

I. 研究結果の概要

平成 15 年度は、これまでの 3 年間の研究で得られた動物モデルでのホルムアルデヒド曝露による過敏状態の誘導を支持する指標のより詳細な検討を行うとともに、化学物質の特異性との関連、およびその過敏状態とアレルギー反応との相違について検索した。以下に、概要を示す。

1. 吸入曝露装置

ホルムアルデヒド吸入曝露装置は昨年度までの実験に使用したものと同様である。装置はホルムアルデヒドガス発生装置と、曝露チャンバーとから構成されている。また、トルエン吸入曝露装置は、トルエン蒸気発生装置と曝露チャンバー A、B の 2 基とから構成されている。

2. 行動毒性における影響

低濃度ホルムアルデヒド曝露によりくしゃみの増加がこれまでに観察されたが、今回の 50 ppm トルエン濃度ではくしゃみの誘発はみられなかった。トルエンの曝露指標として、尿中代謝産物である馬尿酸を測定した結果、曝露直後には高いレベルを示したが、翌日の曝露直前には正常レベルに戻っていた。

3. 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る嗅覚系ニューロンに与える影響を調べるため、これまでに明らかになった嗅球ニューロンへの解析を追試し、さらに嗅覚系大脳辺縁系における解析をおこなった。このために、ホルムアルデヒドに 3 ヶ月間連続的に曝露したマウスの嗅球および大脳辺縁系を形態学的に解析した。また、さらにアレルギーモデルに対する影響をも比較検討した。嗅球の解析では、嗅球糸球体に存在するドーパミンニューロンを観察した結果、0ppb (対照) 群に比べて曝露群で陽性ニューロンの数が増えることが確かめられた。嗅球におけるドーパミンニューロンの機能は明らかでないが、GABA と共存することから抑制性ニューロンとして、刺激依存的に増加し嗅覚情報を調節していると考えられる。また、アレルギーモデルとして作成した卵白アルブミン投与マウス群では、有意の差は認められなかった。大脳辺縁系の解析では、扁桃体におけるホルムアルデヒド曝露の影響を調べるため、Ca²⁺結合タンパク質の Parvalbumin と Calbindin の発現を免疫細胞化学的に解析した。その結果、扁桃体皮質核では、Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンが曝露群で多くなる傾向が認められた。扁桃体におけるこれらの陽性ニューロンは GABA と共存する抑制性ニューロンであるとの報告があり、扁桃体においても、ホルムアルデヒド曝露により抑制性ニューロンの活動が高まっていることが示唆される。また、アレルギーモデルマウスで、Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンが多くなる傾向を示した。

以上、嗅球のドーパミンニューロンおよび大脳辺縁系の扁桃体 Ca²⁺結合タンパク質陽性ニ

ニューロンが曝露群で増加している結果を得た。これらのニューロンは抑制性の機能を有する。持続的に刺激が嗅覚系に入力するため、これを抑制する必要から、抑制性ニューロンの活動が高まり、この結果、共存するドーパミンや Ca^{2+} 結合タンパク質の発現も増加し、この免疫染色陽性ニューロン数も増加したものと思われる。

4. 脳内海馬での情報処理変化の検討

これまで、2000ppb ホルムアルデヒド濃度においては、海馬での形態学的に顕著な変化は認められなかったが、神経細胞内リン酸化酵素活性の変化というシグナルトランスダクションの変化、海馬神経細胞シナプスの可塑性の変化、GABA 抑制系の減弱を報告してきた。

今年度は、MCS と診断された患者にアレルギー性疾患の既往が多いという疫学的報告があることから、ホルムアルデヒド曝露による海馬における長期増強 (long-term potentiation, LTP) の変化と生物学的因子 (アレルゲン投与) による影響との異動について解明することが課題となった。アレルギーモデルとして一般的な卵白アルブミン感作モデルマウスを用いた。Input/Output 曲線と LTP を群間で比較した結果、400ppb 濃度のホルムアルデヒド曝露と卵白アルブミン感作の単独および重複付加いづれも Input/Output 曲線および LTP 増強度に影響しなかった。次に、MCS 患者による中枢神経関連の愁訴のなかに不安が報告されている。2000ppb ホルムアルデヒドを 1 2 週間曝露した雌 C3H/HeN マウスを用いての行動試験として、活動性・探索行動を評価するオープンフィールド試験、加えて不安行動を評価する高架プラス迷路試験、空間学習を評価するラッシュリー迷路試験、回避学習を評価する受動的回避学習試験、侵害受容 (痛覚) を評価するホットプレート試験の 5 試験を行った。その結果、マウスへの慢性ホルムアルデヒド曝露は、不安を増強し、回避学習を促進するが、一般活動性、空間学習機能、侵害受容には影響しないことが示唆された。

5. その他の影響

トルエン曝露およびアレルギーモデルとしての OVA 感作マウスの気道系を中心とした病理学的検索を実施した。その結果、鼻腔呼吸上皮において OVA 感作群では好酸球の浸潤を認めたが、トルエン曝露の影響は観察されなかった。また、粘液産生細胞である杯細胞の出現頻度ではトルエン単独群、OVA 感作群で増加がみられた。気管・肺の組織においては、OVA 感作により杯細胞の増生、肥満細胞の上皮内への浸潤を認めたが、トルエン曝露による修飾作用は観察されなかった。以上、今回曝露に用いたトルエン濃度では、顕著な炎症像は認められなかった。

6. トルエン長期曝露による視床下部—下垂体—副腎軸の変化

これまでに、低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露およびアレルギー反応はともにストレスアースとして視床下部—下垂体—副腎軸に影響を及ぼすことを明らかにした。このような影響がホルムアルデヒド特異的に誘導されるのか否かを検討するために、MCS 発症に関与すると考えられている低濃度トルエン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)神経細胞と下垂体の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化学法、計量計測法と RT-PCR 法により解析した。マウスは、非アレルギー(NAG)群と卵白アルブミン感作したアレルギーモデル (AG) 群からなる。それぞれの群は、3ヶ月間 0ppm (清浄空気) の対照群と 50ppm のトルエン曝露群に分かれる。室旁核の CRH-免疫陽性(-ir)神経細胞数は、非アレルギー群の比較では対照群に比べトルエン曝露群で増加していた。非アレルギーの対照群に比べアレルギーモデルのトルエン曝露群でも増加していた。下垂体前葉の ACTH-ir 細胞数は、非アレルギー群では対照群に比べトルエン曝露群で増加していた。また、非アレルギーの対照群に比べアレルギーモデルのトルエン曝露群でも増加していた。下垂体前葉の ACTH-mRNA 発現量は、非アレルギー群では対照群に比べトルエン曝露群で増加がみられた。アレルギー群でも対照群に比べトルエン曝露群で増加していた。

このように、低濃度のトルエンとアレルギー感作は、共にストレスラーとして視床下部—下垂体—副腎軸に影響を与えると考えられるが、低濃度のホルムアルデヒド曝露でみられたアレルギー感作との相乗的な作用はみられなかった。

7. 低濃度長期ホルムアルデヒド及びトルエン曝露の免疫系及び記憶機構への免疫—神経軸を介した影響についての検討

MCSとアレルギー反応との関連について明らかにするために、これまで低濃度長期ホルムアルデヒド曝露によりみられるマウス免疫系での反応と卵白アルブミン抗原の感作によりマウスで誘導されるアレルギー反応との差異について検討した。昨年度、抗原を吸入感作したマウスの脳において、炎症性のサイトカインレベルでは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顕著な増加を認めた。ホルムアルデヒド曝露と抗原感作との相加・相乗的な反応と考えられた。今年度は、低濃度トルエン曝露を行いこれまでのホルムアルデヒド曝露の結果と比較し、免疫関連の指標について化学物質の特異性の有無を検討した。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トルエン曝露した結果、肺における炎症性細胞数に増加はみられたが、NGF産生に関連する変動は見られなかった。次に、学習・記憶に関与する海馬機能についてホルムアルデヒドとトルエン曝露による神経伝達物質受容体の遺伝子発現量を比較検討した。その結果、低濃度ホルムアルデヒド曝露により海馬の神経伝達物質受容体mRNAの発現が大きく変動することが確認された。トルエン曝露の影響とOVA刺激による変動について調べた結果、トルエン曝露により誘導されたドーパミンD1受容体mRNAの発現量はホルムアルデヒド曝露よりも大きな変化が見られたが、他のD2受容体、NMDA型グルタミン酸受容体 ϵ 1及び ϵ 2サブユニットの発現量ではトルエン曝露の影響がみられなかった。

これらの結果から、ホルムアルデヒドとトルエン曝露により記憶形成機構に変化が生じたことを示しており、その異なる作用の可能性が示唆された。

以上、平成15年度のまとめとして、低濃度ホルムアルデヒド曝露による脳神経—免疫軸への作用は、病理学的変化のみられない濃度のトルエンを曝露したときにみられる作用とは異

なる可能性が示唆された。また、アレルギーモデルにおける嗅覚、大脳辺縁系の変動はわずかではあるが、低濃度化学物質曝露とアレルギー状態の共存とにより、より脳神経—免疫軸への作用を増強させることも示された。今後は、アレルギー状態の併用効果に見られる機構の解明、化学物質特異性に係わる遺伝的な素因の検討、低濃度複合化学物質曝露による影響解明により低濃度化学物質による真の過敏状態誘導の有無を明らかにすることが可能と考える。