

### 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

研究者：佐々木文彦（大阪府立大学大学院）

研究協力者：トウイ・ケマ・リサ（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）

樺田 尚樹（産業医科大学）

#### （1）研究要旨

本態性多種化学物質過敏状態(Multiple Chemical Sensitivity: MCS)の研究の内、今回の課題である低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露は日本はもとより世界的にも問題視されているシックハウス症候群の解明にも結びつく研究である。したがって、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免疫組織学的方法、計量計測学的方法、半定量的 RT-PCR 法とラジオイムノアッセイにより解析した。又、シックハウス症候群に罹患した患者の多くは、アレルギーを発症している事から卵白アルブミン(OVA)を前処置して作成したアレルギー発症モデルを用いた。更に、アレルギーを発症しないトルエンを前処置したマウスを用いて、OVA 前処置で発症したアレルギーの意義を解析した。

マウスをホルムアルデヒド曝露群(A 群)、アレルギー発症モデル群(B 群)とトルエン投与群(C 群)の 3 群に分類した。A 群では 80ppb、400ppb、2000ppb の濃度で 12 週間ホルムアルデヒドを曝露し、曝露しないマウスを対照に用いた。B 群は抗原として OVA を曝露開始前に 10 µg/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有意的に増加していた。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、ホルマリン曝露量依存的に増加していた。

A 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、B 群では高濃度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、シックハウス症候群とは、アレルギーとホルムアルデヒドの 2 つのストレスの相乗作用で HPA 軸が損傷を受け、更なるストレス（腹痛、頭痛など）を処理

できない状態になっていると考えられる。

アレルギー発症モデル B 群とトルエン前処理した C 群の結果から、アレルギー性炎症は、ホルムアルデヒド曝露に対する HPA 軸の反応に悪影響を与えるが、アレルギー炎症を発現しないトルエン前処置ではなんらの影響も与えていないと考えられる。

このような 3 年間の結果を総合して、MSC 研究の代表であるシックハウス症候群発症の機構を解明した。

## ( 2 ) 研究目的

最近、環境中に存在する多種類の微量な化学物質が人体に種々の疾病を引き起こす本態性多種化学物質過敏状態(Multiple Chemical sensitivity: MCS)の研究が重要視されている<sup>1, 2)</sup>。MCS の中でも低濃度ホルムアルデヒドにより惹起されるシックハウス症候群については社会問題として取り上げられている。家屋内で発生するホルムアルデヒドの曝露とシックハウス症候群罹患との関係が研究され<sup>3, 4)</sup>、特に、低レベルのホルムアルデヒド曝露とヒト<sup>5)</sup>、ラット<sup>6)</sup>やマウス<sup>7)</sup>の呼吸器の疾病との関係が研究された。視床下部 - 下垂体 - 副腎(HPA)軸はあらゆるストレスに対応し、ホルムアルデヒドの様な化学薬品曝露に際してもそのストレスを解消する<sup>8-10)</sup>。しかしながら、低濃度のホルムアルデヒド曝露が HPA 軸にいかなる効果を及ぼすかについては報告がないのが現状である。したがって、本研究の第一の目的は低濃度ホルムアルデヒド曝露が HPA 軸に如何なる影響をもたらすかを免疫組織学的方法、計量学的方法、半定量的 RT-PCR 法と RIA 法を用いて解明することである。又、シックハウス症候群に罹患する患者の多くは、アレルギーを発症している事から、卵白アルブミンを前処理したアレルギー発症マウスの HPA 軸が低濃度ホルムアルデヒドの曝露でどのようになるかを検討する事が第二の目的である。更に、第三の目的は、アレルギーを発症しないトルエンを前処置したマウスの HPA 軸が低濃度ホルムアルデヒド曝露でどのように反応するかを検討する事により卵白アルブミン処理で発症したアレルギーの意義を解析する事である。このような 3 年間の実験を総合して、MSC の代表の一つであるシックハウス症候群の発症の機構を解明することが本研究の主目的である。

## ( 3 ) 研究方法

### 1 ) 動物

日本エスエルシー株式会社より 8 週齢の成熟メスマウス ( C3H/He ) を購入し、2 週間の馴化後実験に使用した。マウスをホルムアルデヒド曝露群(A 群)、アレルギー発症モデル群(B 群)とトルエン投与群(C 群)の 3 群に分類した。さらに、A 群では 80ppb、400ppb、2000ppb の濃度で 1 2 週間ホルムアルデヒドを曝露し、曝露しないマウスを対照に用い、それぞれ A-80、A-400、A-2000 と A-0 群とした。B 群では抗原として卵白アルブミン(OVA)をホルムアルデヒド曝露開始前に 10  $\mu$ 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 群同様に行い、B-80、B-400、B-2000 と B-0 群

とした。C 群では、500ppm のトルエンを経気道曝露後、ホルムアルデヒド曝露は、A 群同様に行い、C-80、C-400、C-2000 と C-0 群とした。合計 30 群の内それぞれの群は、10 匹づつのマウスから成り、5 匹は形態学的観察に、他の 5 匹は下垂体の ACTH-mRNA 発現の観察に使用した。体重測定後、視床下部、下垂体、副腎を採取した。副腎は、ブアンの液で固定し、全ての試料採取後重量を測定し、絶対重量と相対重量(副腎絶対重量/体重)で示した。

## 2) 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロンの解析

視床下部をブアンの液で固定し、アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋した。光学顕微鏡用のミクロトームで 10 $\mu$ m の連続切片とし、ガラススライドに塗付した。切片をキシレンで脱パラフィンし、ヒト CRH 抗体(希釈倍率: 1:1,000)を用いて免疫染色(ABC 法)し、核はヘマトキシリンで対比染色した。二次抗体としては、ビオチン標識抗ウサギ IgG (Vector Laboratories, Inc., USA) を用い、ジアミノベンチジン(Zymed Laboratories, Inc., USA)で発色させた。結果を光学顕微鏡で観察した。室旁核を含む切片を 4 枚ごとに選択し、CRH-ir 細胞数を数えた。数えた切片の数は各群 7 ~ 8 枚である。室旁核中の CRH-ir ニューロン数(T) は、下記の公式に代入して求めた。T = n/i  $\times$   $\Sigma$ Ni (n: それぞれの動物の室旁核を含む全切片数; i: 選択した切片数)。

## 3) 下垂体前葉の ACTH 細胞の解析

### 免疫組織化学による解析

下垂体を 10%ホルマリンで固定し、アルコール系列で脱水後、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックを 10 $\mu$ m の連続切片とし、キシレンで脱パラフィン後、ヒト ACTH 抗体(希釈倍率: 1: 1,000)にて ABC 法を用いて免疫染色し、核をヘマトキシリンで染色し、光学顕微鏡で観察した。二次元画像解析装置 Cosmozone-1SB を用いて ACTH-ir 陽性細胞を計測した。パソコン画面上に 1 辺が 40 $\mu$ m の正方形を描き、倍率 400 倍の顕微鏡像を投影し、画面上に存在する核を持つ免疫陽性細胞と全核数を数えた。ただし、正方形内に存在する免疫陽性細胞と核並びに上辺と左辺にまたがるものは数えるが、下辺と右辺にまたがるものは除外した。このようにして、ACTH 免疫陽性細胞の出現率と数は、下記の公式に代入して求めた。

ACTH-ir 細胞の出現率(%) = (免疫陽性細胞数  $\div$  全核数)  $\times$  100。

下垂体前葉実質細胞の絶対数(T) =  $N^{3/2} \times V/40^3$  (N: 40<sup>2</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>中に存在する平均の核数; V: 下垂体の体積)。

### 下垂体の半定量的 RT-PCR による ACTH-mRNA の発現量の測定

下垂体を採取後直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで -70 $^{\circ}$ C の冷凍庫中で保存した。組織を TORISOL(Life Technologies, Inc., USA)中でホモジナイズし、total RNA を抽出した。2 $\mu$ g の total RNA、オリゴ dT プライマーおよび逆転写酵素を用いて cDNA を鋳型 DNA として、マウス ACTH に対するプライマーを使い、PCR により増幅させた。PCR 産物は、アガロースゲルで電気泳動し、得られたそれぞれの

バンドについてその強度を比較することにより、ACTH-mRNA の発現の測定を行った。なお、得られた PCR 産物は、DNA シークエンスにより ACTH であることを確認している。

#### 4 ) Corticosterone の測定

Corticosterone の測定は、解剖時に採取した血清を - 80 で保存後、ICN ImmuChem Double Antibody Corticosterone 1251 RIA Kit for Rats and Mice を使用して、R I A により測定した。

#### ( 4 ) 研究結果

##### 1 ) A 群 ( OVA - )

体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 1 に示した。体重、副腎重量、下垂体前葉体積は、曝露群と対照群で差がなかった。

視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

CRH-ir ニューロン数は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた(Figs. 1, 2)。

ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率(Fig. 3)、数(Fig. 4)は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた。

半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

ACTH-mRNA の発現量ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた(Fig. 5)。

血中の corticosterone 濃度

対照群のコルチコステロン濃度に比べて、80ppb と 400ppb のもので有意に増加していた(Fig. 6)。

##### 2 ) B 群 ( OVA + )

体重、副腎重量、下垂体前葉体積

80ppb ホルムアルデヒド曝露群の体重は対照群のものより減少し、副腎の相対重量は増加していた。400ppb と 2000ppb の体重と副腎重量は対照群のものと差はなかった。下垂体前葉の体積は、曝露群と対照群で差がなかった(Table 2)。

視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

B 群の対照群マウスの CRH-ir ニューロン数は、A 群マウス対照群のものより有意に増加していた。80ppb 曝露マウスの CRH-ir ニューロン数は、さらに増加し、A 群の 2000ppb 曝露マウスの値と差はない。400ppb と 2000ppb では減少した(Figs. 7, 8)。

ACTH-ir 細胞の出現率、数

B 群の対照群マウスの ACTH-ir ニューロンの出現率(Fig. 9)と数(Fig. 10)は、A 群マウス対照群のものより有意に増加していた。80ppb 曝露マウスの ACTH-ir ニューロン数は、さらに増加し、A 群の 2000ppb 曝露マウスの値と差はない。400ppb と 2000ppb では減少した。

### 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

B 群の対照群マウスの ACTH-mRNA の発現量は、A 群マウス対照群のものより有意に増加していた。80ppb 曝露マウスの 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い。400ppb と 2000ppb では減少した(Fig. 5)。

### 血中の corticosterone 濃度

本群の他対照群のコルチコステロン濃度と比較して全曝露群で有意の差は無かった(Fig. 11)。

### 3) C 群 (OVA - 、トルエン + )

#### 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 3 に示した。体重と下垂体前葉体積は、曝露群と対照群で差がなかった。80ppb と 2000ppb 曝露群の副腎重量は、対照群のものより小さく、相対重量では、80ppb 曝露群のものが対照群のものより小さかった。

#### 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

CRH-ir ニューロン数は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加し、特に 2000ppb 曝露群のものが対照群のものより有意的に増加していた(Figs. 12, 13)。

#### ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率(Fig. 14)は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していたが、数(Fig. 15)では差が見られなかった。

### 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

ACTH-mRNA の発現量ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた(Fig. 16)。

### 血中の corticosterone 濃度

本群の他対照群のコルチコステロン濃度と比較して全曝露群で有意の差は無かった(Fig. 17)。

### ( 5 ) 考察

A 群では、低濃度の長期ホルムアルデヒド曝露により視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir 細胞の出現率と数、下垂体内 ACTH-mRNA 発現量は曝露量依存的に増加し、ホルムアルデヒドがストレスとして作用していることを示した。ACTH-ir 細胞の出現率は、短期間の cold ストレスにより増加する<sup>11)</sup>。一方、B 群の視床下部 CRH 神経細胞と下垂体の ACTH 細胞は A 群のものと異なる反応を示した。すなわち、B 群の CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir 細胞の出現率と数、下垂体内 ACTH-mRNA の発現量はホルムアルデヒド曝露がなくても増加し、80ppbFA 曝露で最高の増加を示した。このように、アレルギーは、ストレスとして HPA 軸に働き、ホルムアルデヒドはアレルギーの感受性を高めたと考えられた。また、B 群での高濃度(2000ppb)ホルムアルデヒド曝露では 80ppb 曝露マウスに比べて、CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir 細胞の出現率と数、下垂体内 ACTH-mRNA の発現量は減少している。すなわち、B 群では高濃度ホルムアルデヒド曝露により HPA 軸が障害を受け、ストレスに対応できなくなっていて、更なるストレス(腹痛、頭痛

など)を処理できない状態になっていると考えられる。すなわち、MSCの一つであるシックハウス症候群とは、アレルギーとホルムアルデヒドの2つのストレスが相乗的に作用して、HPA軸が損傷を受け、更なるストレス(腹痛、頭痛など)に対応できなくなった状態と考えられる。

トルエン前処理したC群のHPA軸の結果は、A群の結果と似ている。即ち、卵白アルブミン前処置により発症したアレルギー性炎症は、ホルムアルデヒド曝露に対するHPA軸の反応に影響を与えるが、アレルギー炎症を発現しないトルエン前処置では影響を与えていないと考えられる。

#### (6) 参考文献

1. Sorg, BA, Willis, JR, Nowatka, TC, Ulibarri, C, See, RE, Westberg, HH. Proposed animal neurosensitization model for multiple chemical sensitivity in studies with formalin. *Toxicology* 111:135-145, 1996.
2. Sorg, BA, Bailie, TM, Tschirgi, ML, Li, Na, Wu, W-R. Exposure to repeated low-level formaldehyde in rats increases basal corticosterone levels and enhances the corticosterone response to subsequent formaldehyde. *Brain Res* 898:2001, 314-320.
3. Olsen, JH, Dossing, M. Formaldehyde induced symptoms in day care centers. *Am Ind Hyg Assoc J* 43:366-370, 1982.
4. Main, DM, Hogan, TJ. Health effects of low-level exposure to formaldehyde. *J Occup Med* 25:896-900, 1983.
5. Thrasher, JD, Broughton, A, Madison, R. Immuno activation and autoantibodies in humans with long-term inhalation exposure to formaldehyde. *Arch Environ Health* 45:217-223, 1990.
6. Sorg, BA, Bailie, TM, Tschirgi, ML, Li, N, Wu, W-R. Exposure to repeated low-level formaldehyde in rats increases basal corticosterone levels and enhances the corticosterone response to subsequent formaldehyde. *Brain Res* 898:314-320, 2001.
7. Kerns, WD, Pavkov, K, Donofrio, DJ, Gralla, EJ, Swenberg, JA. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res* 43:4382-4392, 1983.
8. Menzaghi, F, Heinrichs, SC, Pish, EM, Weiss, F, Koob, GF. The role of limbic and hypothalamic corticotrophin-releasing factor in behavioral responses to stress. *Ann NY Acad Sci* 697:142-154, 1993.
9. Whitnall, MH. Regulation of the hypothalamic corticotrophin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40:573-629, 1993.
10. Seasholtz, A. Regulation of adrenocorticotrophic hormone secretion: lessons from mice deficient in corticotrophin-releasing hormone. *J Clin Invest* 105:1187-1189, 2000.
11. Sasaki, F, Wu, P, Rougeau, D, Unabia, G, Childs, GV. Cytochemical studies

of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environmental stress. *Endocrinology* 127:285-297, 1990.

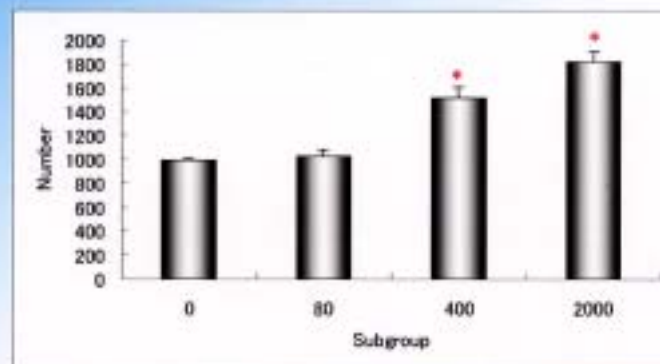
( 7 ) **Abstract**

Effect of long term exposure to low concentrations of formaldehyde on the hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis in mice

We study the effect of low-level formaldehyde inhalation on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult female C3H/He mice, using immunocytochemical, morphometric, RT-PCR and RIA methods. The mice were divided into three large groups (non allergy group (A group), allergy group (B group) and toluene-treated group (C group)), and each group was subdivided into 0, 80, 4000 and 2000 subgroups that were exposed to 0, 80, 400 and 2000 ppb formaldehyde. B group mice were injected intraperitoneally with 10  $\mu$ g OVA and 2 mg alum per mouse immediately before the inhalation of formaldehyde and were sensitized with aerosolized OVA at 3-week intervals for 3 months. C group mice were inhaled by 500ppm toluene before the inhalation of formaldehyde. The number of corticotrophin releasing hormone (CRH)-immunoreactive (ir) neurons and adrenocorticotrophin (ACTH)-ir-cells, and ACTH-mRNA expression of A group mice, were all up-regulated in a manner depending on the dose of formaldehyde. Results for B group mice differed significantly from those of A group mice. The number of CRH-ir neurons and ACTH-ir cells, and ACTH-mRNA expression of unexposed B group mice, were all significantly higher than in the unexposed A group mice. The number of CRH-ir neurons and ACTH-ir cells, and ACTH-mRNA expression in the 80 subgroup, were all greater than in other subgroups of B group mice. The number of CRH-ir neurons, percentage of ACTH-ir cells and ACTH-mRNA expression of C group mice were approximately up-regulated in a manner depending on the dose of formaldehyde. We suggest that the formaldehyde causes stress to CRH neurons and ACTH cells, and the corresponding allergic condition contributes to sensitization to chemical exposure. Mechanisms for the effects of sick building syndrome (SBS), which is a form of MCS, are discussed.

Subgroup	BW (g)	AW (mg)	AW/BW ( $\times 10^{-4}$ )	VPG ( $\times 10^7$ )
0	27.62 $\pm$ 0.44	5.57 $\pm$ 0.16	2.02 $\pm$ 0.07	75.206 $\pm$ 2.862
80	28.97 $\pm$ 0.59	5.28 $\pm$ 0.47	1.83 $\pm$ 0.16	78.242 $\pm$ 2.148
400	28.24 $\pm$ 0.34	5.23 $\pm$ 0.17	1.85 $\pm$ 0.05	80.521 $\pm$ 2.308
2000	28.50 $\pm$ 0.67	4.91 $\pm$ 0.31	1.74 $\pm$ 0.12	79.878 $\pm$ 3.359

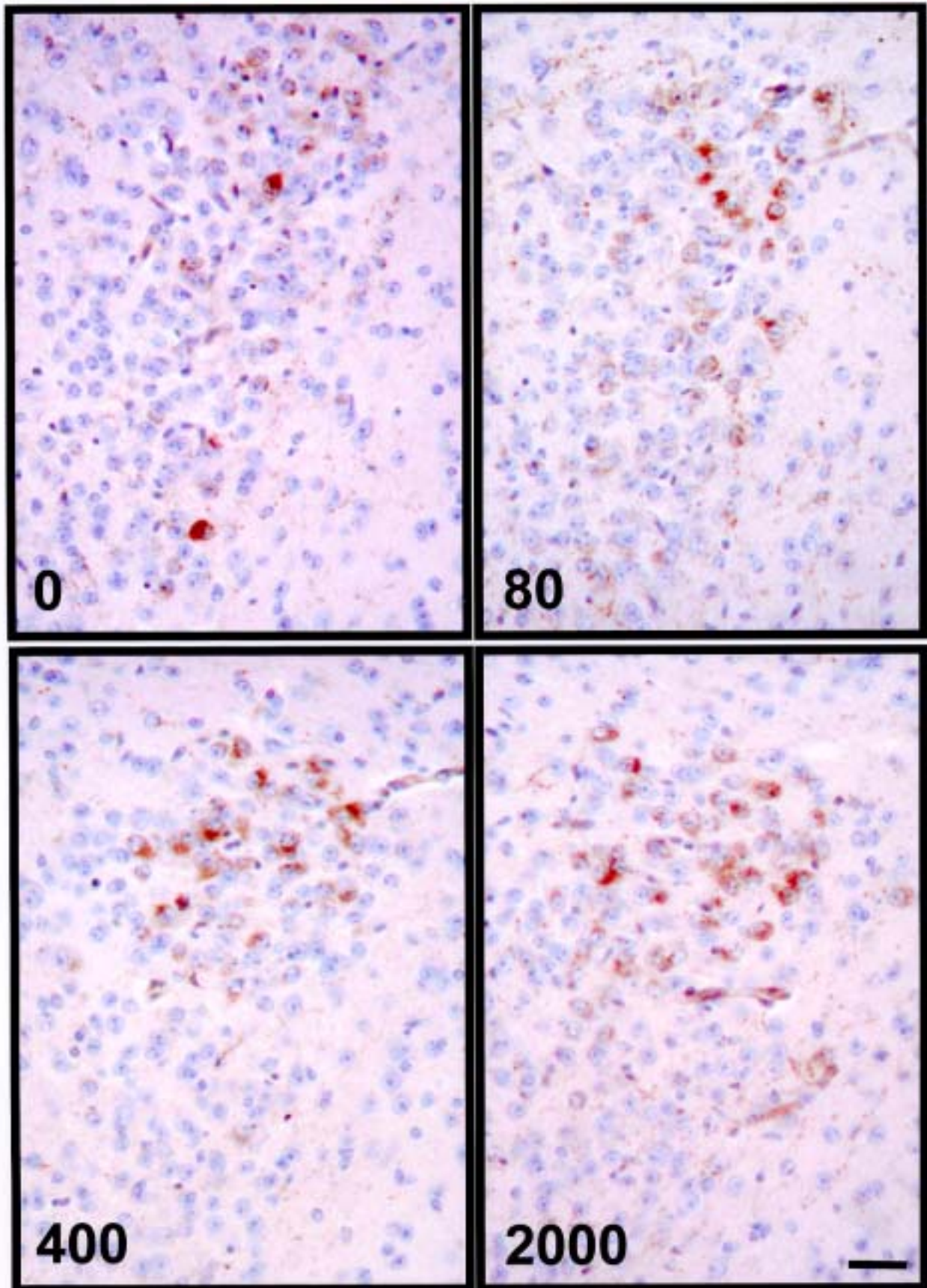
**Table 1.** Body weight (g), absolute (mg) and relative weight (adrenal weight/body weight) of the adrenal gland, and volume of pituitary gland of A group mice. BW: body weight, AW: adrenal weight, VPG: volume of anterior pituitary gland



**Fig. 1.** The number of CRH-ir neurons in the PVN areas of hypothalamus of A group mice. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$  vs. 0 subgroup (control). The number of mice in each subgroup is 5.



**Fig. 2.**



**Fig. 2.** The CRH-ir neurons in the PVN of A group mice. (0) 0 ppb formaldehyde; (80) 80 ppb formaldehyde; (400) 400 ppb formaldehyde; (2000) 2000 ppb formaldehyde. The CRH-ir neurons were up-regulated according to the quantity of formaldehyde inhaled. Bar = 50  $\mu$ m.