

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

研究協力者 藤巻秀和、黒河佳香、山元昭二、掛山正心（独立行政法人国立環境研究所）
櫻田尚樹（産業医科大学）

（1）研究目的

MCSの発症と低濃度化学物質曝露との関連について検索するためには、アレルギー反応とは異なる過敏状態の誘導の有無について調べることは大変重要である。MCS患者の中にはアレルギー疾患の既往歴のある人が60%近く含まれるという報告もみられているので、MCSの発症と免疫系との何らかの関連性が推測された。

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での反応指標（IgE抗体産生、Th2タイプの優位性、肥満細胞活性化等）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アレルギーモデル群における免疫応答を比較検討した。また、神経—免疫軸における反応のかく乱がMCSの発症に関わることが示唆されていたので、神経栄養因子や神経伝達物質レベルでの変動についても検討した。

（2）研究方法

すでにこれまでの報告書に詳述してあるので、省略。

（3）主な研究結果

3-1 肺における炎症性反応の解析

肺における炎症反応の指標として考えられる肺胞洗浄液における炎症性細胞の集積とその中のサイトカイン・ケモカイン産生についてホルムアルデヒド曝露について調べた結果、ホルムアルデヒド曝露のみ（抗原無群）では肺胞洗浄液中の炎症性細胞数や proinflammatory サイトカインレベルで変動はみられなかった。しかしながら、アレルギーモデル群の 2000ppb 曝露群では有意な炎症性細胞の増加が見られた。集積した炎症性細胞の分類では肺胞マクロファージと好酸球の数の有意な増加がみられた。

次に、肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン産生について、アレルギーモデルマウスの IL-1 β 産生は濃度依存的な低下を示し 2000ppb 曝露群で有意に低下した。IL-6 と TNF α 産生でも同様に低下の傾向がみられたが、統計学的には差はなかった。炎症性細胞の集積や活性化に関与するケモカイン産生では、MIP-1 α と MCP-1 産生においては抗原の感作の有無に関係なくホルムアルデヒド曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

トルエン曝露の結果では、トルエン曝露のみで肺胞洗浄液中の総細胞数とマクロファージ数は有意に増加したが、好中球とリンパ球などでは差はみられなかった。アレルギーモデルマウスにトルエン曝露を行うと、肺胞洗浄液中での炎症性細胞の集積においては、トルエン曝露による有意な増加は認められなかった。トルエン曝露のみでは肺胞洗浄液中の IFN- γ 産生量

の有意な低下がみられたが、TNF- α では差はみられなかった。

3-2 脾臓でのリンパ球亜集団の変動と Th1/Th2 サイトカイン産生の解析、及び血漿中の伝達因子の解析

リンパ性器官である脾臓と血中におけるリンパ球亜集団のホルムアルデヒド曝露による変動をフローサイトメトリー分析した。その結果、今回用いた曝露濃度では CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞と CD19 陽性 B 細胞の割合において、曝露群とコントロール群との差はみられなかった。Th1/Th2 サイトカイン・ケモカインの産生への影響を脾臓細胞を 48 時間培養してその上清中で調べたが、IL-4、IL-5 及び IFN- γ 産生においては、ホルムアルデヒド曝露による有意な変化はみられなかった。

次にマクロファージ、樹状細胞、抗原提示細胞から主に分泌されるケモカインのうち、Th1 タイプの誘導にかかわるケモカインである MIP-1 α と Th2 タイプの誘導にかかわる MCP-1 について 24 時間培養後の培養上清で調べた。MIP-1 α では抗原刺激による差はみられなかったが、Th2 タイプの誘導にかかわる MCP-1 の産生では、濃度依存的に上昇し 400ppb と 2000ppb 曝露群で有意な増加が認められた。

なお、ホルムアルデヒド曝露のみでは、血漿中の MCP-1 産生に低下が見られ、2000ppb では有意であった。しかしながら、アレルギーモデルマウスでは、低下傾向がみられたのみであった。好中球の走化性にかかわる KC ケモカインの産生を調べると、免疫していないマウスで、ホルムアルデヒド濃度依存的な増加 (2000 ppb では有意) がみられた。末梢神経の終末より分泌され NGF により増加し炎症の誘導に関与する Substance P について血漿中で検討した。免疫していないマウスの血漿中では、ホルムアルデヒドの濃度依存的に Substance P の増加が認められた。しかしながら、免疫したマウスへのホルムアルデヒド曝露では、曝露による低下傾向が認められた。

トルエン曝露による脾臓でのサイトカイン mRNA の発現について、リアルタイム PCR で検討した。その結果、抗原感作なし群では対照群とトルエン曝露とで変化は認めなかったが、抗原感作したアレルギーモデルマウスでは IL-12mRNA の顕著な低下がみられ、IL-4 も低下傾向を示した。

3-3 血中抗体価の変動解析

全身の免疫系への影響指標としての血漿中の抗原特異的抗体価と総抗体価を ELISA 法によって測定した結果では、総 IgE 抗体価においてホルムアルデヒド曝露のみの群では増加傾向がみられたが、抗原感作群へのホルムアルデヒド曝露では有意な差はみられなかった。抗原特異的 IgE 抗体価、IgG1 抗体価、IgG2a 抗体価においては再現性のある有意な差は認めなかった。

トルエン曝露したマウス血漿中の OVA 特異的な抗体価を測定すると、抗 OVA IgG2a で有意な増加がみられたが、IgE, IgG1 レベルでは差はみられなかった。血漿中の総抗体価においては、トルエン曝露による IgE 抗体価で有意な増加がみられた。

3-4 脳内サイトカインと神経栄養因子の変動

脳における炎症性サイトカイン等の産生への影響を調べるために、ホルモン分泌の調節機能をもつ下垂体、記憶にかかわる海馬、情報の受け取りに重要な線条体を取り出しそれぞれの領域における産生量を測定した。ホルムアルデヒドのみの曝露、あるいは抗原感作とホルムアルデヒド曝露によるそれぞれの領域での産生において、IL-6、TNF α 、IL-1 β 、IL-12p40、TGF β のいずれにおいても曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

脳における神経栄養因子産生への影響を調べるために下垂体、海馬、線条体の組織でのNGF産生についてホルムアルデヒドのみの曝露、あるいはアレルギーモデルにホルムアルデヒド曝露したマウスで検討した。その結果、抗原吸入感作しホルムアルデヒド曝露したマウスの海馬において400ppbで有意な増加を認めた。下垂体と線条体では海馬と比べると低い産生量を示し曝露群とコントロール群との間に変化はみられなかった。ホルムアルデヒド曝露のみのマウスでは、下垂体や線条体と同様海馬においても差はみられなかった。NGFと同様な働きをもつBDNFの産生量についても下垂体、海馬、線条体で検討した。BDNF産生量はホルムアルデヒドのみを曝露したマウス、あるいは抗原感作とホルムアルデヒド曝露したマウスでも下垂体と線条体での産生量は非常に低く、また海馬においても曝露群と対照群とで差はみられなかった。

そこで、低濃度ホルムアルデヒド曝露と抗原感作による海馬でのNGFmRNAについて検討した。蛋白レベルの結果と同様に、対照群と比べて、80と400ppb曝露群での顕著な発現増強が見られた。2000ppbでは対照群と同程度の発現であった。

海馬を含む前額断切片についてNGFの免疫組織化学的検討を行った。対照群の海馬ではCA1領域からCA3領域にかけて、また歯状回の細胞においてNGF陽性反応が認められた。この発現パターンは、神経細胞を特異的に染色するニッスル染色の発現パターンと酷似していることから、NGFの発現は神経細胞に特に強く見られることが確認された。一方400ppb曝露-OVA(+)群では、対照群と比較して明らかなNGF発現増強が認められた。

3-5 神経—免疫軸での神経伝達物質受容体解析

RT-PCRによる半定量では、海馬と扁桃体で比較した。ドーパミン受容体D1受容体mRNAは、トルエン曝露により有意な上昇がみられた。D2受容体mRNAは、ホルムアルデヒド曝露により対照群と比較して有意な上昇が認められた。NMDA型グルタミン酸受容体サブユニット ϵ 1mRNAは、OVA刺激による有意な上昇がみられ、ホルムアルデヒド曝露により発現が上昇し、すなわちOVA刺激とホルムアルデヒド曝露の相加効果が見られた。 ϵ 2mRNAは、ホルムアルデヒド曝露では有意な低下がみられたのに対し、アレルギーモデルでは顕著に上昇した。扁桃体では、アレルギーモデルマウスへのホルムアルデヒド曝露で ϵ 1、 ϵ 2の増加、D1の増加が認められた。D2にはこの変化は認められなかった。

C3Hマウスの海馬を含む前額断切片についてNMDAR2Aの免疫組織化学的検討を行った。

400ppbホルムアルデヒド曝露したアレルギーモデルマウス海馬のNMDAR2Aは、対照群に比べて強く発現する傾向が認められた。

3-6 肥満細胞欠損マウスを用いた研究結果

1 肺胞洗浄液中での炎症性細胞の変動については、+/+マウス（肥満細胞が正常に存在している）では対照群と比べホルムアルデヒド曝露群で肺胞マクロファージの数に顕著な増加がみられた。W/Wv マウス（肥満細胞が欠損している）では、肺胞マクロファージの数には影響がみられないものの、好酸球とリンパ球においてホルムアルデヒド曝露による有意な増加が認められた。

2 脾臓細胞における Th2 タイプのサイトカインである IL-4, IL-5, IL-10 の産生では、ホルムアルデヒド曝露群と対照群とで有意な差はみられなかった。Th1 タイプのサイトカインである IFN- γ 産生量の比較でもホルムアルデヒド曝露の影響はみられなかった。

3 抗原特異的抗体価の変動について、血漿中での抗 OVA IgE 抗体価、抗 OVA IgG1 抗体価については、両系統でまったく曝露の影響は認められていない。抗 OVA IgG2a 抗体価においては、+/+ マウスでは曝露の影響は見られず、W/Wv マウスにおいてはホルムアルデヒド曝露群の方がやや増加傾向を示したが、有意差はみられなかった。

4 血漿中でのサイトカインの変動では、好酸球の活性化因子であり、アレルギー反応の増悪に関連する IL-5 については、+/+ マウスではホルムアルデヒド曝露による低下傾向がみられ、W/Wv マウスにおいては逆にホルムアルデヒド曝露群の方がやや増加傾向を示したが、ともに有意な差はみられなかった。KC ケモカインと単球、活性化した T 細胞、未熟樹状細胞などのケモカインである Th2 タイプの反応に関連する MCP-1 を測定した結果、KC 産生では+/+ マウスでの変動はなく、W/Wv マウスではホルムアルデヒド曝露による増加傾向がみられた。MCP-1 産生では、ホルムアルデヒド曝露による有意な差はみられなかったが、W/Wv マウスではホルムアルデヒド曝露による増加の傾向が認められた。

(4) 考察

アレルギー反応とは異なる過敏状態の誘導の有無について調べることを当初の目的に研究を開始した。本研究で用いた 80, 400, 2000ppb の低濃度のホルムアルデヒド曝露のみでは、呼吸器、胸腺、脾臓、血液中の免疫指標に顕著な変化はみられなかった。しかしながら、抗原の吸入感作により免疫系を活性化した状態のアレルギー性炎症モデルマウスにホルムアルデヒドを曝露するといくつかの指標において変動が認められた。2000ppb 曝露群で抗原の吸入感作を行うことにより炎症性細胞の集積が肺胞洗浄液中でみられ、400ppb と 2000ppb 曝露マウスの脾臓細胞からの MCP-1 産生の増加もみられた¹⁾。また、IL-1 β の肺胞洗浄液中の低下も認められた。これらは、いずれも濃度—依存性を示した。しかしながら、これまでに報告されたホルムアルデヒド曝露による I 型アレルギー反応が亢進する作用²⁾ については IgE 抗体レベル、Th2 タイプのサイトカイン産生レベルでは認められなかった。この理由として、ホルムアルデヒドの曝露期間、曝露様式、抗原感作条件、系統差などの違いが関与している可能性が考えられる。今回われわれが用いた C3H マウスは、環境化学、免疫学、薬物学では通常用いられ、IgE 産生系も応答性は低くない系統である。

本研究で、OVA 抗原感作したマウスに低濃度ホルムアルデヒドを曝露することで、脳内の NGF

産生が増強することを明らかにした。また、OVA抗原単独あるいはホルムアルデヒド曝露単独ではこのNGF増強は顕れないことから、免疫刺激とホルムアルデヒド曝露が複合的に作用することで、脳においてはじめて影響が顕れることが示唆された。さらに詳細に解析するために、NGF mRNAの発現を海馬で調べ、メッセージと蛋白レベルでの増強が確認できた³⁾。このNGF増強について免疫組織化学的手法を用いて再検証したところ、400ppb ホルムアルデヒド曝露とOVA刺激により、海馬においてNGF陽性反応の増強が確認できた。化学物質曝露が及ぼす影響を調べる際に、海馬のNGF発現は極めて鋭敏かつ信頼性の高い指標になる可能性が示唆された。

NGF は、末梢の交感神経の発生や中枢神経系のコリン作動性ニューロンの発生と維持、中枢神経組織の損傷修復、また、神経、免疫、内分泌間での相互作用の調節にも関与していると考えられている。ところが、BDNF においては NGF のような増強はみられなかったので、栄養因子に共通した影響ではないと考えられる。NGF については、最近、線維芽細胞やケラチノサイトのみならず T 細胞や B 細胞などのリンパ球、マクロファージ、肥満細胞、好酸球なども産生することが報告されている⁴⁾。NGF は、IL-6 産生を亢進し、TNF α 産生は抑制するとの報告もみられ、サイトカインの制御機構にも関与していることが示された。OVA を抗原として使用したアレルギー性喘息モデルマウスにおいて IL-4 や IL-5 産生の増加や IgE 産生の亢進と共に血清中、肺胞洗浄液中の NGF の増加が報告されている^{5) 6)}。また、NGF はサブスタンス P の産生を増強し、肥満細胞を活性化することにより炎症に関与し、さらに痛覚過敏や喘息にかかわる気道平滑筋の過敏反応にも関連があるという。

これまでの低濃度ホルムアルデヒドを曝露することでみられた免疫系、あるいは脳神経系の変化が化学物質特異的か否かを検討するために、低濃度トルエン曝露をおこない比較検討した。トルエンの 1 2 週間曝露は肺における炎症性細胞、中でもマクロファージ数の増加においては有意な差がみられ、サイトカインとしての IFN- γ における変動が観察された。しかしながら、アレルギーモデルマウスへのトルエン曝露においては、アレルギー反応にかかわる抗原特異的 IgE 抗体や IL-4 サイトカインでの増加はみられずアレルギー反応の増強効果はみられなかった。また、脳内海馬での NGF 産生においてもホルムアルデヒド曝露で観察されたような増加は認められなかった。今回の濃度のトルエン曝露では、ホルムアルデヒド曝露と同様な過敏状態は認められない。

NGF の発現増強は、脳が慢性的あるいは亜慢性的に変化している可能性を示している。また、NGF の発現は、*c-fos* の発現により調節を受けており、*c-fos* の発現は NMDA やドーパミン受容体の働きにより誘導されることが報告されている^{7, 8)}。そこで次に、神経伝達物質(グルタミン酸およびドーパミン)受容体 mRNA の発現量を調べたところ、400ppb ホルムアルデヒド曝露及び抗原感作により、海馬において NMDA 型グルタミン酸受容体のサブユニットやドーパミン D1 受容体 mRNA の増加が認められた。また、扁桃体では ϵ 1 mRNA、 ϵ 2 mRNA、D1 受容体 mRNA の増加が認められた。

海馬は記憶形成の部位であり、また NMDA 型受容体は記憶形成・保持に重要な働きをもつことが示唆されており、このサブユニット構成が海馬において変化したことは、脳の記憶形成機構に変化が生じた可能性を示唆している。また扁桃体は情動の中心的な部位であり、 ϵ 1、 ϵ 2、D1 の増加は、情動機能の変化の可能性を示唆すると考えられる。

今回の研究で、低濃度ホルムアルデヒド曝露により海馬の神経伝達物質受容体 mRNA の発現が大きく変動することが確認された。また、トルエン曝露の影響と OVA 刺激による変動について調べたところ、興味深い結果が得られた。トルエン曝露により D1 受容体 mRNA の発現量はホルムアルデヒド曝露よりも大きな変化が見られたが、他の D2 受容体、 $\epsilon 1$ 及び $\epsilon 2$ サブユニットの発現量はトルエン曝露の影響がみられなかった。以上のことから、ホルムアルデヒド曝露による D2、 $\epsilon 1$ 及び $\epsilon 2$ の変化はホルムアルデヒド曝露特異的である可能性が考えられる。神経伝達物質 mRNA の発現変動は、その細胞が蛋白質発現量を変化させようとした能動的な変化を反映していると考えられる。NMDA 受容体は神経系における記憶形成に主要な役割をもつと考えられており、Pa11 (2002)⁹は、MCS における化学物質に対する感受性亢進に NMDA 受容体が関与するのではいかという仮説を提唱している。今回得られた、免疫系刺激と低濃度ホルムアルデヒド曝露による海馬 NMDA 受容体サブユニット mRNA 量の変化はこの仮説を強く支持するものと考えられる。

これまでの神経伝達物質の研究から、トルエン曝露はホルムアルデヒド曝露とは異なる過敏な状態に関与する可能性が考えられるが、どちらの曝露の場合も抗原 OVA 刺激が加わることでより過敏な状態を誘導しやすいことを示唆している。

NGF はサブスタンス P の産生を増強し、肥満細胞を活性化することにより炎症に関与し、さらに痛覚過敏や喘息にかかわる気道平滑筋の過敏反応にも関連があるという報告もみられる¹⁰。しかしながら、アレルギー反応の発症に重要な肥満細胞への影響に関して、鼻粘膜や肺における肥満細胞の数に変化がみられなかったこと、肥満細胞欠損マウスと正常対照マウスとで曝露による差がみられなかったことから、肥満細胞への影響はあまりみられないと思われる。また、抗原刺激とホルムアルデヒド 2000ppb 曝露による肥満細胞欠損マウスへの影響についての解析でくしゃみ様症状に増加がみられなかったことから、C3H マウスの行動変化としてみられたくしゃみ様症状の増加に肥満細胞はあまり積極的には関与していないことが示唆された。

(5) まとめ

低濃度ホルムアルデヒド曝露により、アレルギー反応の誘導にかかわる炎症性反応の指標の増強は認められなかった。ただし、海馬内における一部の神経伝達物質の mRNA レベルでは動きがみられた。アレルギーモデルに低濃度ホルムアルデヒド曝露を併用すると、2000 ppb レベルでは炎症性の反応指標の動きに有意な変化がみられた。しかしながら、これらの変化はアレルギー反応の増悪作用とは異なっていた。特に、これまで明らかになっていなかった神経栄養因子や神経伝達物質において非常に低い曝露濃度に依存しない動きが見られたことは、脳内の他の領域でみられている反応の異常と関連して過敏な状態の誘導に関わっている可能性を示唆していると考えられる。

(6) 参考文献

1. Fujimaki H, Kurokawa Y, Kunugita N, Kikuchi M, Sato F, Arashidani K. Toxicology 2004, 197,1-13.

- 2 . Tarkowski M, Gorski P. *Int Arch Allergy Immunol* 1995,106,422-424.
- 3 . Fujimaki H, Kurokawa Y, Kakeyama M, Kunugita N, Fueta Y, Fukuda T, Hori H, Arashidani K. *Neuroimmunomodulation* 2004,11,373-375.
- 4 . Stanisz A M, Stanisz J A. *Annals of The New York Academy of Sciences* Vol.917 pp268-272 ,2000.
- 5 . Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H. *Eur J Immunol* 1998,28,3240-3251,1998.
- 6 . Aoe, L., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Manni, L. *Allergy* 1997, 52, 883-894.
- 7 . Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., R  ther, U., Wagner, E. F., Thoenen, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*1990,87,3899-3903.
- 8 . Morgan, J. I., Curran, T. *Annu. Rev. Neurosci.* 1991, 14, 421-451.
- 9 . Pall ML. *FASEB J.* 2002 16, 1407-17.
- 10 . Donnerer, J., Schuligoi, R., Stein, C. *Neurosci.* 1992, 49,693-698.