

## ホルムアルデヒド長期曝露マウス嗅上皮 OMP(olfactory marker protein)免疫染色

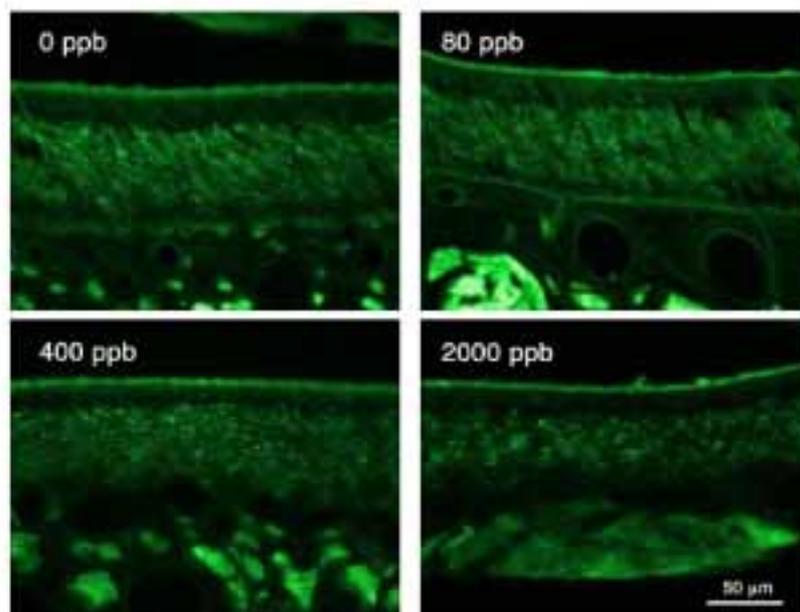


図3 嗅粘膜を嗅細胞のマーカである OMP により免疫細胞化学的に染色した蛍光顕微鏡像。OMP 陽性細胞は FITC (緑色) で標識されている。

## ホルムアルデヒド長期曝露マウス 嗅上皮の電子顕微鏡写真

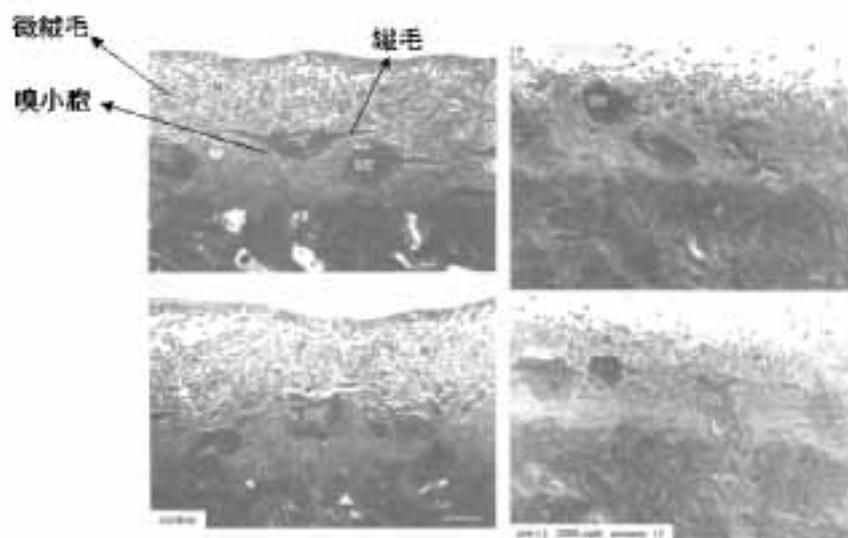
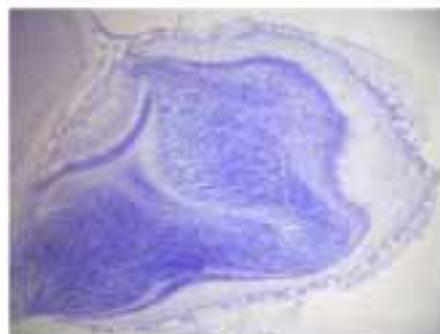


図4 マウス嗅上皮の電子顕微鏡像  
 (左) 無前感作 0ppb マウスの嗅上皮表面 たくさんの微絨毛 (MV) が観察される。嗅小胞 (OV) および繊毛 (矢印) が認められる。  
 (右) 前感作 2000ppb マウスの嗅上皮表面 微絨毛の長さが短くなっている。繊毛を有する嗅小胞が存在するが、空胞を有するものが多い。スケールバーは 1000nm を示す。

## 嗅球の細胞構築



嗅神経層(ONL)

糸球体層(GL)

外叢状層(EPL)

僧帽細胞層(ML)

内叢状層(IPL)

顆粒細胞(GRL)

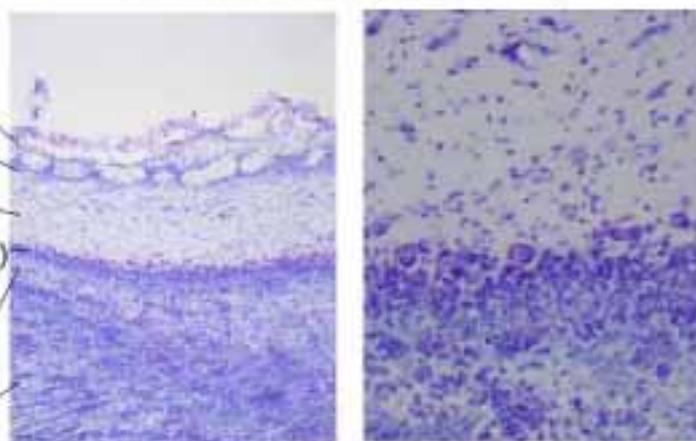


図5 嗅球の構造 嗅球の細胞構築像  
詳細は本文参照

## 嗅球ニューロンのゴルジ像

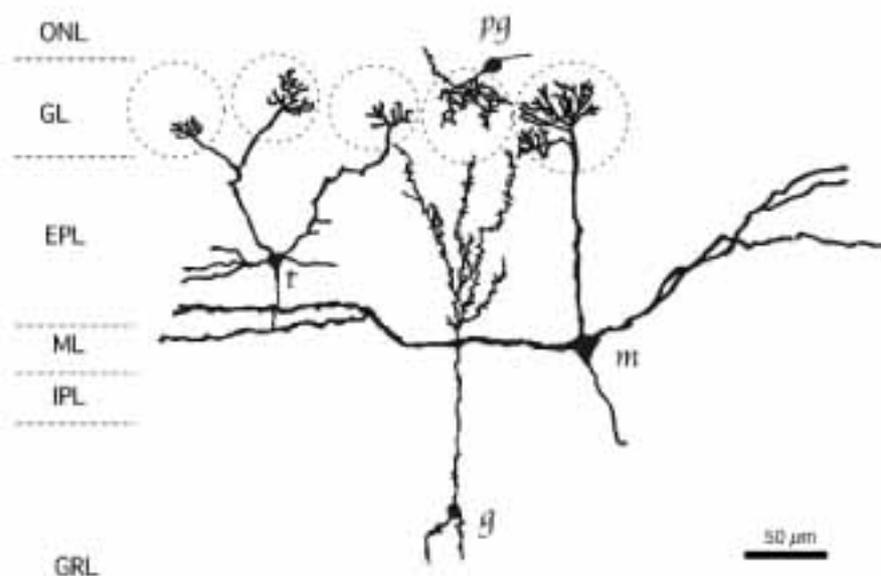


図6 嗅球の構造 嗅球のゴルジ染色(銀)像  
詳細は本文参照

## 嗅球神経回路

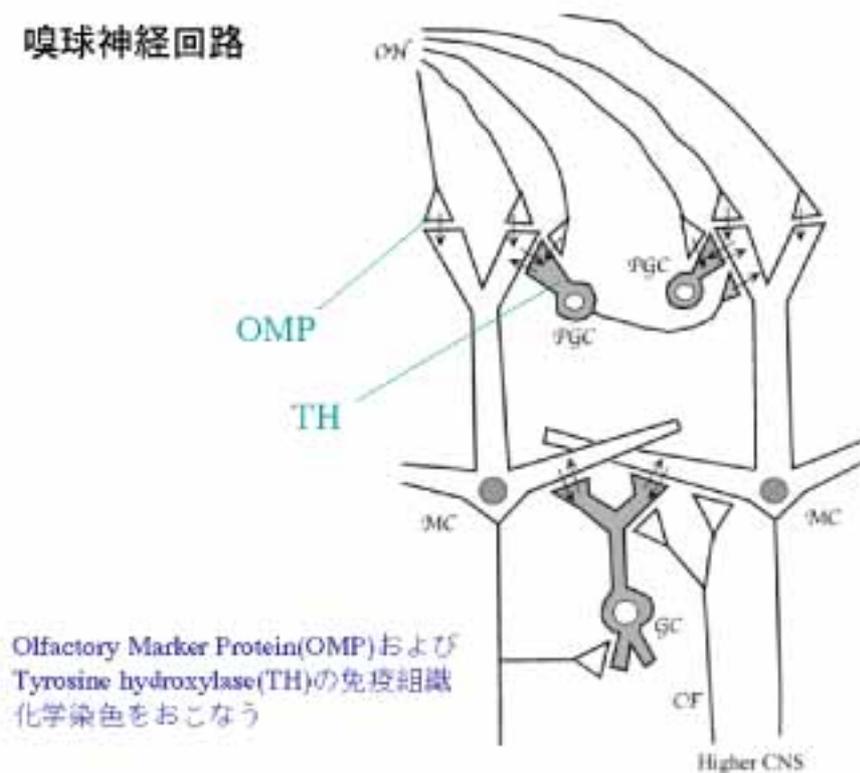


図7 嗅球の構造 嗅球の神経回路  
詳細は本文参照

## ホルムアルデヒド長期曝露マウス嗅球の嗅神経の分布(OMP免疫染色)

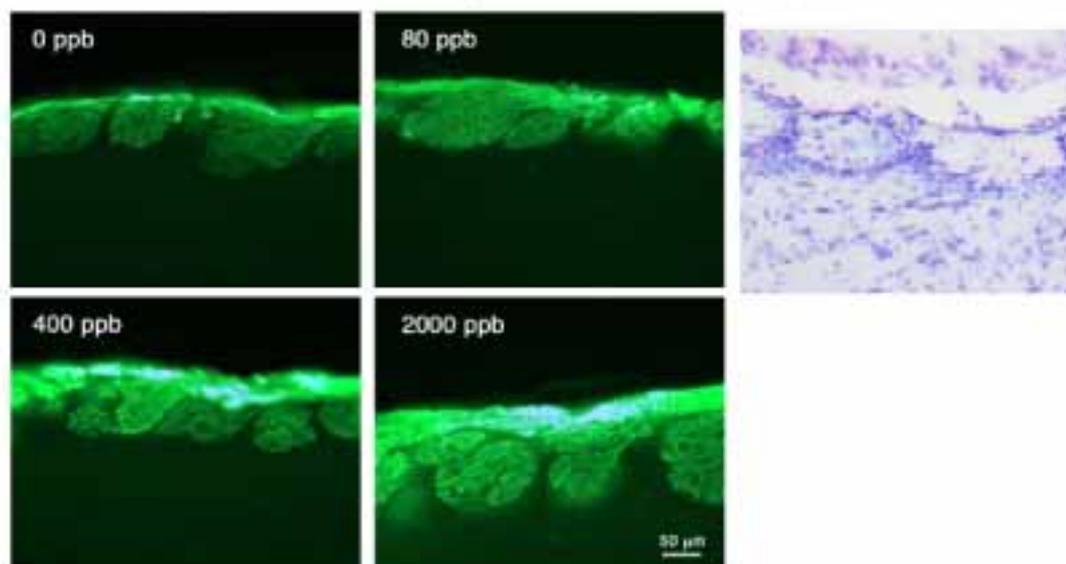


図8 Olfactory marker protein (OMP)の抗体をもちいて免疫細胞化学的に染色したマウス嗅球。各曝露群で染色性に顕著な差は認められなかった。右はニッスル染色像で示される嗅球の糸球体層。

## 嗅球内に存在するTH陽性ニューロン

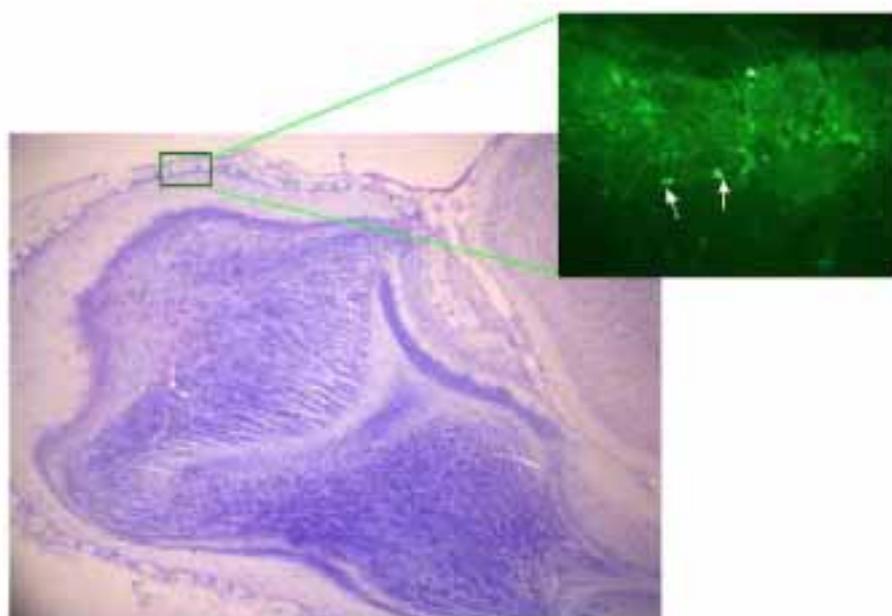


図9 TH抗体を用いて糸球体に存在するTH陽性ニューロンを染色した像を右図矢印で示す。左はニッスル染色した嗅球。

## ホルムアルデヒド長期曝露マウス 嗅球のTHニューロン

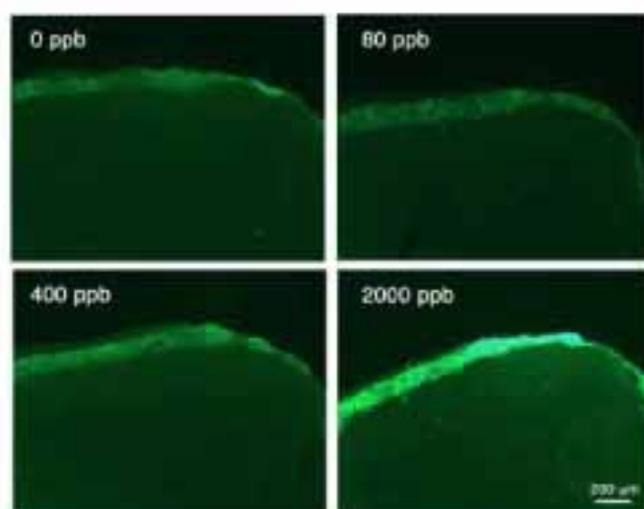


図10 TH抗体を用いて免疫化学染色したマウス嗅球の低倍率写真。THの染色性およびその数が曝露量で差が認められた。

## ホルムアルデヒド長期曝露マウス 嗅球のTHニューロン

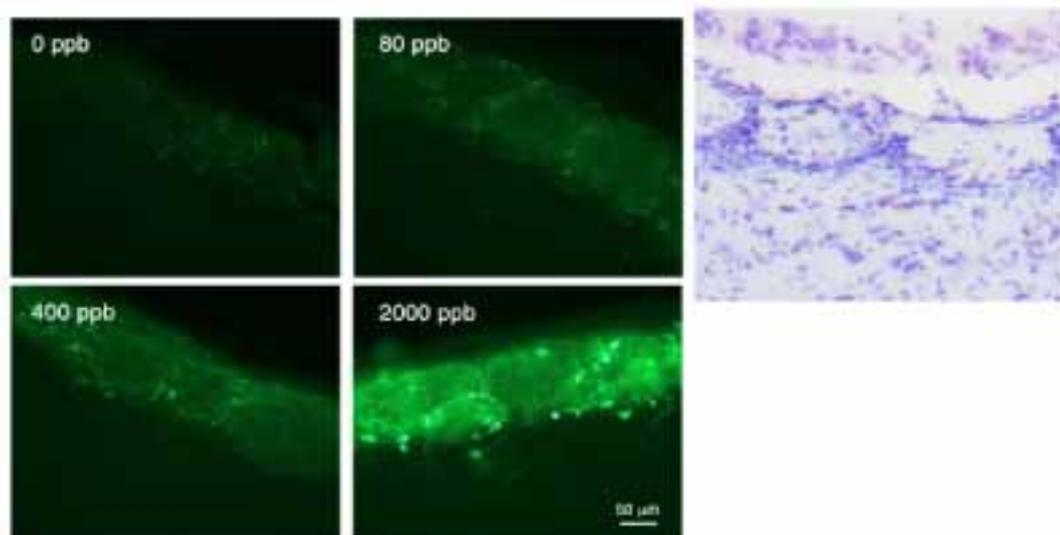


図1-1 TH抗体を用いて免疫化学染色したマウス嗅球糸球体の高倍率写真。右はニッスル染色像で示される嗅球の糸球体層。THの染色性およびその数が曝露群で差が認められた。曝露濃度依存的に染色性が高まる。

表 1

観察を終了した実験動物

1 . 嗅上皮

光学顕微鏡観察

C 3 H マウス

	前感作群	無感作群	計
0 ppb	2	4	6
80 ppb	2	4	6
400 ppb	2	4	6
2000 ppb	2	4	6
別室群		2	2

C 5 7 B L マウス

	前感作群	無感作群	計
0 ppb		2	2
80 ppb		2	2
400 ppb		2	2
2000 ppb		2	2

電子顕微鏡観察

C 3 H マウス

	前感作群	無感作群	計
0 ppb	3	3	6
80 ppb	3	3	6
400 ppb	3	3	6
2000 ppb	3	3	6
別室群		3	3

2 . 嗅球

光学顕微鏡観察

マウス ( 無感作群 )

	C3H	C57BL	計
0 ppb	2	2	4
80 ppb	2	2	4
400 ppb	2	2	4
2000 ppb	2	2	4

表 2

低濃度ホルムアルデヒド長期曝露による変性嗅上皮の出現率  
C 3 H マウス

	前感作群	無感作群	計
0 ppb	0/3	0/3	0/6
80 ppb	0/3	0/3	0/6
400 ppb	0/3	0/3	0/6
2000 ppb	1/3	2/3	3/6
別室群		0/3	0/3

### 3. 低濃度ホルムアルデヒドの長期暴露が視床下部 下垂体 副腎軸に及ぼす影響

佐々木文彦(大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)  
研究協力者  
櫻田 尚樹(産業医科大学産業保健部)  
小川 和重(大阪府立大学大学院)  
塚本 康浩(大阪府立大学大学院)  
アミン・ハッサニン(大阪府立大学大学院)  
桑原 佐知(大阪府立大学大学院)  
ドゥイ・ケスマ・サリ(大阪府立大学大学院)

#### (1) 研究要旨

低濃度ホルムアルデヒドの長期暴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)ニューロンと下垂体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化学法、計量計測法、RT-PCR 法とラジオイムノアッセイ法により解析した。動物は、昨年度採材した A 群(C3H-OVA 群)と B 群に加えて新たに採取した昨年の A 群と同処理の C3H 群(C 群:C3H-OVA 群)、アレルギーモデル群(D 群:C3H+OVA 群)と C57BL 群(E 群)からなる。

A 群の CRH 免疫陽性ニューロン数は暴露量依存的に増加し、400 と 2000ppb 暴露群では対照群の 2 倍以上に増加していた。下垂体の ACTH 免疫陽性細胞数は又、暴露量依存的に増加し、400 と 2000ppb 暴露群では対照群の 2 倍以上に増加していた。半定量的 RT-PCR 法による A 群の下垂体内 ACTH-mRNA の発現量はホルムアルデヒド暴露により高くなっていた。C、D、E 群の半定量的 RT-PCR 法による下垂体内 ACTH-mRNA の発現量は、次のような結果を得た：C 群では暴露により高くなっていた；D 群では対照群の発現量は A と C 群より増加し、80 と 400ppb では更に増加するが、2000ppb では対照より減少した；E 群では、D 群に似た結果を得た。

血漿中コルチコステロン濃度は、C3H(OVA-)群の 80 と 400ppb 群で増加していた。

現状の解析結果より、低濃度ホルムアルデヒドの長期暴露による下垂体の ACTH 細胞の形態学的変化は、分子生物学的方法と生化学的方法により支持されると考えられる。

このように、A 群では、CRH ニューロンと ACTH 細胞は 400ppb 以上のホルムアルデヒド暴露により反応し、アレルギーモデル群ではホルムアルデヒド暴露によるストレスに対応できない状態になっている可能性がある。

#### (2) 研究目的と経過

平成 12 年度の研究では、低濃度ホルムアルデヒドの長期暴露が視床下部 下垂体 副腎軸に対して如何なる影響を及ぼすかを主に形態学的に検討した(平成 12 年度本態性多種化学物質過敏状態の調査研究報告書)。副腎には形態学的変化がみられなかった

ので、本年度は A 群の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)免疫陽性ニューロン数と下垂体の副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)免疫陽性細胞数を計量計測した。更に、血漿中のコルチコイド濃度を測定した。新たに採材した今年の A 群と同処理をした C3H 群(C 群: C3H-OVA 群)、アレルギーモデル群(D 群 C3H + OVA 群)と C57BL 群(E 群)については ACTHmRNA のみを計測した。

このように、平成 13 年度の研究の目的は平成 12 年度に行った研究結果の再現性を研究すると共に、アレルギー性炎症を誘発したマウスの視床下部 下垂体 副腎軸が低濃度ホルムアルデヒドにより如何に反応するかを免疫組織化学、計量計測、RT-PCR とラジオイムノアッセイ法を用いて検討することである。

形態学的と分子生物学的解析は佐々木が、生化学的解析は櫻田が行った。

### (3) 研究方法

#### 1) 視床下部室旁核の CRH 免疫陽性細胞

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、パラフィンに包埋した。光学顕微鏡用のミクロトームで室旁核を前方から後方に向かって 10  $\mu\text{m}$  の連続切片とし、ガラススライドに塗付した。切片をキシロールで脱パラフィン後、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(DAB; 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 枚間隔で選び、免疫陽性細胞数( $\sum N_i$ )を数えた。それぞれの群ごとに数えた切片の数は、 $7.0 \pm 0.8$ (A-0 群)、 $7.2 \pm 0.8$ (A-80)、 $7.8 \pm 1.3$ (A-400)、 $7.2 \pm 1.1$ (A-2000)である。室旁核中の CRH 免疫陽性細胞数(T)は、下記の公式に代入して求めた。

室旁核中の CRH 免疫陽性細胞数(T) =  $n/i \times \sum N_i$  (それぞれの動物の CRH 細胞を含む全切片数: n; 選択した切片数: i)。

#### 2) 下垂体前葉の ACTH 細胞

##### 2-1) 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、キシロールで脱パラフィン後、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染色し、光学顕微鏡で観察した。2次元画像解析装置 Cosmozone-1SB を用いて下垂体の ACTH 免疫陽性細胞数を計測した。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 倍の顕微鏡組織像を投影し、画面上に存在する核をもつ免疫陽性細胞と核の数を数えた(図 1)。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。

ACTH 免疫陽性細胞の出現率 = 免疫陽性細胞数 / 核数  $\times 100$ 。下垂体前葉細胞の絶対数(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)。

ACTH 免疫陽性細胞の数 = T × ACTH 免疫陽性細胞の出現率。

#### 2-2) 半定量的 RT-PCR 法による下垂体内 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 °C の冷凍庫中で保存した。組織を TRIZOL (Life Technologies, Inc., USA) 中でホモジナイズし、total RNA を抽出した。2 µg 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 を合成した。この 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 の発現量の測定を行った。なお、得られた PCR 産物は、DNA シーケンスによりマウス ACTH のものであることを確認している。

#### 3) Corticosterone の測定

Corticosterone の測定は、解剖時採取した血漿を -80 °C で保存した後、ICN Immuchem Double Antibody Corticosterone 125I RIA Kit for Rats and Mice を用いて、ラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。

#### (4) 研究結果

##### 1) A 群 (C3H マウス OVA-)

視床下部の室旁核内の CRH 陽性細胞数

結果を表 1 と図 2 に示した。CRH 免疫陽性細胞は、ホルムアルデヒド暴露量依存的に増加した。400ppb と 2000ppb 群では対照群の約 2 倍にまで増加していた。

下垂体の ACTH

##### a. 下垂体の体積

80ppb、400ppb、2000ppb 各群とも対象群のものと有意の差はなかった (表 2)。

##### b. ACTH 免疫陽性細胞の出現率と数

出現率と数は共に暴露量依存的に増加した (表 2)。特に、2000ppb 群では数の増加は著しい。

##### c. 半定量的 RT-PCR 法による下垂体内 ACTH-mRNA の発現量

A 群では、暴露量により発現量が高くなっていた (図 3)。

##### 2) C 群 (C3H マウス OVA-)

下垂体の ACTH

半量的 RT-PCR 法による下垂体内 ACTH-mRNA の発現量

A 群同様、暴露量により発現量が高くなっていた (図 3)。

血清中のコルチコステロン濃度

対照群のコルチコステロン濃度に比べて、80ppb、400ppb 群のものは有意に増加していた (図 6)。

### 3) D 群 (C3H 系マウス OVA+)

#### 下垂体の ACTH

##### 半量的 RT-PCR 法による下垂体内 ACTH-mRNA の発現量

対照群は A と C 群に比べて多くなり、80 と 400ppb 暴露で更に増加したが、2000ppb では対照群以下まで減少した (図 4)。

##### 血漿中のコルチコステロン濃度

本対照群の値と比較して、全ての暴露群で有意差はなかったが、C3H(OVA-) 群の対照と比べて、2000ppb 暴露群では有意に増加していた (図 6)。

### 4) E 群 (C57BL 系マウス)

#### 下垂体の ACTH

##### 半定量的 RT-PCR 法による下垂体内 ACTH-mRNA の発現量

E 群では、A 群、C 群の結果とは逆に投与量依存的に ACTH-mRNA の発現量は減少していた。

80ppb 群では、対照群より高いが、400ppb 群では、対照群のものより低い (図 5)。

##### 血清中のコルチコステロン濃度

対照群のコルチコステロン濃度に比べて、2000ppb 群で有意に減少していた (図 6)。

## (5) 考察

平成 12 年度に採材した A 群の視床下部と下垂体を計量計測法により検討した結果、低濃度ホルムアルデヒドの長期暴露が CRH 免疫陽性ニューロンと ACTH 免疫陽性細胞の数を増加させていることが明白となった。即ち、これら免疫陽性細胞が増加することにより正常値以上の CRH と ACTH が分泌されていると考えられる。一方、副腎は形態学的な変化は示さなかった (平成 12 年度報告書) が、コルチコステロンの産生・分泌は増加していると考えられる。A 群と C 群の結果より、上述の様な ACTH 細胞の形態学的変化は分子生物学的や生化学的方法により支持されたと考えられる。

13 年度に採材した C、D、E 群の視床下部と下垂体を免疫組織学的並びに計量計測学的手法で検討しないと結論を得ることが出来ないが、下垂体の ACTH-mRNA 発現量の結果から次の事が考えられる： 本実験は再現性がある； アレルギーモデル群では対照群で既に下垂体の ACTH-mRNA 発現量が増加し、2000ppb 暴露のストレスに対して視床下部 下垂体 副腎軸が対応できない状態になっている可能性が考えられる； 低濃度ホルムアルデヒド暴露にたいする視床下部 下垂体 副腎軸の反応はマウスの系統間で差があるように思われる。

PCR の所見に関しては、現在 -アクチンやその他のマーカーとなる遺伝子の発現量との関連性を検討中である。