

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	181
. 研究者および研究協力者名簿	185
. 研究結果報告	187
1 . 吸入曝露装置および曝露条件	187
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覚系の 形態学的解析	192
3 . ホルムアルデヒド長期曝露が視床下部 - 下垂体 - 副腎軸に及ぼす 影響	207
4 . 脳内海馬での情報処理変化の検討	226
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 ..	252
6 . ホルムアルデヒド曝露した肥満細胞欠損(WBB6F1 - W/W ^v) マウスとその正常対照(WBB6F1 - +/+)マウスの免疫系への影響 ...	263
A . 病理組織およびリンパ球画分の変化	263
B . 炎症性反応について	271
7 . 行動毒性における研究成果	280
8 . 化学分析における成果	283

I. 研究結果の概要

平成13年度に引き続き、平成14年度には低濃度ホルムアルデヒド曝露による脳神経 - 内分泌 - 免疫軸それぞれのエンドポイントにおける過敏状態の発現の有無について明らかにするとともに、嗅球 - 海馬間での情報伝達系への影響をより深く分子レベルで解析した。

平成13, 14年度では、平成12年度とは違うエンドポイントで、あるいは、影響がみられたところはより詳細に過敏状態との関連について検索した。以下に、概要を示す。

1. 低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅覚系の形態学的解析

化学物質の低濃度長期曝露によって、嗅覚系ニューロンに与える影響を調べるため、平成12年度はホルムアルデヒド(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観察した結果、一部変性過程を示すものもあるが、全体としては軽微な影響であった。

平成13, 14年度は、嗅球ニューロンへの解析を主に、さらに大脳辺縁系における扁桃体での解析にも着手した。嗅球におけるチロシン水酸化酵素に対する抗体を用いて、嗅球系球体に存在するドーパミンニューロンへの影響について検討した。その結果、0ppb に比べて曝露群で陽性ニューロンの数が増え、さらに、嗅球外叢状層に存在する Ca^{2+} 結合タンパク質 Parvalbumin 陽性の抑制性 GABA ニューロンの数が、曝露群で増加する傾向が見いだされた。これらの結果は、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これらの免疫陽性ニューロン数が増加したものと推測される。扁桃体におけるホルムアルデヒド曝露の影響を解析した結果、扁桃体皮質核の Parvalbumin 陽性ニューロンが曝露群で多くなる傾向が認められた。扁桃体の Parvalbumin 陽性ニューロンは GABA ニューロンであるとの報告があるので、扁桃体においても、ホルムアルデヒド曝露により GABA ニューロンの活動が高まっていることが示唆される。

2. ホルムアルデヒド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の長期曝露が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) 神経細胞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解析した。

平成12年度には、視床下部における CRH 免疫陽性ニューロンの増加、下垂体における ACTH mRNA の発現の増加を報告した。

平成13, 14年度には、より詳細に明らかにするためにマウスをホルムアルデヒド曝露群(非アレルギーモデル群: A群)、アレルギー性炎症モデル群(B群)、トルエン前投与群(C群)の3群に分類した。A群では0, 80, 400, 2000 ppb の濃度で12週間ホルムアルデヒドを曝露した。B群は抗原としてOVAを曝露開始前に10 μ g/マウスの濃度で2mg alumとともに腹腔内に投与し、以降OVAを3週間ごとに腹腔内に投与した。ホルムアルデヒド曝露は、A群同様に行った。C群では、500ppmのトルエンを3日間経気道曝露後、A群同様の処理を行った。

A群のCRH-免疫陽性(ir)神経細胞数、下垂体のACTH-ir細胞出現率と数並びに下垂体のACTH-mRNAの発現量は曝露量依存的に増加した。B群対照群のCRH-ir神経細胞数、下垂体のACTH-ir細胞出現率と数、並びに下垂体のACTH-mRNAの発現量は、A群対照群のものよりそれぞれ

れ有意に増加していた。B群 80ppb ホルムアルデヒド曝露マウスの CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir ニューロンの出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量は、さらに増加し、A群の 2000ppb 曝露マウスの値と差はなかった。しかし、400ppb と 2000ppb ではこれらの値は減少した。C群の CRH-ir 神経細胞数、ACTH-ir 細胞の出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加して、A群と同様の結果であった。

平成13, 14年度のまとめとして、非アレルギーモデル群では、ホルムアルデヒドがストレスラーとして作用していることを示した。一方、アレルギー性炎症モデル群では、ホルムアルデヒド曝露により HPA 軸が障害を受けていた。このように、アレルギーによるストレスと低濃度ホルムアルデヒドによるストレスで HPA 軸が損傷を受けている可能性が考えられる。

3. 脳内海馬での情報処理変化の検討

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学習、記憶などの高度情報処理に重要な海馬において、どのような影響を受けるか検討してきた。

平成12年度には、400ppb, 2000ppb で抑制性シナプス回路の反回抑制系の減弱、2000ppb 曝露群の海馬長期増強の低下を報告した。

平成13, 14年度には、スライス標本を用いて、集合スパイク電位と集合シナプス後電位のペアパルス解析を行った。歯状回では、対照群と比較して、集合スパイク電位のペアパルス比が 5ms, 10ms, 20ms で増加したが、集合シナプス後電位のペアパルス比は変化しなかった。CA1 領域では、集合シナプス後電位のペアパルス比が 5ms, 10ms で増加していたが、集合スパイク電位のペアパルス比は、変化しなかった。海馬スライス標本 CA1 領域におけるシナプス伝達の長期増強(LTP)については、対照群に比べて、80ppb, 400ppb, 2000ppb で減弱していたが、LTP 強度とくしゃみ回数との相関はなかった。脳内シグナル伝達の検索は、2000ppb 濃度で実験を行った。海馬では CaM キナーゼ系、大脳皮質では MAP キナーゼ系が影響を受け、海馬 CA1 領域と歯状回で synapsin I が増加していた。行動試験は 2000ppb 曝露群をもちいた。活動性、探索行動の評価としてオープンフィールド試験を行い、立ち上がり回数に有意な増加がみられた。不安の指標としては、高架プラス迷路試験を行ったが、曝露群と対照群とのあいだでは差がみとめられなかった。3年間の海馬の結果は、低濃度ホルムアルデヒド曝露により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。

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

非アレルギーモデルとアレルギー性炎症モデルに低濃度ホルムアルデヒド曝露を行い、免疫反応への影響について比較検討した。

平成12年度には、アレルギー性炎症モデルでの 400 ppb 曝露による Th1 タイプのサイトカイン産生抑制、非アレルギーモデルでの 2000 ppb 曝露による脳内の炎症性サイトカイン IL-1 β の増加を報告した。

平成13, 14年度には、アレルギー性炎症モデルマウスの脳において、80 と 400 ppb ホルムアルデヒド曝露による神経成長因子である NGF の増加が認められた。また、海馬における NGF mRNA の発現の増強は低濃度ホルムアルデヒドにおいて顕著であり、蛋白レベルの結果と合致した。免疫組織化学的検索でも、海馬において NGF 陽性反応の顕著な増強が確認できた。血漿中と肺胞洗浄液では、脳内とは逆に、ホルムアルデヒド曝露による NGF の有意な低下が認められた。

次に、曝露により脳の情報伝達が恒常的に変化した場合、神経伝達物質受容体の遺伝子発現量に変化が現われると仮定し、海馬及び扁桃体の NMDA 型グルタミン酸受容体($\alpha 1$, $\alpha 2$ mRNA)、ドーパミン受容体(D1, D2, mRNA)の mRNA 発現量を半定量的 PCR 法により測定した。海馬において、ホルムアルデヒド曝露(400ppb)により $\alpha 1$ 増加と $\alpha 2$ 低下が認められ、また D1、D2 の増加傾向もみられた。扁桃体では、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、D1 の増加が認められた。海馬において $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の構成が変化したことは、記憶形成機構に変化が生じた可能性を示唆しており、また扁桃体における $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、D1 の増加は、情動機能の変化の可能性を示唆している。

3 年間のまとめとして、低濃度ホルムアルデヒド曝露のみでは蛋白の発現の変動がみられない低い濃度でも、免疫系への刺激が加わることにより脳内での分子の動きが誘導されることが明らかとなり、過敏状態に繋がる可能性が示唆された。

5 . ホルムアルデヒド曝露した肥満細胞欠損(WBB6F1-W/Wv)マウスと

その正常対照(WBB6F1-+/+)マウスの免疫系への影響

平成 12 年度の報告で、ホルムアルデヒド曝露によるくしゃみの増加が観察された。今年度に、肥満細胞が関与する機構について解明するために、肥満細胞欠損マウスとその正常対照マウスを用いて、ホルムアルデヒド曝露により誘導される炎症性反応について比較検討した。その結果、肥満細胞欠損モデルマウス W/Wv を用いたホルムアルデヒド(2000ppb)の 12 週間吸入曝露で、気道粘膜上皮細胞の著明な剥離や扁平上皮化成、腫瘍変化等を認めなかった。一方これまでに使用した C3H/HeN や C57BL/6N マウスより OVA 前感作による気道粘膜変化や炎症性細胞の浸潤が強く観察され、感受性がより高いと思われた。なお、+/+マウスでは、ホルムアルデヒド曝露群で気管上皮内の肥満細胞が増加する傾向がみられた。肥満細胞欠損マウスにみられた皮膚の慢性炎症病変は、ホルムアルデヒドの吸入曝露による反応というよりはむしろ脱毛を基盤とした皮膚刺激・掻痒の増強によるものと考えられた。またフローサイトメーターを用いてリンパ球分画について検討した結果、変化はなかった。肺胞洗浄液中への炎症性細胞の集積においては、W/Wv マウスと+/+マウスでホルムアルデヒド曝露による違いが認められた。神経成長因子である NGF や炎症誘導の神経ペプチドであるサブスタンス P については、ホルムアルデヒド曝露による変動は認められなかった。

6 . 行動毒性における研究成果

平成 12 年度の報告では、ホルムアルデヒド低濃度経気道曝露によりマウスにくしゃみが誘発されることを確認した。

平成 13 , 14 年度は、C3H/HeN マウスにおいてトルエンを前曝露した群および OVA 感作した群、さらに肥満細胞欠損モデルマウスについてホルムアルデヒド 3 ヶ月曝露終了時におけるくしゃみを検索した。その結果、C3H/HeN マウスにおいてはこれまでの結果同様にホルムアルデヒドの曝露濃度依存的にくしゃみの増加が観察された。また、トルエン前曝露の影響は認められなかったが、OVA を感作することにより有意にくしゃみの頻度が増加し、80ppb においても有意なくしゃみの増加が認められた。一方、肥満細胞欠損モデルマウスにおいては、有意なくしゃみの増加は認められなかった。このことは、観察されたくしゃみに肥満細胞が関与していないことが示唆された。

7. 化学分析における成果

今年度新たに用いた肥満細胞欠損モデルマウス W/W^vにおいて強度の皮膚病変を呈したため、マウスの飲料水などにホルムアルデヒド以外の揮発性有機溶剤 VOCs などの混入を含め水質に異常がないか検討した。その結果、測定したクロロホルムは日本の環境基準の約 1/10、トリクロロエチレンは検出限界以下と低値であった。マウスの飲料水中の残留塩素濃度は、水道法の水質基準を満たしており、かつ北九州市水道局水質検査結果と同程度であった。また、以前から試みているバイオマーカーの検索としてホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体の測定法の改良や、今年度は新たに酸化ストレスの代表的マーカーである尿中 8-OHdG(8-ヒドロキシデオキシグアノシン)の ELISA 法による測定を試みた。しかし、2000ppb までの濃度では、これらに曝露の影響を認められなかった。

以上、平成 13, 14 年度でのまとめとして、低濃度ホルムアルデヒドのマウスへの長期曝露により嗅覚系におけるニューロンの活動の増強、視床下部 下垂体でのホルモン産生の障害、脳内海馬におけるシナプス伝達の異常、アレルギー性炎症モデルでの NGF の変動が新たな科学的知見として明らかとなった。これら反応の相互の関連性について解明することと、これらの反応がアレルギー性の過敏状態とどのように異なるのか、これらの反応はホルムアルデヒド特異的な反応か否かについては、更なる検討が必要と考えられる。

II. 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

櫻田 尚樹	産業医科大学産業保健学部
保利 一	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覚系の形態学的解析

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)東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所

3. ホルムアルデヒド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
トウイ・クスマ・サカ	大阪府立大学大学院
桑原 佐知	大阪府立大学大学院
塚本 康浩	大阪府立大学大学院
櫻田 尚樹	産業医科大学産業保健学部

4. 脳内海馬での情報処理変化の検討

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	東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野
栗生 修司	九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報
新井 潤	九州工業大学大学院生命体工学研究科
緒方 元気	九州工業大学大学院生命体工学研究科
野村 和美	熊本大学大学院医学研究科
名倉 陽子	東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野

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

掛山 正心 独立行政法人国立環境研究所

櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

6 .ホルムアルデヒド曝露した肥満細胞欠損(WBB6F1-W/Wv)マウスとその正常対照(WBB6F1-+/+)

マウスの免疫系への影響

A. 病理組織およびリンパ球画分の変化

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

B. 炎症性反応について

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

櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

7 .行動毒性における研究成果

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

8 .化学分析における成果

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