

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

研究協力者：佐々木文彦、ドゥイ ケスマ サリ、桑原佐知（大阪府立大学大学院）

（1）研究要旨

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(AG)群からなる。それぞれの群は、さらに、3ヶ月間 0ppm（空気）と 50ppm のトルエンを曝露した control 群と toluene 群に分かれる。結局、40 匹のマウスを、NAG-control、NAG-toluene、AG-control と AG-toluene の4群に分けた。

室旁核の CRH-免疫陽性(-ir)神経細胞数は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加していた。NAG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加していた。

下垂体前葉の ACTH-ir 細胞数は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加していた。NAG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加していた。下垂体前葉の ACTH-mRNA 発現量は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加していた。NAG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加していた。AG-control 群に比べ AG-toluene 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。

（2）研究目的と経過

我々は、低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露及びアレルギーは共にストレスラーとして視床下部—下垂体—副腎軸に影響を及ぼす事を明らかにした。さらに、我々の使用したマウスは、MCS 並びにシックハウス症候群の動物モデルとして認められた¹⁾。トルエンは、ホルムアルデヒド同様、MCS を発症させると考えられている²⁾。さらに、トルエンは、接着剤、ラッカー、ペンキなどの成分に含まれ、広く産業界で使用されている³⁻⁵⁾。従って、本実験の目的は、マウスに3ヶ月間トルエンを曝露すると共にアレルギー感作して、トルエン並びにアレルギーがいかに視床下部—下垂体—副腎軸に影響を及ぼすかを検討することである。

（3）研究方法

40 匹の成熟雌マウスは、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(AG)群からなる。それぞれの群は、さらに、3ヶ月間 0ppm（空気）と 50ppm のトルエンを曝露した 2 群づつに分かれる。これら 4 群のマウス(NAG-control, NAG-toluene, AG-control と AG-toluene)は、屠殺時に体重と副腎重量を計測した。各群 10 匹づつの視床下部と副腎は、ブアンの液、5 匹づつの下垂体は 10%ホルマリンで固定し、脱水後パラフィンで包埋した。各群 5 匹づつの下垂体前葉は ACTH-mRNA 発現量を RT-PCR で計測した。視床下部、下垂体と副腎のブロックは、それぞれ 10 μ の連続切片とした。視床下部

の室旁核と下垂体前葉は、それぞれ CRH 抗体と ACTH 抗体にて免疫染色後、CRH-ir 神経細胞数と ACTH-ir 細胞数を計測した。これらの方法は、以前の発表¹⁾で使用したものと同一である。

(4) 研究結果

室旁核の CRH-ir 神経細胞数は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene 群で多い。NAG-control 群よりも AG-toluene 群で CRH-ir 神経細胞数は増加した。NAG-toluene 群に比べて NG-toluene 群で多い (図 1)。

下垂体前葉の ACTH-ir 細胞の出現率は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で多い。NAG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加した。(図 2)。

下垂体前葉の ACTH-ir 細胞数は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加した。NAG-control 群に比べ AG-control 群と AG-toluene 群で増加していた (図 3)。

下垂体前葉の ACTH-mRNA 発現量は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加した。NAG-control 群に比べ AG-control 群と AG-toluene 群で増加していた。NAG-toluene 群に比較して AG-toluene 群で増加した (図 4)。

(5) 考察と結果

視床下部—下垂体—副腎軸は、ストレスに対応する系である。人や動物にストレスが加わると、視床下部室旁核の CRH 神経細胞は CRH の合成・分泌を増加する (免疫組織化学では CRH-ir 神経細胞数が増加する)。CRH は下垂体に運ばれ、ACTH 細胞に作用して ACTH-ir 細胞数を増加させることにより ACTH の合成・分泌を促進する¹⁾。ACTH は、副腎に運ばれてコルチコステロンの合成・分泌を促進して、ストレスを排除する⁶⁾。

前の実験によるホルムアルデヒドの長期曝露並びにアレルギー感作は、CRH-ir 細胞数、ACTH-ir 神経細胞数そして ACTH-mRNA 発現量を増加させ、ストレスに対応していることを示した¹⁾。

今回の実験においても、トルエンの低濃度の長期曝露並びにアレルギー感作は、前の実験同様にストレスとして視床下部—下垂体—副腎軸に作用していると考えられる。

前の実験に比較して今回のものは、次の点が異なる。前の実験では、アレルギー感作マウスに低濃度(80ppb)のホルムアルデヒドを曝露すると、2つのストレスが相乗的に視床下部—下垂体—副腎軸に作用した¹⁾。今回のアレルギーと低濃度のトルエン曝露の場合は、前述のような相乗的な作用は見られなかった。この原因として考えられることは、化学物質の相違と曝露量である。これを解決するためには、トルエンの曝露量を段階的に違えた実験の実施が望まれる。

(6) 引用文献

- 1) DK. Sari, S. Kuwahara, Y. Tsukamoto, H. Hori, N. Kunugita, K. Arashidani, H. Fujimaki, F. Sasaki. Effect of prolonged exposure to low concentrations of formaldehyde on the corticotropin releasing hormone neurons in the hypothalamus and adrenocorticotrophic hormone cells in the pituitary gland in

- female mice. *Brain Res*: 1013, 107-116 (2004).
- 2) YL. Lee, MC. Pai, JH. Chen, YL. Guo. Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occup Med (Lond)*: 53, 479-482 (2003).
 - 3) G. von Euler, SO. Ogren, SC. Bondy, M. McKee, M. Warner, JA. Gustafsson, P. Eneroth, K. Fuxe. Subacute exposure to low concentrations of toluene affects dopamine-mediated locomotor activity in the rat. *Toxicology*: 67, 333-349 (1991).
 - 4) G. von Euler, SO. Ogren, XM. Li, K. Fuxe, JA. Gustafsson. Persistent effects of subchronic toluene exposure on spatial learning and memory, dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 agonist binding in the rat. *Toxicology*: 77, 223-232 (1993).
 - 5) CM. Filley, W. Halliday, BK. Kleinschmidt-DeMaster. The effect of toluene on the central nervous system. *J Neuropath Exp Neur*: 63, 1-12 (2004).
 - 6) S. Makino, K. Hshimoto, PW. Gold. Multiple feedback mechanisms activating corticotrophin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Be*: 73, 147-158 (2002).

(7) Abstract

The effect of exposure to low concentration of toluene during long time (3 months) on
hypotalamo-pituitary-adrenal axis

Fumihiko Sasaki, Dwi Kesuma Sari, Sachi Kuwahara (Graduate School of Agriculture
and Biological Sciences, Osaka Prefecture University)

We analyzed the influences of exposure to low concentration of toluene during 3 months and the sensitization with ovalbumin (OVA) on hypotalamo-pituitary-adrenal axis utilizing immunocytological and RT-PCR methods. Mice were divided into 2 groups [non-allergy (NAG) group and allergy (AG) group]. Each group was subdivided into control group and toluene group, each of which was exposed 0 (air) and 50 ppm toluene. Thus, 40 mice consisted of NAG-control, NAG-toluene, AG-control and AG-toluene groups.

The number of corticotrophin releasing hormone (CRH)-immunoreactive (ir) neurons in paraventricular nucleus in the hypothalamus was more numerous in NAG-toluene group than that of NAG-control group. Immunoreactive neurons of AG-toluene group increased in number compared with those of NAG-control group.

The number of adrenocorticotropin hormone (ACTH)-ir cells in anterior pituitary in NAG-toluene group increased when compared with that of NAG-control group.

ACTH-ir cells were more numerous in AG-control and AG-toluene group than in NAG-control group. A similar pattern was found in ACTH-mRNA expression in anterior pituitary gland.

The present result suggests that toluene exposure and OVA sensitization have the effect on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis as a stressor.