悪に関連するpro-inflammatoryサイトカインやケモカインの変動は脳組織では観察されなかった。

NGFは、末梢の交感神経の発生や中枢神経系のコリン作動性ニューロンの発生と維持に関して栄養因子としての役割を果たしているのみならず、中枢神経組織の損傷修復にも関与していること、また、神経、免疫、内分泌間での相互作用の調節にも関与していると考えられている。一方、BDNFも神経栄養因子としてのみならずド-パミンニューロン、コリン作動性ニューロン、海馬ニューロンなどの生存や分化の亢進に働いていることが報告されている。ホルムアルデヒド曝露のみではNGF量にほとんど影響はみられなかったが、抗原感作が加わると低濃度ホルムアルデヒド曝露での有意な増強が認められ、海馬においても同様な変化がみられた。ところが、BDNFにおいてはNGFのような増強はみられなかったため、栄養因子に共通した影響ではないと考えられる。NGFについては、最近、線維芽細胞やケラチノサイトのみならずT細胞やB細胞などのリンパ球、マクロファージ、肥満細胞、好酸球なども産生することが報告されている²⁾。

NGF は、IL-6 産生を亢進し、TNF 産生は抑制するとの報告もみられ、サイトカインの制御機構にも関与していることが示された。OVA を抗原として使用したアレルギー性喘息モデルマウスにおいて IL-4 や IL-5 産生の増加や IgE 産生の亢進と共に血清中、肺胞洗浄液中の NGF の増加が報告されている³⁾。また、NGF はサブスタンス P の産生を増強し、肥満細胞を活性化することにより炎症に関与し、さらに痛覚過敏や喘息にかかわる気道平滑筋の過敏反応にも関連があるという。しかしながら、今回の NGF 産生とくしゃみ症状を示すマウスとの正の相関はみられていない。

今後は、ホルムアルデヒド曝露による NGF 産生の亢進と脳神経領域での過敏反応との関連、くしゃみ反応とホルムアルデヒド曝露の関連、遺伝的要因と NGF 産生の増強について検索し、MCS 発症とホルムアルデヒド曝露との関連性を明らかにする予定である。

(6) 参考文献

1. Tarkowski M, Gorski P. *Int Arch Allergy Immunol* 106:422-424, 1995.
2. Stanisiz A M, Stanisiz J A. *Annals of The New York Academy of Sciences* Vol.917 pp268-272, 2000.
3. Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H. *Eur J Immunol* 28:3240-3251, 1998.

(7) Abstract

To determine the effects of formaldehyde (FA) inhalation on the neuro-immune interactions, C3H/He mice were exposed to 0 (controls), 80, 400 and 2000 ppb formaldehyde for 12 weeks. In another experiment, using a mouse model of allergic inflammation the exposure to formaldehyde was performed.

Enhancement of accumulation of proinflammatory cells in BAL fluid of formaldehyde-exposed and OVA-immunized mice was observed. Exposure to FA significantly suppressed IL-1 production in BAL fluid of mouse model. *In vitro* antigen-stimulated MCP-1 production in spleen cells of exposed mice was markedly increased. Anti-OVA IgE production in the plasma of mice exposed to formaldehyde was the same level as for controls. Although pro-inflammatory cytokine production in Hippocampus of formaldehyde-exposed and OVA-immunized mice was not affected, NGF production in Hippocampus was significantly increased. Low dose of formaldehyde inhalation may affect the neuro-immune interactions in brain and lung.