

3. 低濃度長期曝露の行動毒性への影響についての検討

3. 低濃度長期曝露の行動毒性への影響についての検討

研究協力者：櫻田 尚樹（産業医科大学・産業保健学部・保健情報科学）
 笛田由紀子（産業医科大学・産業保健学部・第一生体情報学）
 嵐谷 奎一（産業医科大学・産業保健学部・第二環境管理学）

1. 研究要旨

マウスを用いて低濃度長期ホルムアルデヒド曝露による行動毒性への影響を、アンビュロメーターを用いて自発の移所運動活性の評価と、中枢刺激薬に対する感受性亢進の有無の点から観察した。その結果、2000ppb 群においてのみコントロール群より有意に高い自発の移所運動活性を認めた。しかし中枢刺激薬として anti-depressant の bupropion を投与した場合においてはいずれの群も同様に運動活性の増加を誘発しホルムアルデヒド曝露による感受性亢進は観察されなかった。また、曝露途中から高濃度曝露群で観察されはじめたくしゃみ様行動について評価した。その結果、ホルムアルデヒド曝露濃度依存的にくしゃみ回数の増加が認められたが、卵白アルブミン感作やパラホルムアルデヒドによる高濃度前感作の影響は認められなかった。

2. 研究目的

MCSの動物モデルとして行動毒性モデルが検索手段のひとつとして検討されている。ここでは、アンビュロメーターを用いて、曝露期間中の自発運動活性の一種である移所運動活性の変化と3ヶ月曝露終了時の中枢神経刺激薬に対する感受性亢進の有無について検討し、ホルムアルデヒド長期低濃度曝露の行動毒性への影響について検討した。さらに曝露途中から観察され始めてくしゃみ様行動の定量化を行い、MCSに関する指標としての可能性について検討した。

3. 研究方法

(1) 移所運動活性の測定

マウス（一群10匹）へ曝露開始1ヶ月、2ヶ月の時点で無刺激の自発運動活性を、3ヶ月終了時点において中枢刺激薬として anti-depressant の bupropion hydrochloride (10mg/kg) の皮下投与を行い移所運動活性を、それぞれ群大式アンビュロメーターを用いて測定した。3ヶ月終了時点の測定においては、ルームコントロールとして SPF 環境下で飼育したマウスについても同様に検討を行った。なお、測定は明期の午前10時頃から午後4時頃までの時間に行った。アンビュロメーターはマウスを入れるバケツ型の容器の底の中心に釘を立て、中のマウスが移動することでバケツが傾くのをマイクロス

イチで検知して数値化する簡単な構造で、動物の自発運動活性のうち移所運動活性を評価する機器である。

(2) くしゃみの評価

前述のように曝露中にくしゃみ様の行動が特に高濃度曝露群で観察されたので、3ヶ月曝露終了時点で定量的に評価した。すなわち、移所運動活性同様に明期に、それぞれのマウスをアクリルボックスにいれ、目視でそれぞれ15分ずつ行動とくしゃみ様の発声を聞きながら観察した。

(3)

統計解析は一元配置分散分析により群間の相違の有無を検定した後、有意差を認める場合は、Dunnett法により0ppbコントロール群に対する多重比較検定を行った。

4. 研究結果

(1) 移所運動活性

図1に曝露一ヶ月時点における移所運動活性の経時変化を示す。一般にマウスは測定器にセットされた時点で環境変化に順応するために探索行動をとり運動活性は一時的に高まるが一時間程度で落ち着いてくる。図1に示すようにこの順応反応は一ヶ月の時点ではいずれの濃度群においても相違は認めなかった。図2には最初の一時間のカウント合計を示しているが、これも相違は認めなかった。

図3には曝露二ヶ月時点での移所運動活性の経時変化を示す。この時点では、2000ppb群において、機器に入れたときの探索行動が他の群より高値を示しその後も一時間にわたって高値のまま推移した。したがって図4に示すように最初の一時間の合計カウントは、分散分析の結果、群間において差違を認め、2000ppbだけがコントロール群より有意に高いカウント数を示した。図5に3ヶ月曝露終了時点での移所運動活性の変化を示す。今回はマウスを測定機器に入れて最初30分間の順応時間をおいた後に、bupropion (10mg/kg) を皮下投与し引き続き一時間の行動量の変化を観察した。その結果、最初の30分間の順応期間中の自発運動活性は先の2ヶ月時点と同様に2000ppb群において高い値を示した。bupropion刺激後はいずれの群も運動量の増加を認めたが、その経時変化はいずれの群でも同様であった。図6、7にそれぞれ順応時間中の30分間のカウント合計とbupropion刺激後一時間のカウント合計をそれぞれ示しているが、いずれも群間において相違を認め多重比較検定の結果、2000ppb群のみが0ppbコントロール群より高値を示した。またルームコントロールにおいたマウスは0ppbコントロール群とほぼ同様の反応を示しとくに相違を認めなかった。

(2) くしゃみの回数

曝露終了時点でのくしゃみの回数は図8に示すように、曝露濃度の増加にしたがって

増加する傾向を認め、多重比較検定の結果、2000ppb 群のみが 0ppb コントロール群より高値を示した。実験にはチャンバー内におけるホルムアルデヒド吸入曝露前にパラホルムアルデヒド溶液 20mg/kg を1回腹腔内投与したB群(PFA+)や免疫学的検索のために卵白アルブミンで免疫した群(OVA+)を設けているが、図9に示すようにこれらの処置だけではくしゃみを誘導することはなく、またホルムアルデヒドチャンバー内曝露によって誘発されるくしゃみ回数に影響を及ぼさなかった。すなわちくしゃみの回数はホルムアルデヒドの曝露濃度により依存して増加した。

5. 考察

移所運動活性の測定において、まず3ヶ月曝露終了時点での観察より実験曝露群の0ppb コントロールと特定病原体除去 (specific pathogen free ; SPF) 環境下で飼育したルームコントロールに有意な反応の相違を認めなかったことより、今回のチャンバーによる3ヶ月長期曝露はマウスの飼育環境に非特異的なストレスを加えるものでなかったことが確認された。

MCSの動物モデルとして行動的増感現象(behavioral sensitization)の可能性が示唆され、平面上での運動活性の指標として移所運動活性の変動などが報告されている。今回アンビュロメーターにて曝露途中の2ヶ月から2000ppb 群においてのみ自発の移所運動活性の増加を観察した。また中枢神経系刺激薬として bupropion を投与した結果いずれの群でも移所運動活性の増加は観察されたが、その増加の傾向はいずれの群においても同様であった。次に述べるくしゃみの変化や、他項で述べる中枢神経の反応の変化とくしゃみの関連などを考慮すると、低濃度では反応の変化が全く認められず2000ppb だけで観察された移所運動活性の増加をMCS発症による変化としてとらえるかについては慎重な検討を要すると思われる。この系の反応は個体差も非常に大きく、今後匹数を増やすとともに同一個体による種々のマーカーの検索の連携を行い再検討を行う必要があると思われる。

くしゃみはヒトのアレルギー性鼻炎でも典型的に認められる症状のひとつであり鼻過敏性を示すものである。今回、卵白アルブミン(OVA)の腹腔内投与による全身感作やB群に示したパラホルムアルデヒド 20mg/kg 1回腹腔内投与を行っていないチャンバー内低濃度ホルムアルデヒド曝露単独でも図9に示すような濃度依存的なくしゃみの増加を観察した。このことはホルムアルデヒド長期吸入曝露がきわめて低濃度から鼻の過敏性を亢進させたものと考えられる。しかしながらこのくしゃみはOVA全身感作(OVA+)やパラホルムアルデヒド感作(PFA+)による影響を受けなかった。前述の中枢神経機能の解析においてもくしゃみを有するマウスにおいては特異的な変化を有する可能性を示唆されており、この反応がMCSのモデルとなりうるのか今後匹数を増加し再検討を行う、加えて点鼻による鼻粘膜への局所感作とこれらの症状の関連を行うなどして検討を重ねていく必要があると思われる。

6. Abstract

Behavioral changes after repeated formaldehyde exposure in mice

Naoki Kunugita, Yukiko Fueta, Keiichi Arashidani

(School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan.)

Investigators reported that rodents sensitized to some chemicals demonstrate an augmentation in behavioral activity in response to a subsequent challenge of psychostimulants in MCS models. In this experiment, the first behavioral endpoint examined was a spontaneous activity after repeated formaldehyde exposure in mice. The second behavioral response examined was cross-sensitivity to anti-depressant-induced activity after formaldehyde exposure in mice. Spontaneous locomotion activity in the groups under the doses of 400ppb was not altered during the exposure period. In the group of the 2000ppb, spontaneous locomotion activity increased after two months or later. In the second observation, all groups demonstrated a significantly higher response to administration of bupropion (10mg/kg i.p.) as anti-depressant. However, bupropion did not show differences in their behavioral activity between the control and the exposure groups. These results showed that formaldehyde exposure did not induce chemical-sensitization under this condition.

We also observed that frequency of sneeze in each animal increased dose-dependently, and recognized possible relationship between the frequency of sneeze and the neuronal information processing described previously in this report. It is necessary to examine further relationships between the sneeze and other phenomena.