

I. 動物モデル研究の概要

MCSはある種の有害化学物質を低濃度で長期にわたり曝露することにより神経系が過敏な状態になり、それに伴って免疫系や内分泌系にも異常状態を引き起こすことがその発症に関与している可能性があると考えられている。化学物質として過敏状態の誘導に関与している可能性の高いホルムアルデヒドをとりあげ、まず単一の低濃度曝露を行って過敏状態の指標になりえるものを探るために神経—免疫—内分泌軸に関与する分野での検討を始めた。初年度は、実験動物の選択、曝露濃度、曝露期間、影響指標の選択を行い、2年度以降は本格的な実験に取り組んだ。実験動物としてC3Hマウスを用い、0, 80, 400, 2000ppbホルムアルデヒドの低濃度3ヶ月曝露を行い以下の結果を得た。

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検討した。また、抗原の経気道投与によりアレルギー性炎症を誘導する疾患動物モデルを用いて、その炎症反応と過敏状態との関連についても検索した。さらに、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による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。

平成16年度は、動物モデルでの研究目的である“低濃度ホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露によりアレルギー学的反応とも、中毒学的反応とも異なる過敏状態の誘導が見られたか否か”ということについてこれまでの研究成果を総括する。その中で、毒性影響を評価するための量—反応関係が、マウス嗅覚系の形態学的解析、視床下部—下垂体—副腎軸の変化、脳内海馬での情報処理変化、及び行動毒性における影響において新たに本研究で見つけられたエンドポイントで見られたか否か、また、中毒学的反応と異なるときにどのようなメカニズムが考えられるかについてまとめた。更に、免疫系への影響では、低濃度ホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露により従来の Th1/Th2 バランスの偏り、IgE 抗体産生、肥満細胞の活性化などアレルギー反応としてみられてきた反応がどのように修飾されたのか、その相違点に重点を置いてまとめを行った。

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球系の形態学的解析

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、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覚系を形態学的に解析した。

嗅上皮を観察した結果、2000ppb のグループで一部変性過程を示すものもあるが、全体としては軽微なものであり、機能的障害を起していると考えにくい。

嗅球ニューロンへの解析をドーパミン合成酵素の TH に対する抗体を用いて、嗅球糸球体でおこなった。この結果、0 ppb に比べて曝露群で陽性ニューロンの数が増えることが見いだされた。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、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。さらにドーパミンニューロンに加えて、嗅球の外

叢状層のニューロンの解析をおこなった。この解析のために、Ca²⁺結合タンパク質の抗体を用いて解析した。嗅球外叢状層に存在する Parvalbumin 陽性の 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。Calbindin 陽性ニューロンでは差は認められなかった。

嗅球からは大脳辺縁系の扁桃皮質核および梨状葉皮質へ投射する、そこでこれらの部位のニューロンへの影響を解析した。大脳辺縁系の Ca²⁺結合タンパク質含有ニューロンは GABA ニューロンであることが知られている。そこで、Ca²⁺結合タンパク質の抗体を用いて免疫細胞化学的に解析した。扁桃皮質核で Ca²⁺結合タンパク質のうち 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。したがって、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。梨状葉皮質では、曝露群で顕著な差は認められなかった。

以上をまとめると、嗅球のドーパミンニューロンおよび大脳辺縁系扁桃体の Ca²⁺結合タンパク質 Parvalbumin および Calbindin 含有ニューロンが低濃度ホルムアルデヒド長期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 GABA を神経伝達物質とする抑制性の機能を有する。持続的にホルムアルデヒド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 Ca²⁺結合タンパク質の発現も増加し、この免疫陽性ニューロン数も増加したものと思われる。抑制性ニューロンの活動の増強が動物の脳にどのような影響を与えているか推測の域を出ないが、ホルムアルデヒドの持続的な刺激を解除するような脳内メカニズムが働いていると考えられる。

2. ホルムアルデヒド及びトルエンの長期曝露が視床下部—下垂体—副腎軸に及ぼす影響

視床下部—下垂体—副腎(HPA)軸はストレスに対応する軸であるので、低濃度ホルムアルデヒドと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学的方法、計量計測学的方法、半定量的 RT-PCR 法により解析した。又、MCS に罹患した患者の多くは、アレルギーを発症している女性であ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のメスマウスを用いた。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)、アレルギー発症群(B 群)、トルエン前処置群(C 群)と低濃度トルエン曝露群(D 群)の4群に分類した。A 群は非アレルギー(OVA-)マウスで、0ppb(対照群)、80ppb、400ppb、2000ppb濃度のホルムアルデヒドを12週間曝露した。B 群はアレルギー(OVA+)マウスで、ホルムアルデヒド曝露前に抗原として10 μ g/マウス濃度の卵白アルブミン(OVA)と2mg alumを腹腔に投与し、以降3週間ごとにOVAを腹腔に投与した。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。D 群は(OVA-)マウスと(OVA+)マウスに0ppmか50ppmのトルエンを12週間曝露した。

A 群(OVA-)マウスの 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 の発現量はホルムアルデヒド曝露量依存的に増加した。B 群(OVA+)マウス対照群の 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 (OVA-) マウスの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 細胞の出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量は、A 群の 2000ppb 曝露マウスの値までさらに増加した。しかし、400ppb と 2000ppb 曝露マウスの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た。D 群の (-OVA) マウスでは、対照群の CRH-ir 神経細胞数、ACTH-ir 細胞の出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量と比較してトルエン曝露群で増加していた。

(OVA+) トルエン曝露群の 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、(OVA+) 対照群に比べて増加していた。

A 群と D 群では、ホルムアルデヒドとトルエンがそれぞれストレスラーとして HPA 軸に作用していることを示した。一方、B 群では高濃度(2000ppm)ホルムアルデヒド曝露により HPA 軸が障害を受けていた。このことから、シックハウス症候群において、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推察することが可能である。

アレルギー発症モデル B 群とトルエン前処理した C 群の結果は、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ことを示唆した。

このような5年間の結果を総合して、本実験系は MCS あるいはシックハウス症候群のモデルマウスとして適切であると思われる。

3. 脳内海馬での情報処理変化の検討

本態性多種化学物質過敏状態と診断された患者共通の中枢神経症状として、頭痛・抑うつ・記憶困難・集中力低下・いらいら感・不安などが以前より報告されている。本課題におけるマウスでの行動試験においても、ホルムアルデヒド (FA) 長期曝露は不安情動を増強し、回避学習を促進した。FA 曝露は一般活動性、空間学習機能、侵害受容には影響しないことから、動物実験においても情動に関する脳機能への影響が示唆された。

不安情動には大脳辺縁系のなかの海馬が主に関与すると考えられている。われわれは 2000 ppb 濃度における FA 曝露動物海馬における形態学的な変化がないことを確認した。FA 曝露したマウス海馬においては、歯状回で興奮性が亢進し、フィードバック抑制は海馬 CA1 と歯状回で減弱した。この抑制の減弱は抑制性シナプス伝達物質 γ -アミノ酪酸(GABA)の合成酵素であるアミノ酸脱炭酸酵素(GAD)のサブタイプ GAD67 の低下と一致し、興奮と抑制の攪乱が伝達物質合成レベルでおきていることが示唆された。400 ppb からフィードバック抑制の低下傾向がみられた。シナプス伝達の可塑性については、短期増強 (STP) は減弱したが長期増強 (LTP)・長期抑圧 (LTD) は変化しなかった。が、スライスの実験条件を変えると LTP の低下が観察された。条件を修正して測定した LTP の低下については、80、400 ppb でも観察された。海馬 CA1 領野においては、シナプス伝達の可塑性と関連している Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) α および β アイソフォームの自己リン酸化反応が亢進し

ており、恒常的活性の上昇がシナプス可塑性を発現する能力を頭打ちとした結果として障害したと考えられる。

曝露モデルにおけるこれらの変化にたいするアレルギーの関与については、400 ppb 濃度でFA曝露されたアレルギーモデルでのLTPや炎症性サイトカインの発現変動の解析結果からは明らかにはならなかった。一方、海馬以外の部位での変化としては、曝露群の脳皮質でも副腎皮質刺激ホルモンや増殖因子活性化プロテインキナーゼ (ERK) の増加がみられたことから脳辺縁系以外へのFA曝露の影響も示唆された。

FA曝露マウスでは、嗅覚情報が嗅内野でさまざまな感覚情報と集約・統合され、その情報(興奮性入力)が海馬内に入って増幅され、視床下部の神経活動をストレス反応へと変異させたと考えられる。さらに中枢神経系内のストレス軸の変移が情動反応の亢進と関連していることが示唆された。

4. 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、及び神経—免疫軸への影響についての検討

(4. 1) 獲得免疫系、及び神経—免疫軸への影響についての検討

化学物質の曝露による過敏状態とアレルギー性炎症モデルの反応との違いについて明らかにするために、ホルムアルデヒドのみの曝露群と抗原を腹腔内投与とエアロゾルで感作しながらホルムアルデヒドを曝露した群における免疫応答を比較検討した。その結果、吸入抗原感作を行うアレルギー性炎症モデルでは2000ppbホルムアルデヒド曝露による肺への炎症性細胞の集積や400と2000ppb曝露による脾臓細胞からのケモカイン産生の増加がみられたが、Th2タイプのサイトカイン産生やIgE抗体価における増強は認めなかった。一方、脳内のサイトカイン量について下垂体、海馬、線条体での測定においては、炎症性のサイトカインレベルで顕著な差はみられなかったが、神経栄養因子であるNGFにおいては海馬で400ppb曝露による増加が認められた。さらに、海馬におけるNGF mRNAの発現の増強は低濃度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、神経伝達物質受容体の遺伝子発現量の変化を調べるために、海馬及び扁桃体のNMDA型グルタミン酸受容体($\epsilon 1$, $\epsilon 2$ 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により $\epsilon 1$ 、 $\epsilon 2$ の変動が認められ、またD1、D2の増加傾向もみられた。扁桃体では、 $\epsilon 1$ 、 $\epsilon 2$ 、D1の増加が認められた。海馬において $\epsilon 1$ 、 $\epsilon 2$ 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遺伝子発現量の増加は、情動機能の変化の可能性を示唆している。

トルエン曝露では、抗体価と神経伝達物質受容体の遺伝子発現でホルムアルデヒドとは異なる反応がみられた。

これまでのまとめとして、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、免疫系への抗原刺激が加わることにより脳内での神経伝達物質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。

(4. 2) ホルムアルデヒド曝露とアレルギー反応に関わる肥満細胞機能との関連

ホルムアルデヒド曝露と抗原の吸入感作によるアレルギー性炎症モデルにおいてもっとも顕著にくしゃみの増加が観察された。そこで、肥満細胞が関与する可能性について解析するために、肥満細胞欠損マウス(WBB6F1-W/Wv)とその正常対照マウス(WBB6F1-+/+)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、皮膚の炎症病変やリンパ球分画について変化は認めなかった。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が、両マウス間でサイトカイン産生、及び血漿中の抗体価において差異は認められなかった。これらの結果から、今回のホルムアルデヒド曝露条件下では、免疫-神経軸における影響に肥満細胞の関与は少ないと推察された。

5. ホルムアルデヒド曝露後の自発運動量の観察、およびホルムアルデヒドあるいはトルエン吸入曝露によるマウスのくしゃみ様症状の定量

MCS の動物モデルを用いての行動毒性試験で中枢神経刺激薬に対する感受性亢進の有無が報告されている。そこで、移所運動活性へのホルムアルデヒド曝露の影響について検討した。2000ppb の3ヶ月曝露で運動活性の増加がみられ、また、くしゃみ様行動の増加も認められた。次に、無刺激の自発運動のみを経時的に測定し、曝露中に観察されたくしゃみ様行動を定量化し、曝露の影響を評価するとともに、OVA 感作との関連についても検討した。その結果、移所運動活性の観察においては、低濃度ホルムアルデヒドの曝露影響は観察されなかった。くしゃみ様行動回数の変化に関しては、曝露2ヶ月時ですでに曝露濃度依存的なくしゃみ様行動の増加が観察された。曝露終了時点でのくしゃみ様行動の回数はさらに増加し濃度依存性を認めた。また、OVA の感作により非感作群に比べ有意な増加を認めた。また、曝露期間の増加にしたがってくしゃみ様行動回数が増加していること、くしゃみ様行動回数だけでなく、くしゃみ様行動の発症率においても曝露濃度の増加に依存していることが観察された。次に、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様行動を観察した。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様行動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様行動の頻度が増加し、80ppb においても有意なくしゃみ様行動の増加が認められた。一方、肥満細胞欠損モデルマウスと正常マウスの比較においては、有意なくしゃみ様行動の違いは認められなかった。このことから、観察されたくしゃみ様行動に肥満細胞が関与していないことが示唆された。

以上、低濃度ホルムアルデヒド曝露によりくしゃみ様行動の増加が観察されたが、50 ppm トルエン濃度ではくしゃみ様行動の誘発はみられなかった。

6. その他の影響

6-1) 化学分析による曝露指標

低濃度ホルムアルデヒド曝露における曝露指標の開発を目的として、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によるマウス末梢血におけるホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度測

定を試みた。末梢血をヘパリン採血した後、生理食塩水で洗浄後、蒸留水を加えて溶血したものを測定試料とした。反応試薬として cyclohexane-1,3-dione を用い蛍光検出器で測定する方法は、感度が高いがブランク値も高値を示し、サンプル調整中の汚染の可能性なども含め測定法改良の必要性が示唆された。次に 2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride (DNPH) との反応による方法を試みた。この方法では、広い濃度域において直線性を認め、検出法としての有用性が示唆された。しかしながら、本方法による測定結果はホルムアルデヒドを曝露しないコントロールから 2000ppb 曝露群までいずれも、ほぼ同様の値を示し、この程度の曝露域においては、曝露後の生体内における速やかな代謝の影響もあり、化学分析による曝露指標を得ることが困難であり、今後さらに検出方法を改良して検討を加えていく必要性が示唆された。ま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ところ曝露直後には高く翌日には正常レベルに戻っており経気道曝露により確実にマウス生体内に取り込まれていることが確認された。

6-2) 低濃度ホルムアルデヒドおよびトルエン曝露によるマウス気道粘膜上皮細胞の変化と炎症細胞の動態についての形態学的検索

低濃度ホルムアルデヒド（最大で 2000ppb）および 50ppm トルエンの 12 週間吸入曝露による病理学的変化について検討した。今回用いた濃度域における吸入曝露では、いずれの物質においてもマウスにおいて気道粘膜上皮細胞の著明な剥離や扁平上皮化生、腫瘍変化等を生じなかった。また明らかな炎症性細胞の浸潤もなく、肥満細胞の分布にも変化はみられなかった。一方、アレルギーモデルとして作成した OVA の吸入曝露群においては、気道粘膜変化として肥満細胞の浸潤が観察されるものの、OVA とホルムアルデヒドの両者による相乗効果は光顕的に確認されなかった。

7. まとめ

低濃度のホルムアルデヒドを C3H マウスへ長期（3 ヶ月）にわたり曝露することにより、嗅覚系におけるドーパミン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、くしゃみ様症状の増加などが確認された。これらの結果は、低濃度ホルムアルデヒド曝露が嗅覚系を介して神経—内分泌—免疫軸を過敏な状態に導く可能性を示唆している。また、アレルギーモデルにおける嗅覚で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が推察された。中毒学領域としてとらえられていない濃度域での反応や通常のアレルギー状態とは異質の反応が観察されたことは、低濃度曝露がなんらかの反応異常を神経—免疫系に引き起こす可能性は否定できない。今後、動物モデルにおいてはアレルギー感作状態の併用効果に見られる機構の解析、化学物質特異性に係わる遺伝的な素因の検討、低濃度域での複合化学物質曝露による影響解明などの研究が MCS の解明により重要と考える。