

## 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

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発化学物質過敏状態 (Multiple Chemical sensitivity: MCS) の研究が重要視されている<sup>1, 2)</sup>。なお低濃度ホルムアルデヒドにより惹起されることが知られてい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、低濃度のホルムアルデヒド曝露とヒト<sup>5)</sup>、ラット<sup>2)</sup>やマウス<sup>7)</sup>の呼吸器の疾病との関係がこれまでに研究されてきた。さらにトルエンについてもホルムアルデヒドと同様の症状を発症させるとして認められている<sup>7)</sup>。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<sup>8-10)</sup>。

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>11-13)</sup>。しかしながら、低濃度のホルムアルデヒドやトルエン曝露が 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女性である事から、卵白アルブミンを前処理したアレルギー発症メスマウスの 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、アレルギーを惹起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惹起したアレルギーの意義を解析する事である。最後に、トルエン曝露とアレルゲンが HPA 軸にどのような影響を及ぼすかを検討することが第四の目的である。このような4年間の実験を総合して、MCS の中でも病態が広く研究されてきたシックハウス症候群の発症の機構を解明すること並びにそのモデルマウスを作成することが本研究の主目的である。

### （2）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。さらに、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、それぞれ80、400、2000 と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、80、400、2000 と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、80、400、2000 と 0 群とした。D 群は、非アレルギー (NAG) とアレルギー (AG) マウスに 0ppm か 50ppm のトルエンを 12 週間曝露した。合計 34 群の内それぞれの群は、10 匹ず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- (免疫陽性) 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。光学顕微鏡用のマイクロトームで  $10\mu\text{m}$  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。  $T = n/i \times \sum Ni$  (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

### 3-1) 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  $10\mu\text{m}$  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  $40\mu\text{m}$  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。

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

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

### 3-2) 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  $-70^\circ\text{C}$  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。  $2\mu\text{g}$  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。

### (3) 研究結果

#### 1) A (NAG) 群 (OVA-)

##### 1-1) 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 1 の NAG (OVA-) 群 に示した。体重、副腎重量、下垂体前葉体積は、曝露 (80、400、2000) 群と対照 (0) 群で差がなかった。

##### 1-2) 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 (Fig. 1)。

##### 1-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率 (Fig. 2)、数 (Fig. 3) は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた。

##### 1-4) 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. 4)。

#### 2) B (AG) 群 (OVA+)

##### 2-1) 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 1 の AG (OVA+) 群)。

##### 2-2) 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

B (AG) 群の対照 (0) 群マウスの CRH-ir ニューロン数は、A (NAG) 群マウス対照 (0) 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、A (NAG) 群の 2000ppb 曝露マウスの値まで増加した。400ppb と 2000ppb では減少した (Fig. 1)。

##### 2-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

B (AG) 群の対照 (0) 群マウスの ACTH-ir ニューロンの出現率 (Fig. 2) と数 (Fig. 3) は、A (NAG) 群マウス対照 (0) 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 (NAG) 群の 2000ppb 曝露マウスの値と差はない。400ppb と 2000ppb では減少した。

##### 2-4) 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

B (AG) 群の対照 (0) 群マウスの ACTH-mRNA の発現量は、A (NAG) 群マウス対照 (0) 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 (NAG) 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. 4)。

#### 3) C 群 (OVA-、トルエン+)

##### 3-1) 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 2 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。

### 3-2) 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 (Fig. 5)。

### 3-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率 (Fig. 6) 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. 7) では 400ppm 群のみが対照群のものに比べて有意的に増加した。

### 3-4) 下垂体前葉の sinusoid

対照群に比べて 400 と 2000ppm ホルムアルデヒド曝露群で、sinusoid の有意的な拡張が見られた。特に、2000ppm 群で著明であった (Fig. 8)。

### 3-5) 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. 9)。

## 4) D 群

### 4-1) 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 3 に示した。NAG (OVA-) マウスの体重は、対照群よりトルエン曝露群で増加した。副腎重量と下垂体前葉の容積は、各群で有意の差はなかった。

### 4-2) 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

NAG (OVA-) 対照群の CRH-ir ニューロン数に比べて NAG (OVA-) トルエン曝露群、AG (OVA+) 対照群と AG (OVA+) トルエン曝露群で多い。(OVA-) トルエン曝露群に比べて (OVA+) トルエン曝露群で多い (Fig. 10-A)。

### 4-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率 (Fig. 10-B) と数 (Fig. 10-C) は、NAG (OVA-) 対照群に比べて (OVA-) トルエン曝露群、AG (OVA+) 対照群と AG (OVA+) トルエン曝露群で多い。ACTH-ir 細胞の出現率は、(OVA-) トルエン曝露群に比べて (OVA+) トルエン曝露群で多い (Fig. 10-B)。

### 4-4) 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

ACTH-mRNA の発現量は、(OVA-) 対照群に比べて (OVA-) トルエン曝露群、AG (OVA+) 対照群と (OVA+) トルエン曝露群で多い。(OVA-) トルエン曝露群に比べて (OVA+) トルエン曝露群で多い (Fig. 11)。

## (4) 考察

A (OVA-) 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>14)</sup>。一方、B (OVA+) 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。この現象から、B 群ではアレルギーと高濃度ホルムアルデヒド曝露により HPA 軸が障害を受け、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いう仮説が考えられる。すなわち、MCS 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いう仮説を立てることができる。

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惹起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、アレルギー炎症を惹起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。

D 群の結果から、トルエンの低濃度曝露は、A~C 群の実験同様ストレスとして HPA 軸に作用していると考えられる。

A~D 群の結果より、本実験系は MCS あるいはマウスにおけるシックハウス症候群モデルとして活用できる可能性があることが示唆された。

本報告中の A と B の結果は Brain Res. <sup>15)</sup>、C の結果は、J. Vet. Med. Sci. <sup>16)</sup>に、また、D の結果は J. Jpn. Soc. Atmos. Environ. <sup>17)</sup>に掲載された。

## (5) 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. 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.
7. Lee, YL, Pai, MC, Chen, JH, Guo, YL. Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occup Med (Lond)*: 53:479-482 (2003).

8. von Euler, G, Ogren, SO, Bondy, SC, McKee, M, Warner, M, Gustafsson, JA, Eneroth, P, Fuxe, K. Subacute exposure to low concentrations of toluene affects dopamine-mediated locomotor activity in the rat. *Toxicology* 67:333-349, 1991.
9. von Euler, G, Ogren, SO, Li, XM, Fuxe, K, Gustafsson, JA. 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.
10. Filley, CM, Halliday, W, Kleinschmidt-DeMaster, BK. The effect of toluene on the central nervous system. *J Neuropath Exp Neur* 63:1-12, 2004.
11. 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.
12. Whitnall, MH. Regulation of the hypothalamic corticotrophin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40:573-629, 1993.
13. Seasholtz, A. Regulation of adrenocorticotrophic hormone secretion: lessons from mice deficient in corticotrophin-releasing hormone. *J Clin Invest* 105:1187-1189, 2000.
14. 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.
15. Sari, DK, Kuwahara, S, Tsukamoto, Y, Hori, H, Kunugita, N, Arashidani, K, Fujimaki, H, Sasaki, H. 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.
16. Sari, DK, Kuwahara, S, Furuya, M, Tsukamoto, Y, Hori, H, Kunugita, N, Arashidani, K, Fujimaki, H, Sasaki, F. Hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis in mice inhaling prior to low-level long-term exposure to formaldehyde. *J Vet Med Sci* 67:303-309, 2005.
17. Sari, DK, Kuwahara, M, Tsukamoto, Y, Hori, H, Kunugita, N, Arashidani, K, Fujimaki, H, Sasaki, F. Effects of subchronic exposure to low concentration of toluene on the hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis of female mice. *J Jpn Soc Atmos Environ* 41:38-43, 2006.