

4. 脳内海馬での情報処理変化の検討

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）

黒河佳香（独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域）

担当：海馬のLTP増強度の解析

吉田安宏（産業医科大学医学部 免疫学）

担当：サイトカイン発現量の検討

栗生修司（九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報）

担当：行動変化を検索

研究補助者

竹田勝一（九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報）

（1）研究要旨

FA2000ppb 濃度においては、海馬の形態学的顕著な変化は認められないのだが、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、本態性多種化学物質過敏状態(以下 MCS)と診断された患者にアレルギー症の既往が多いという疫学的研究報告があることから、ホルムアルデヒド(FA)曝露による長期増強(long-term potentiation, LTP)増強度変化に対する生物学的因子（アレルゲン投与）の影響について検討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(ovalbumin, 以下 OVA)感作モデルマウスを用いた。雌性 C3H/HeN マウス(10 週令)を、対照群、拘束のみの群、OVA 感作群、ホルムアルデヒド(以下 FA, 400ppb)曝露群、FA 曝露+OVA 感作群の 5 群に分け、12 週間の繰り返し負荷を与えた。性周期が LTP 増強度を修飾する可能性を排除するために、今年度は発情前期のマウスからの結果を各群から除外した。Input/Output 曲線と LTP を 5 群間で比較した結果、400ppb 濃度の FA 曝露と OVA 感作の単独および重複付加いずれも Input/Output 曲線および LTP 増強度に影響しなかった。また LTP の増強度と炎症性サイトカインの発現 profile を比較検討することを目的として、海馬内の炎症性サイトカイン、IL-1 β 、IL-6、IL-4 の mRNA の発現変動を解析した。OVA 感作群の対照として拘束のみを与えた群および負荷群では IL-6 の発現量増加が認められたが、対照群では増加が認められない例があった。また、IL-1 β 、IL-4 に関しては顕著な発現の誘導はどの群においても認められなかった。今回の結果からは、LTP の増強度に対するアレルギーの関与は明らかではなく、FA を曝露されたマウス海馬において MCS の仮説のひとつと考えられているキンドリング現象^注は認められなかった。

注：キンドリングとは、初めは何の変化も起こさないような弱い電気刺激を毎日1回繰り返し与えることによってほぼ3週間で同レベルの刺激でてんかん発作を起こすという現象をいう。キンドリング現象は化学物質の反復投与によっても起こるので、時間依存的な感受性の亢進を説明する仮説として考えられている。）

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。FA 濃度 2000ppb で 12 週間曝露した雌性 C3H/HeN マウスを用いて、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 試験をおこなった。マウスへの慢性 FA 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。昨年度までに、FA 曝露によって海馬での興奮・抑制系や細胞内シグナルトランスダクション関連酵素蛋白量の変動を報告してきたが、海馬以外の脳内の色々な部位でもそれぞれのレベルで健康な情報処理が攪乱されていることが予測された。また海馬での影響指標どうしの関連性を調べる実験の必要性も示唆された。

（２）研究目的

平成 15 年度の課題は、『低濃度ホルムアルデヒド曝露による海馬シナプスにおける LTP 低下に生物学的因子たとえばアレルゲン投与などが影響するかどうかを解明するために、アレルギーモデルマウス海馬の LTP について検討する』であった。MCS 患者にアレルギー既往が多いという疫学研究報告がある。われわれは、海馬のシナプス伝達効率に対して、FA への反復曝露が影響を及ぼすか、さらに、影響が存在すると仮定して、その影響の発現に免疫学的メカニズムがどの程度関わるのかを知るために、FA 負荷と免疫学的感作との組合せ実験を実施した。また、MCS 患者では種々の不定愁訴に加えて不安情動の亢進が報告されている。FA への反復曝露が情動・学習行動に影響を及ぼすのかどうか知るために種々の行動試験を実施した。

（３）研究方法

１）実験動物と実験群

C3H/HeN マウス（10 週齢、メス）70 匹を用いた。スライス実験に使用する 50 匹のマウスを 10 匹ずつの 5 群に分け、そのうち第 3 群には OVA 感作、第 4 群には FA 負荷、第 5 群には OVA 感作+FA 負荷を実施した。第 2 群には OVA 感作にともなう身体拘束のみを実施し、第 1 群には拘束、感作、負荷の一切の処置を実施しなかった。今年度の FA 負荷は、これまでの年度で実施したモードのうちの 400ppb 負荷のみを実施した。FA 曝露と OVA 感作は、これまでの年度と同様に行い、今年度報告書の「曝露装置と曝露条件」の章に記載されたスケジュールに従った。

行動試験には、のこり 20 匹を 10 匹ずつ 2 群に分けて、2000ppbFA 曝露群と対照群とした。

２）性周期判定

海馬の摘出に際して、今年度はこれまでの年度と異なり、新たにマウスの性周期を膣垢検査で判定する手技を加えた。すなわち、実験日の午前中にマウスの膣を生理食塩水で洗浄し、その洗浄液をスポイドに採り、その 1 滴をスライドガラスに滴下した。その風乾標本に対してギムザ染色を施し、後日顕微鏡下で膣垢の観察を行った。細胞の構成要素により性周期を判定し、最終的に発情前期にあるマウスのデータを解析から除いた。この理由

としては、性周期により海馬の電気生理学的検査の結果に変動が見られるとする実験結果が集積していること、さらにこの現象がエストロゲンの海馬への直接作用であるとする状況証拠が集積していることをふまえて、エストロゲンの血中濃度が高まる発情前期のデータを解析からはずすことで、海馬機能への交絡因子を減らすことを意図したものである。無作為で実験と解析を行うために、LTP 解析者と性周期判定者を異なる研究者とした。

3) 海馬スライス標本作成と電気生理学的計測

これまでの年度の方法と同じである。各群のスケジュールが終了した翌週に、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、断頭した後、左海馬を取り出し、スライスチョッパー (McIlwain tissue chopper) で septo-temporal 軸の middle third 部分から $450\ \mu\text{m}$ の海馬スライスを切り出した。右海馬は後述するサイトカイン発現量を検討する実験に供した。切り出したスライスを人工脳脊髄液溶液 (124mM NaCl , 2mM KCl , $1.25\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, 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 への入力線維である 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*) からガラス微小電極 (抵抗 $1\text{--}2\ \text{M}\Omega$) を用いて集合シナプス後電位 (以下 fEPSP) を記録した。テスト刺激は、 $1/60\text{Hz}$ で行い、LTP を誘導する刺激には、 θ バースト刺激 (*theta burst stimulation*; TBS; $100\text{Hz} \times 5$, $5\text{Hz} \times 5$) を使用した。テスト刺激強度は、fEPSP の最大値の半分の振幅を与える電流値に設定し、TBS も同じ電流値で刺激した。

シナプス伝達効率の指標として、従来どおり、2種類の評価指標を求めた。

① Input/Output 曲線

大きさを変えながら単一パルス電流を順次負荷した。得られた PSFV (Presynaptic fibre volley) の振幅と fEPSP の傾きとの関係を2次元プロットし、Hill 方程式 (くわしくは後述) をあてはめて、そのシグモイド曲線の特性を表す数値を得た。

② LTP の増強度

TBS 前 10 分間の fEPSP 傾きの平均値を 1 とした時の、TBS 後 35~40 分めの fEPSP 傾きを算出した。

上記①、②の各指標に関して、5群での Kruskal-Wallis 検定を行った。

4) RNA の調製と半定量 RT-PCR

各群のラット右海馬の middle third より TRIzol (Invitrogen) を用い RNA を調製した。その後、 260nm の吸光度を測定することにより、total RNA 濃度を決定した。

$0.25\ \mu\text{g}$ の total RNA に $250\ \mu\text{g}$ の random primer と H_2O を加え $12\ \mu\text{l}$ とし、 70°C で 10 分加熱することにより熱変性させた。氷中で急冷後、 $5\times$ buffer $4\ \mu\text{l}$ 、 $0.1\ \text{M DTT}$ $2\ \mu\text{l}$ 、 10mM dNTP $1\ \mu\text{l}$ 、Superscript II RNase H-reverse transcriptase (Fermentas) $1\ \mu\text{l}$ を加え、 42°C で 50 分、 70°C で 10 分反応させることにより逆転写し、cDNA を得た。PCR による増幅は次のように行った。1 サンプルにつき得られた cDNA 溶液 $1\ \mu\text{l}$ 、PCR プライマー 100pmol 、 $250\ \mu\text{M}$ dNTP、 $10\times$ buffer $5\ \mu\text{l}$ 、 $1\ \text{mM MgCl}_2$ 、1 unit Taq polymerase (Fermentas) を加え、total $50\ \mu\text{l}$ で PCR を行った。PCR は 94°C で 2 分間インキュベートした後、 94°C 1 分、 55°C 1 分、 72°C 2 分のサイクルを 23 から 30 サイクル行って増幅した。

得られた PCR 産物は 1% アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドによる染

色後、それぞれの PCR 産物の量を CCD analyzer (ATTO)により解析した。また、各群はそれぞれの β -actin の量により normalize した。用いたプライマーのシーケンスは mouse β -actin sense :5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAA-3'、mouse β -actin anti-sense :5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'、mouse IL-6 sense :5'-GACAACCACGGCCTTCCTA-3'、mouse IL-6 anti-sense :5'-GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA-3'。

5) 行動試験

① オープンフィールド試験

オープンフィールドにマウスを入れ、10 分間行動を観察した。総移動距離、平均移動速度、動作回数、立ち上がり回数・時間、毛づくろい回数・時間、中央部侵入回数、中央部滞在時間を測定した。これらは活動性・探索行動の指標である。

② b. 高架プラス迷路試験

壁付きアームと壁なしアームが直交している高架プラス迷路の中央部にマウスを置き、5 分間行動を観測した。総移動距離、平均移動速度、オープンアーム侵入回数、オープンアーム移動距離、オープンアーム滞在時間、オープンアーム平均移動速度、オープンアーム覗き込み回数・時間、オープンアーム下覗き込み回数・時間、ストレッチ回数・時間、立ち上がり回数・時間、毛づくろい回数・時間を測定した。総移動距離、平均移動速度、立ち上がり回数・時間、毛づくろい回数・時間は活動性および探索行動の指標であり、その他は不安レベルの指標である。

③ ラッシュリー迷路試験

ラッシュリー迷路に摂食制限をしたマウスをスタートボックスに置く。餌を報酬とし、スタートボックスからゴールボックスまでの到達時間を測定した。ゴールへの到達時間が短いほど空間学習が優れているとされている。

④ 受動的回避学習試験

明室と暗室からなる装置の明室にマウスを置く。マウスは暗い場所を好むので暗室に入る。暗室にマウスが入ると電気ショックを与え、これを学習させる。24 時間後、再びマウスを明室に置き、暗室に侵入するまでの時間を測定した。この時間が長いほど、回避学習をしたとされる。

⑤ ホットプレート試験

55°C のホットプレート上にマウスを置き、マウスが足をホットプレートから離すまでの時間を測定した。これは、痛覚閾値を評価する試験とされている。

受動的回避学習試験のみ Mann-Whitney 符号順位検定を用いた。他の試験に関しては Student's *t* 検定を用いた。

(4) 研究結果

1) 海馬 CA1 における電気生理学的検討

① Input/Output 曲線

単一パルス電流の漸増負荷により得られた PSFV 振幅と fEPSP 傾きとの関係を 2 次元プロットし、以下に示す Hill 方程式をあてはめた。

$$y = Y_{\max} * x^n / (K^n + x^n)$$

この式より、3つの指標を算出した（図1参照）。

Y_{max} : Yの最大飽和値

x_0 : 曲線が立ち上がるX閾値

Y'_{max} : Yの最大増加速度

この3つの値を、CA1シナプスにおける刺激・反応（前シナプスの刺激・後シナプスの反応）関係の指標とした。

5群におけるサンプル数、3つの指標の分布および統計学的検定結果を表1に示した。これらの指標に関して、5群間での有意な差は認められなかった。

② LTPの増強度

θ バースト刺激（TBS）前10分間のfEPSP傾きの平均値を1とした時の、TBS後35～40分めのfEPSP傾きを算出し、LTPの増強度とした。5群におけるサンプル数、指標の分布および統計学的検定結果を表2に示した。5群間に有意な差は認められなかった。

2) サイトカイン発現量

今回はLTPの増強度とサイトカインの発現profileを比較検討することを目的とした。各群間でのLTPの増強度に関しては有意差が認められなかったため、各群においてLTP値の高いものと、低いものとをピックアップし、その中での炎症性サイトカインの発現を半定量的RT-PCR法により解析した。

炎症性サイトカインとして、IL-1 β 、IL-6、IL-4のmRNAの発現変動を解析したが、IL-1 β 、IL-4に関しては顕著な発現の誘導はどの群においても認められなかった（data not shown）。IL-6に関しては、図に示した4群間では恒常的な発現は検出されたものの、LTPの高低とは有意な関係はなく、ほぼ同程度の発現であった（図2）。無処置コントロール群では発現が認められなかった個体も確認された（data not shown）。

3) 行動試験

① オープンフィールド試験

総移動距離や立ち上がり行動など全ての評価項目において、FA曝露群と対照群の間に有意な差はなく、活動性や探索行動への影響は認められなかった（表3）。

② 高架プラス迷路試験

オープンアーム侵入回数やオープンアーム覗き込み回数には影響が認められなかったが、オープンアーム覗き込み時間、オープンアーム滞在時間、オープンアーム移動距離、オープンアーム下覗き込み回数・時間が有意に減少した（図3、表4）。またrisk assessment行動であるストレッチ回数・時間も減少した。高架プラス迷路試験における総移動距離、平均移動速度、立ち上がり回数・時間はオープンフィールド試験と同様に影響を受けなかった。また毛づくろい回数・時間もFA曝露群と対照群の間に有意な差はなかった。

③ ラッシュリー迷路試験

ゴール到達時間、袋小路進入回数など全ての項目でFA曝露群と対照群の間に有意差はなかった（図4）。なお、第2試行目においてFA曝露群のゴール到達時間が見かけ上短縮したが有意差はなかった。

④ 受動的回避学習試験

電気ショック負荷 24 時間後、暗室に侵入するまでの時間が FA 曝露群のほうが対照群に比べ有意に延長した (図 5)。

⑤ ホットプレート試験

回避学習の促進に痛覚亢進が関与しているかどうか検討するため、ホットプレート試験を施行した。FA 曝露群と対照群の間に有意差はなく、侵害受容への影響は認められなかった (図 6)。

(5) 考察

1) 海馬 CA1 領域で誘導された LTP に対する OVA 感作と FA 曝露の影響

FA 負荷、免疫学的感作、その重複条件のいずれも、海馬 CA1 シナプスの伝達効率に有意な影響を与えなかった。単独負荷 (FA 負荷のみ、および免疫学的感作のみ) で変化が観察されなかったため、交互作用の有無にまで言及することはできないが、少なくとも強い相乗作用は存在しないことがうかがわれた。免疫学的感作によって影響が見られないことは、神経系のメモリー誘導に対して免疫系のメモリー誘導が修飾をかけないことを示しており、今回の FA 慢性曝露動物モデルでは、化学物質過敏状態に関しての 2 つの仮説すなわちアレルギー仮説とキンドリング仮説を切り離して考えるべきであることが示唆された。

2) サイトカイン発現量と LTP の大きさ

今回は海馬の middle third でのサイトカイン profile を RT-PCR 法により解析したが、LTP とサイトカイン発現誘導との関連は認められなかった。又、無処置群では IL-6 の発現が減弱している個体も見られたが、それが個体差によるものなのか、処置によるものなのかについては更なる検討が必要であると考えられる。一方、他のサイトカイン、例えば IL-1 β 等は Lipopolysaccharide で通常誘導されてくる発現量に比べ非常に低いものであった (data not shown)。LTP とサイトカイン全般の関連を考えるには、他の脳の部位を含めた更なる詳細な実験系を構築し、解析する必要があると考えられた。

3) 行動試験

オープンフィールド試験において、FA 曝露群と対照群の間に有意差はなかった。このことから、長期 FA 曝露は一般活動性に影響はないものと考えられる。高架プラス迷路試験において、不安レベルの指標となるオープンアーム滞在時間、オープンアーム覗き込み時間、オープンアーム下覗き込み回数・時間、ストレッチ回数・時間に FA 曝露群と対照群の間に有意な差が得られた。これらは、慢性 FA 曝露が不安レベルを高めることを示唆する。ラッシュリー迷路試験において、FA 曝露群と対照群の間に有意差はなかったが、FA 曝露群が 2 試行めに対照群に比べ学習促進を示した。本実験では、各群 10 匹を用いて試験を行ったために有意な差が得られなかったことも考えられる。個体数を増やすことで、有意な差が得られるかもしれない。受動的回避学習試験において、FA 曝露群の暗室進入時間が有意に延長し、回避学習の促進作用が認められた。痛覚を検査するホットプレート試験で両群に有意差はなかったことから、FA 曝露により痛覚過敏になったわけではなく、回避学習を促進したことを示唆する。

本実験で、長期 FA 曝露は、不安情動を増強し、回避学習を促進させることが明らかに

なった。一般活動性や痛覚には影響がないことから、回避学習の促進は感覚系や運動系の変化によるものでないと考えられる。空間学習には明らかな影響が認められず、不安や恐怖が強いと回避学習が促進する可能性があるので、FA 曝露の主要な標的は情動系の可能性がある。

(6) 結論

我々研究班は、昨年まで、シナプス伝達効率と抑制系の変化および細胞内シグナルトランスダクション関連蛋白量を指標に、FA 曝露による大脳辺縁系の海馬における情報処理変化を検討してきた。今年度は、MCS と診断された患者にアレルギー症の既往歴がある場合が多いことから、LTP 増強度への OVA 感作の影響を、対照群、拘束のみの群、OVA 感作群、FA 曝露群、FA 曝露+OVA 感作群の 5 群をもちいた組み合わせ実験によって検討した。その結果、400ppb 濃度の FA 曝露と OVA 感作の単独および重複付加いずれも LTP には影響しなかった。海馬内の炎症性サイトカインは、拘束群および負荷群で IL-6 発現量が増加したが負荷群の間では差が認められず、IL- β 、IL-4 は 5 群すべてで顕著な発現量は誘導されなかった。このように、今回の我々の実験条件では、LTP の増強度に対するアレルギーの関与と、MCS の動物モデルと想定したときのキンドリング仮説は認められなかった。

MCS 患者の中樞神経関連愁訴のなかに不安情動が報告されている。マウスへの慢性 FA 曝露は、不安を増強させて、回避学習を促進させたが、一般活動性、空間学習、侵害受容には影響しなかった。FA 曝露は、不安情動を増強し、海馬の興奮・抑制系機構や細胞内シグナルトランスダクションを攪乱するなど、脳内の神経情報処理能力が変化している可能性があると考えられる。