

### 3. 脳内海馬での情報処理変化の検討

研究協力者 電気生理学的検索

笛田由紀子（産業医科大学産業保健学部）

夏目季代久（九州工業大学大学院生命体工学研究科）

黒河佳香（独立行政法人国立環境研究所）

神経化学的検索

福永浩司（東北大学大学院薬学研究科）

行動学的検索

粟生修司（九州工業大学大学院生命体工学研究科）

形態学的検索

福田孝一（九州大学大学院医学研究科）

免疫学的検討

吉田安宏（産業医科大学医学部）

#### （1）過敏症の動物モデル作成における研究班のアプローチ

本態性多種化学物質過敏状態（MCS）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（Miller, 1994; Ashfold and Miller, 1998; Sorg, 1999; ANYAA9 933, 2001）。症状が多種多様な分、メカニズムについても 20 を越える仮説が提唱されている（「室内空気質と健康影響」にある加藤の総説を参照）。『モデル』というからには、多種多様な症状を示す MCS 患者のどのような症状を持つモデルをめざすのかまず議論をし、その中で大脳辺縁系の関与を示唆する仮説に注目した。そして動物を用いた実験で確認できそうな最初の部位として、興奮性の変化に対して脆弱性をもちかつシナプス伝達効率など可塑性が最も詳しく検討されていた海馬の機能を調べることにした（海馬をターゲットに選んだ理由は平成 12 年度報告書に詳細に記載している）。平成 12 年度研究開始当初、高濃度においてすらホルムアルデヒド（FA）曝露動物で海馬神経細胞の機能を検討した報告がまったくなかった。したがって、電気生理学的手法（笛田、夏目、黒河担当）と神経化学的手法（福永担当）を組み合わせることで影響を検討することにした。粟生らの行動試験から得られた 2000 ppb 濃度での長期曝露マウスに関する成果は、情動反応の亢進と回避学習の増加であった。そして、海馬においては、形態学的には顕著な変化はないものの（福田担当）、神経活動の興奮性・抑制系・シナプス伝達の可塑性の変化が観察された。この報告書では、2000 ppb 濃度でのエンドポイントを概説し、量—反応関係について述べ、われわれのメカニズム仮説と従来の仮説との対比を説明した。最後に、本研究課題のために参画した各専門分野の研究者たちが実験中あるいは議論で述べた意見をまとめた。

#### （2）2000 ppb のエンドポイントとその量—反応関係について

FA（2000 ppb）長期曝露は成熟雌マウスの不安情動を増強し、回避学習を促進した（2004

年 Society for Neuroscience にて Press Book 用演題として採択)。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、MCS 患者の症状のひとつである情動に関する脳機能への影響が示唆された。情動発現には、大脳新皮質と皮質下構造との広い範囲のシグナルコミュニケーションの関与が重要視されている (In: principles of Neuronal Science, 'Emotional states and feelings' by Iversen et al., 2000) なかで、不安情動には主に海馬が関与していると考えられている。

研究開始当初、FA 曝露動物では海馬神経細胞の機能を検討した報告がまったくなかった。したがって、電気生理と神経化学的手法を組み合わせることで影響を検討した。まず 2000 ppb 濃度での影響評価を明確にした。海馬スライスを用いて、興奮性・フィードバック抑制・シナプスの短期増強(STP)・長期増強(LTP)および長期抑圧 (LTD、平成 16 年度の実験) を計測し、細胞内シグナルトランスダクションにおける関連蛋白分子を半定量解析した。その結果、FA 慢性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  $\gamma$ -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 の低下と一致した (平成 16 年度の実験)。シナプス伝達の可塑性に関しては、STP が減弱した。LTP・LTD (LTD は平成 16 年度の実験) は変化しなかったが、スライスの実験条件 (人工脳脊髄液のカリウム濃度を増加した) を変えると LTP の低下が観察された。海馬 CA1 領野においては、シナプス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)  $\alpha$  および  $\beta$  アイソフォームの自己リン酸化反応が亢進していた。STP の低下と CaMKII の自己リン酸化反応の亢進については、曝露群の海馬 CA1 における CaMKII の恒常的活性の上昇が、シナプス伝達の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われわれは考えている。

曝露濃度を下げた実験では、400 ppb からフィードバック抑制の低下傾向がみられた。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、量-反応性の linear な関係を示さなかった。また、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における海馬の LTP や炎症性サイトカインの発現変動の解析をしたがその結果からは明らかにはならなかった。また海馬以外の部位での変化としては、曝露群の大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大脳辺縁系以外への FA 曝露の影響も示唆された。しかしながら、2000 ppb で変化したすべての指標について同様の変動を、80、400 ppb 濃度において確認・再現する実験にはいたらなかった。

中毒学と過敏症の違いを『中毒学的濃度レンジにおける閾値の有無あるいは用量反応関係の消失』という観点から考えると、ごく低濃度レベルでも観察された LTP の低下は過敏状態との関係が示唆されると解釈されるかもしれない。さらに、2000 ppb のレベルにおいてすら、今まで報告されていない神経機能変化が見られた事実は、あきらかに FA 曝露による脳内変化を示しており、過敏状態との関連を解き明かす『鍵』を示唆しているのかもしれない。しかしながらいっぽうで、用量反応関係は鋭敏な手法で検討すれば超低濃度でも現れてくるものかもしれないし、脳内で複数因子の関与があれば過敏状態という縦軸に対してあきらかな

閾値としては観察されない可能性も否定できない。さらに、一般的には低濃度になればなるほど個体間における指標値の変動のなかに曝露によって変化した指標値が重なってしまい、曝露によって惹起される事象を対照とする事象と区別して検証することが困難となるため、1群の動物数をもっと増やす必要性も出てくるだろう。このように今回の MCS の動物モデルに関する研究で明らかになった内容は更なる検討が必要なのだと思う。

### (3) メカニズムについての仮説

いままでの研究者が報告している中には、『過敏症とは化学物質への不耐の状態であり、それは神経の可塑性と関係があるのではないか』という議論があった (ANYAA9 933, 2001 を参照されたい)。その中でわれわれ研究班に関連した内容としては、Sorg らが ppm オーダーの低濃度 FA 繰り返し曝露が化学ストレスになることを強く示唆したこと (同著 Part II pp: 57-67)、Gilbert が農薬への曝露によって辺縁系関連の行動が発現するまでの仮説を提唱したことだった (同著 Part II pp: 68-91)。

では研究班の結果からどのようなメカニズムが考えられるだろうか。市川らの嗅上皮と嗅球における形態学の所見からは、マウスの脳ではかなり強い刺激として嗅覚が認識されると解釈できる。嗅覚情報の嗅球からの脳内投射部位は、扁桃体・梨状葉・嗅内野等など、複数の脳内部位へと投射されている。嗅内野とよばれる大脳皮質嗅内野にはさまざまな感覚の情報が集約・統合されている。その統合された神経情報は海馬へと入り、海馬から内側部にある乳頭体・視床その他へと投射される。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、その集約・統合された情報 (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のかもしれない。一方、市川らが形態変化を検討した扁桃体も、嗅球から直接入力を受け情動発現には重要な役割をすると考えられている。このように海馬を主とした中枢神経系内の複数部位が不安情動反応の変化を生む機構と関連しているのではないだろうか。FA 曝露によるストレス反応の亢進と不安情動の発現はほかの研究でも示唆されている。佐々木らの報告で視床下部のストレス反応が亢進していることが明らかに示された。したがって、実験結果から総合すると、不安情動の亢進やストレス反応にかかわる機構が、過敏状態を引き起こす機構とメカニズムを共有している可能性が考えられる。FA 曝露が、海馬等における神経情報処理機構をも攪乱し、過敏状態になる機構と関連しているのではないかという解釈は、神経可塑性について議論した従来の仮説 (ANYAA9 933, 2001) とは矛盾しない。

MCS のメカニズムについては、患者の症状と実験データから大脳辺縁系の関与を示唆する議論されてきた (Bell, 1994; Miller, 1994; Rossi, 1996; Bell et al., 1999; Sorg, 1999)。さまざまな仮説が提唱されており、なかでも Bell らは大脳辺縁系が関与するキンドリング仮説 (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 回繰り返し脳の辺縁系に与えることによってほぼ 3 週間後には同レベルの刺激でてんかん発作を起こす現象をいう。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、MCS における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) を提唱している。大脳辺縁系キンドリングはてんかんのモデルのひとつである。しかし、FA 曝露によるてんかん発作は観

察されていないし、また、疫学調査でもてんかん患者に MCS が多いという報告もない。むしろ、てんかんと MCS の関係については現在のところ否定的である(Gilbert, ANYAA 9 933, 2001)。しかし、Gilbert らは、てんかん発作の発現には至らないが辺縁系の興奮性の変化が、MCS の発達と発現における不安情動の役割に関係しているのではないかと考察している。われわれの実験結果で観察された海馬興奮性の増加・抑制の減弱は、はからずもこの Gilbert の推論を裏つけることとなったわけである。しかし、動物キンドリングモデルでは通常シナプス伝達増強現象が観察されている。われわれの曝露実験結果では STP は低下、LTP は変化なし（実験条件を変えると低下した）という結果であった。これは矛盾というよりは、『曝露群の海馬 CA1 における CaMKII の恒常的活性の上昇が、シナプス伝達の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』と私達は考えている。この点はキンドリングモデルと異なる。

#### (4) 平成16年度の新たな知見

##### 4-1 横断研究

4年間の研究で変動する指標がみいだされた嗅球の TH ニューロンの増加（市川らの班）、脳下垂体の ACTH 発現量の増加（佐々木らの班）、海馬の神経伝達物質受容体発現量（藤巻らの班）、嗅球の TH 蛋白量解析、抑制の減弱を同一個体で調べることにした。その結果、群間で傾向が一致したのは、歯状回の抑制の減弱と興奮性シナプス伝達受容体のひとつである NMDA 受容体のサブタイプ構成比であった。しかし、個体における相関は明らかにならなかった。

##### 4-2 GABA 系関連蛋白分子の変動

平成15年度までの研究で、FA 曝露（2000 ppb）によって海馬 CA1 と歯状回ではフィードバック抑制が減弱することがわかった。1-ブロモプロパンの吸入曝露によってもフィードバック抑制の減弱が用量依存性に観察され、GABA シナプス間隙における GABA 滞在確率の減少したことが原因で減弱したことが示唆された（Fueta et al., 2002, 2004）。福永らは、2000 ppb FA 曝露マウスにおいてアミノ酸脱炭酸酵素(GAD)（抑制性シナプス伝達物質γ-アミノ酪酸(GABA) は GAD によってグルタミン酸から合成される）のサブタイプ GAD67 の低下を見出した。興奮と抑制の攪乱が伝達物質合成に生じたことが示唆された。

##### 4-3 LTD への影響

STP、LTP などシナプス伝達が増強される現象のみでなく、低下する現象（LTD）に関して検討した。一般的に成熟した動物では LTD は捉えにくい報告が多いが、比較的よく用いられる刺激条件（ペアパルスで 1Hz 刺激を 15 分間）で行った。結果は 2000 ppb 曝露群と対照群の LTD には差は認められなかった。

#### (5) 動物モデルに与えられた問いに対する意見

MCS の動物モデルの作成というミッションに関して議論にのぼった主な内容を述べる。

そもそも MCS は頻度が低い。しかも男性よりも女性の頻度が高いという。動物モデル班では 10 週令の雌マウスに曝露を開始したが、性ホルモンレベルはシナプス伝達可塑性・抑制性シナプスへの修飾・受容体蛋白発現調節などの報告もあり、性差の問題、性周期の問題はいつも議論にのぼった。結局、膣スメアによる性周期のモニターはかえって刺激になる可能性が懸念され、4 年めに行われた組み合わせ実験において解剖日にのみ膣スメア観察が実行された。しかし性周期による影響の有無の判定は困難であった。更年期女性に頻度が高いという疫学調査であったが、初めての実験ということもあって性周期をもつ週令の雌をもちいた。疫学調査結果が今も正しいのであれば今後の実験はエストロゲンレベルをコントロールした動物も使用したほうが良いのではないかと思われた。

『過敏な状態』とはいったいどのような状態を想定するのかという議論もあった。低濃度曝露における閾値の有無の議論は、ハザード性がもっとも検討されてきた分野のひとつである『発がん』でも遺伝毒性の有無で閾値の有無を考えるというメカニズムベースになっているようだ。われわれの議論では、『過敏症の証明には組み合わせ実験も必要なのではないか』という提案があった。実際にアレルギーモデルと曝露モデルに関して組み合わせ実験を行ったが過敏状態を実証できなかった。単独モデルでの変動よりも組み合わせモデルでの変動が大きければ過敏状態にアプローチできたかもしれない。あるいは、Bell らの提唱する『時間依存性』を考慮したモデルとして、曝露停止後の再チャレンジにおける感受性の変化をみるという方法で過敏な状態を検討できるのかもしれない。