

5 . 低濃度長期ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響についての検討

研究者：藤巻秀和（独立行政法人国立環境研究所）
研究協力者：黒河佳香（独立行政法人国立環境研究所）
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）研究要旨

昨年度、抗原を吸入感作したマウスの脳において、炎症性のサイトカインレベルでは顕著な差はみられなかったが、神経成長因子であるNGFにおいては低濃度ホルムアルデヒド曝露による顕著な増加が認められた。今年度は、抗原の吸入感作によるアレルギー性炎症モデルを作成して低濃度ホルムアルデヒド曝露のNGF産生に関連する機能への影響について検討した。その結果、海馬におけるNGF mRNAの発現の増強は低濃度において顕著であり、蛋白レベルの結果と合致した。免疫組織化学的検索でも、海馬においてNGF陽性反応の顕著な増強が確認できた。血漿中と肺胞洗浄液中のNGFにおいては、脳内とは逆に、ホルムアルデヒド曝露による有意な低下が認められた。

次に、免疫したマウスへの曝露により脳の情報伝達が恒常的に変化した場合、神経伝達物質受容体の遺伝子発現量に変化があらわれるという仮説をたて、海馬及び扁桃体のNMDA型グルタミン酸受容体(1, 2 mRNA)、ドーパミン受容体(D1, D2 mRNA)のmRNA発現量を半定量的PCR法により測定した。海馬において、ホルムアルデヒド曝露(400 ppb)により1増加と2低下が認められ、またD1, D2の増加傾向もみられた。扁桃体では、1, 2, D1の増加が認められた。海馬において1, 2の構成が変化したことは、記憶形成機構に変化が生じた可能性を示唆しており、また扁桃体における1, 2, D1の増加は、情動機能の変化の可能性を示唆している。

（2）研究目的

MCSの発症と極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重要である。そこで、低濃度ホルムアルデヒド曝露の免疫系への影響と抗原感作により誘導される即時型、あるいは遅発型のアレルギー反応との差異や関連について明らかにすることを目的とした。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る。これまでは低濃度ホルムアルデヒド曝露によるsensitizationとアレルギー性炎症との関連について明らかにするために、ホルムアルデヒド曝露と抗原のエアロゾル投与とを行い、脳内、呼吸器、脾臓、血中におけるサイトカイン、抗体価の変動について比較検討した。また、脳組織のNGF産生が顕著に低濃度ホルムアルデヒド曝露により増加することを明らかにした。本年度は、昨年度と同様の濃度でホルムアルデヒド曝露を行い、呼吸器を介した抗原エアロゾル感作によるアレルギー性炎症モデルで、海馬、扁桃体、及びNGF産生に関連する指標についてより詳細に検討した。

(3) 研究方法

1) 実験動物

8週齢の雌 C3H/HeN (日本チャールスリバー) マウスを購入し、2週間馴化後10週齢より曝露実験に供した。ホルムアルデヒドの曝露は、昨年同様2000 ppb、400 ppb、80 ppb、および0 ppb (コントロール) 群の4群で12週間行った。曝露の詳しい条件については、曝露方法の報告を参照のこと。

2) アレルギー性炎症モデルの作成

抗原の吸入感作を繰り返すことにより肺への炎症性細胞の集積と抗原特異的 IgE 抗体産生増強を示すマウスモデルを作成した。まず、ホルムアルデヒド曝露前に10 µg/マウスの濃度で卵白アルブミン(OVA)を2 mg alum とともに腹腔内投与し、以後ホルムアルデヒド曝露期間中 OVA のみのエアロゾル感作を3週間に1回の割合で行った。最終抗原投与の1週間後、ネブタール麻酔下で肺胞洗浄液の採取、脳組織の採取と採血を行った。

3) 炎症性細胞の算定とサイトカイン・神経成長因子産生の測定

肺胞洗浄液中の炎症性細胞の集積については、洗浄液を遠心後に細胞数を算定しサイトスピン標本を作成し、ディフクイック (国際試薬) で染色して検索した。肺胞洗浄液中、血漿中のサイトカイン・神経成長因子の産生量について、monocyte chemotactic protein (MCP)-1, KC (Endogen, R&D), Substance P (Assay Designs, Inc.) と nerve growth factor (NGF) (Promega) の ELISA キットを用いてそれぞれ測定した。

4) 海馬の免疫組織化学

脳組織を摘出後、粉末ドライアイスにて凍結した。クライオスタット下 (-20 °C) で厚さ12 µm の前額断切片を作成した。抗マウス NGF 抗体を用い、免疫組織化学的検査を行った (0 ppb 曝露群、400ppb 曝露群各3例)。

5) RT-PCR による神経伝達物質受容体 mRNA 発現量の半定量

脳組織を摘出後、粉末ドライアイスにて凍結した。クライオスタット下 (-20 °C) で厚さ35 µm の前額断切片を作成し、海馬および扁桃体の組織片を回収し、それぞれの total RNA を抽出した (0 ppb 曝露群、400ppb 曝露群各5例)。各サンプルの NMDA 型グルタミン酸受容体 (1, 2 mRNA)、ドーパミン受容体 (D1, D2 mRNA) の mRNA を RT-PCR 法により半定量した。半定量では、PCR 産物を2%シナガロスゲルで電気泳動し、電気泳動ゲル撮影/解析システム EDAS 290 (Kodak) により蛍光強度解析を行った。400 ppb 曝露-OVA(+)群と0 ppb 曝露-OVA(+)群のサンプル (計12個) を同時に PCR、電気泳動および解析した。

6) 統計処理

測定データは平均値 ± SE で表示し、全体の分散分析と個々の対照群と曝露群間の有意差の検定は、それぞれ ANOVA と Dunnett による検定で行った。

(4) 結果

1) 海馬における NGF mRNA の発現

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 NGF mRNA 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 400 ppb 曝露群での顕著な発現増強が見られた(図 1)。2000 ppb では対照群と同程度の発現であった。デンシトメーターにおける解析でも同様の結果を示した。

2) 肺胞洗浄液と血漿中のケモカイン・神経ペプチドの解析

低濃度ホルムアルデヒド曝露と抗原感作により脳内における NGF 産生が顕著に増加したので、肺胞洗浄液中における NGF 産生について検討した。その結果、ホルムアルデヒド曝露のみで抗原感作していないマウスでは、ホルムアルデヒド濃度依存的な増加傾向がみられたが、有意な差ではなかった(図 2 a)。一方、抗原感作を行いホルムアルデヒド曝露したマウスでは、80 と 400 ppb 曝露で顕著に抑制が認められ脳内において見られたパターンと対象的な結果であった(図 2 b)。つぎに、血漿中での NGF 産生を調べるとホルムアルデヒドのみの曝露群では対照群との差はみられなかった(図 3 a)が、抗原感作を行いホルムアルデヒド曝露したマウスでは、400 ppb 曝露で顕著に抑制がみられ、80 ppb 曝露群でも低下した(図 3 b)。

昨年度、肺胞洗浄液中の 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。ところが、抗原感作したマウスからの脾臓細胞を *in vitro* で抗原刺激したときには、この Th2 タイプの誘導にかかわる MCP-1 の産生は、ホルムアルデヒド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。そこで、血漿中の MCP-1 産生について検討した。その結果、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 では有意な低下であった(図 4 a)。しかしながら、抗原感作したマウスへのホルムアルデヒド曝露は、低下傾向がみられたのみである。いずれのホルムアルデヒド濃度でも、MCP-1 産生の増加はみられなかった(図 4 b)。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は、ホルムアルデヒド濃度依存的な増加がみられた(図 5 a)。しかしながら、抗原感作とホルムアルデヒド曝露したマウスでは大きな変動はみられなかった(図 5 b)。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(図 6 a)。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(図 6 b)。

3) 免疫組織化学における、ホルムアルデヒド曝露による海馬 NGF の発現増強の検証

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(図 7)。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(図 7 a)。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 400 ppb 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(図 7 b)。また、今回は特に詳細な検討は行っていないが、大脳皮質など海馬以外の部位でも、ホルムアルデヒド曝露および OVA 刺激により NGF 発現は増強している傾向がみられた。

4) RT-PCRによる神経伝達物質受容体 mRNA 発現量の半定量

RT-PCRによる半定量では、400 ppb 曝露-OVA(+)群と0 ppb 曝露-OVA(+)群を海馬と扁桃体で比較した(図8および9)。400 ppb 曝露及びOVA刺激により、海馬における1は160.0%に増加していた($p<0.001$, by one way ANOVA)(図8)。2は約80.0%に低下していた($p<0.001$, by one way ANOVA)。またD1の若干の増加(約115.1%、 $p<0.01$)、D2の増加傾向もみられた(111.3%)。扁桃体では、1の増加(約128.5%、 $p<0.01$)と2の増加(約132.1%、 $p<0.001$, by one way ANOVA)、D1の増加(124.4%、 $p<0.001$)が認められた(図9)。D2の変化は認められなかった(107.6%)。

(5) 考察

これまでに我々は、OVA抗原感作したマウスに低濃度ホルムアルデヒド(80または400ppb)曝露することで、脳内のNGF産生が増強され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。今年度はさらに詳細に解析するために、NGF mRNAの発現を海馬で調べた。その結果、80と400 ppbの濃度でNGF mRNAの発現増強が認められ、メッセージと蛋白レベルでの増強が確認できた。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(Hengerer et al., 1990; Morgan and Curran, 1991)。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。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である1 mRNAの増加、2 mRNAの低下、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1 mRNA、2 mRNA、D1受容体mRNAの増加が認められた。

本研究におけるmRNA発現量の変化だけで、脳の機能的変化を直接説明することは難しい。しかし、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、1、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mRNA半定量の結果から、NGF以外にも神経伝達物質mRNAの発現が変化していることが示された。すなわち、それ自身では影響を及ぼさないレベルの極めて低濃度の化学物質曝露であっても、抗原感作と組み合わせることで脳が分子レベルで明らかに影響を受けていることが確認された。

本年度の脳以外の部位での検索では、抗原感作とホルムアルデヒド曝露したマウスの肺胞洗浄液中と血漿中のNGFは、400 ppbの濃度で有意な低下を示した。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は血清中、肺胞洗浄液中のNGFの増加が報告されており(Aloe et al., 1997)、低濃度ホルムアルデヒド曝露が抑制的に作用したと考えられる。炎症との関連では、NGFの増加は、proinflammatoryサイトカインであるIL-1 β とTNF- α の増加と相関がみられ

ており (Gadient et al., 1990) 我々の昨年度のBAL中におけるIL-1 β 、TNF- α の低下と今年度のNGFの低下の結果とが負の方向に調節されているようである。しかしながら、サイトカインの抑制は2000 ppbで顕著であり、NGFの抑制は400 ppbをピークとしてみられており、その機構は異なる可能性もある。また、これらのホルムアルデヒド曝露による種々の因子の抑制と2000 ppbでの炎症性細胞の有意な増加との関連については不明である。これまでの結果をまとめると、脳内でのNGF産生は抗原感作とホルムアルデヒド曝露の併用により増強が認められた。肺胞洗浄液や血漿中ではホルムアルデヒド曝露のみでNGFとSubstance Pの増加の方向が示唆されたが、抗原感作とホルムアルデヒド曝露の併用によりNGF産生は有意に抑制された。

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報告もみられる (Donnerer et al., 1992)。そこで、つぎに肥満細胞欠損マウスを用いて低濃度ホルムアルデヒドの影響について検討した。

(6) 参考文献

Aoe, L., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Manni, L. 1997. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 52, 883-894.

Donnerer, J., Schuligoi, R., Stein, C. 1992. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor *in vivo*. *Neurosci.* 49,693-698.

Gadient, R. A., Cron, K. C., Otten, U. 1990. Interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 117, 335-340.

Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., Rüther, U., Wagner, E. F., Thoenen, H., 1990. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by *c-fos*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87,3899-3903.

Morgan, J. I., Curran, T., 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.* 14,421-451.

(7) Abstract

To clarify the effects of low levels of formaldehyde (FA) inhalation on the neuro-immune interactions, C3H/He mice were exposed to 0 (controls), 80, 400 and 2000 ppb formaldehyde for 12 weeks. In another experiment, using a mouse model of allergic inflammation the exposure to formaldehyde was performed. Expression of NGF mRNA in the hippocampus of immunized mice exposed to 80 and 400 ppb FA significantly increased. However, the NGF content in bronchoalveolar lavage fluid and plasma in immunized mice markedly suppressed. The RT-PCR evaluation showed higher concentrations of hippocampal NMDA and dopamine

receptors mRNA in mice exposed to 400 ppb FA with immunization. Thus, exposure of immunized mice to low levels of FA may alter NGF levels and neurotrophic activity in the hippocampus and contribute to the behavioural effects.

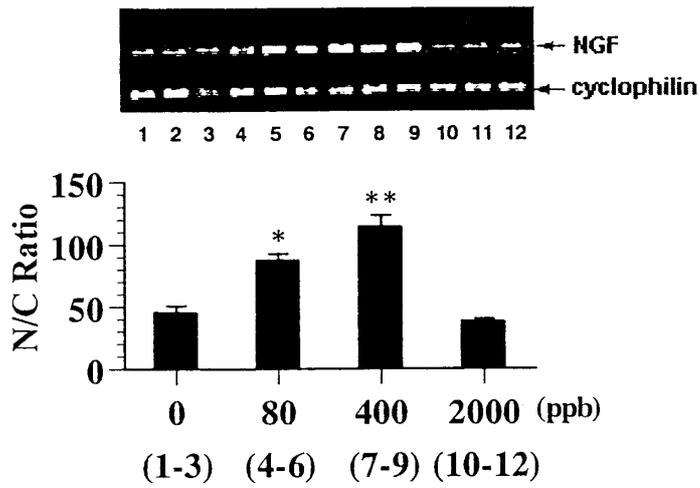


図1 FA 曝露したマウスの海馬における NGFmRNA 発現増強

* P<0.05

** P<0.01

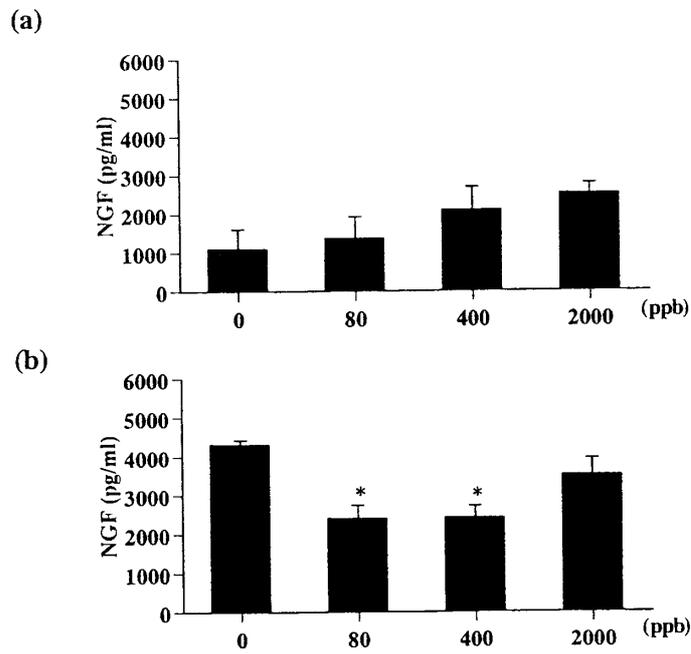


図2 FA 曝露したマウスの BALF 中の NGF 産生量

(a) nonimmunized mice

(b) immunized mice

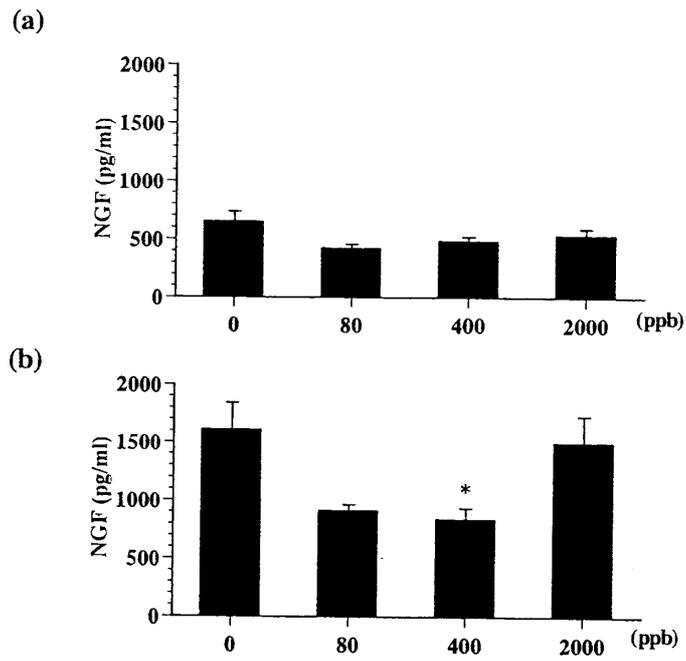


図3 FA 曝露したマウスの血漿中の NGF 産生量
(a) nonimmunized mice (b) immunized mice

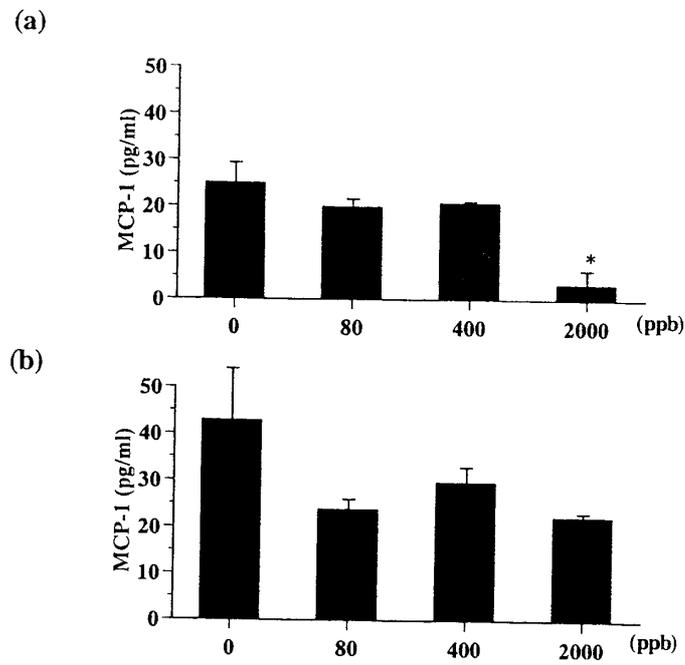


図4 FA 曝露したマウスの血漿中の MCP-1 産生量
(a) nonimmunized mice (b) immunized mice

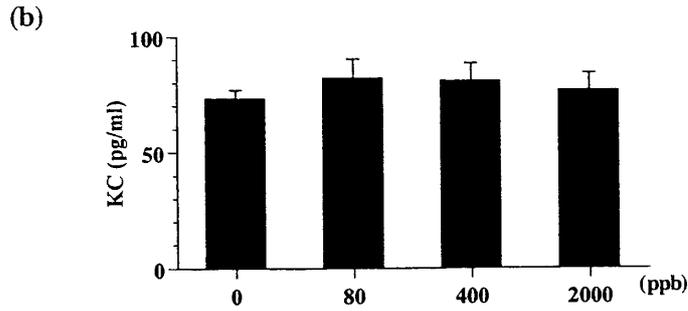
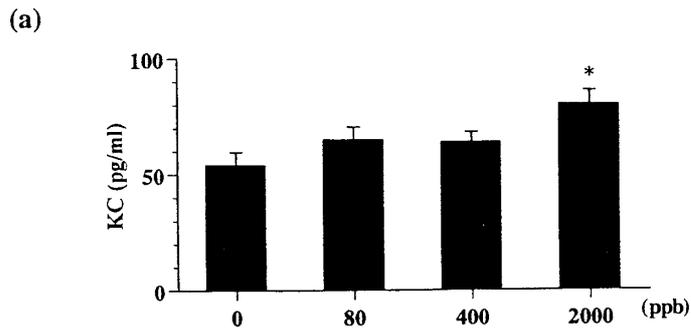


図5 FA 曝露したマウスの血漿中の KC 量

(a) nonimmunized mice (b) immunized mice

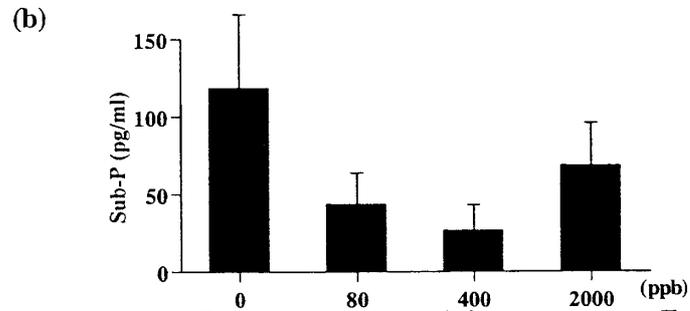
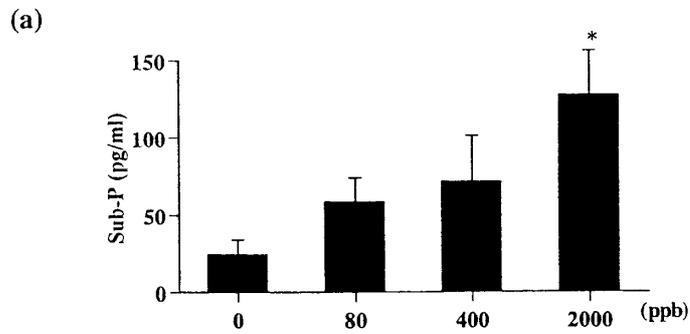


図6 FA 曝露したマウスの血漿中の Substance P 量

(a) nonimmunized mice (b) immunized mice

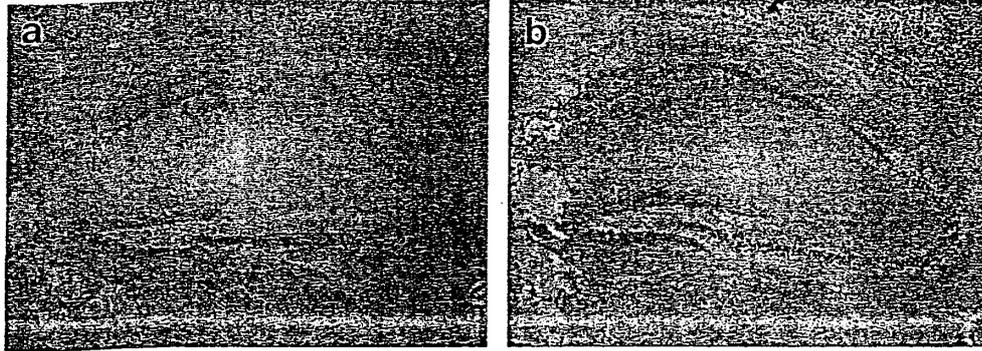


図7 免疫組織化学による海馬におけるNGF免疫陽性反応
 (a) OVA免疫とホルムアルデヒド 0 ppb曝露群、
 (b) OVA免疫とホルムアルデヒド 400 ppb曝露群。

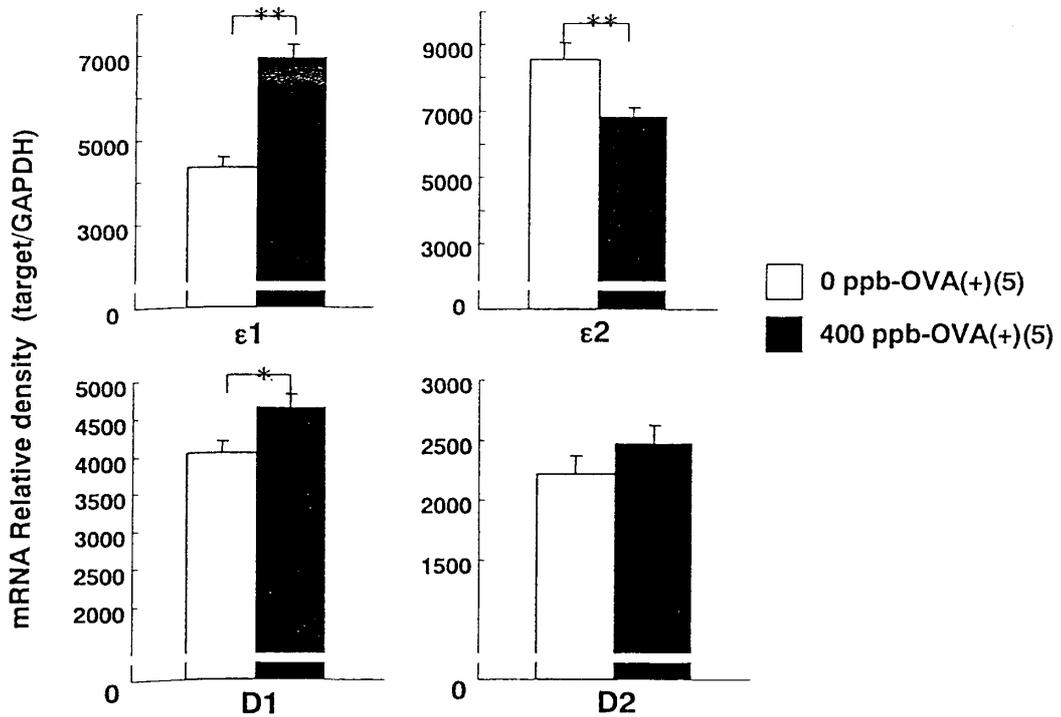


図8 海馬におけるNMDA型グルタミン酸受容体サブユニットε1 mRNA、
 ε2 mRNA、ドーパミン受容体D1 mRNA、D2 mRNA発現量
 * p < 0.01、 ** p < 0.001

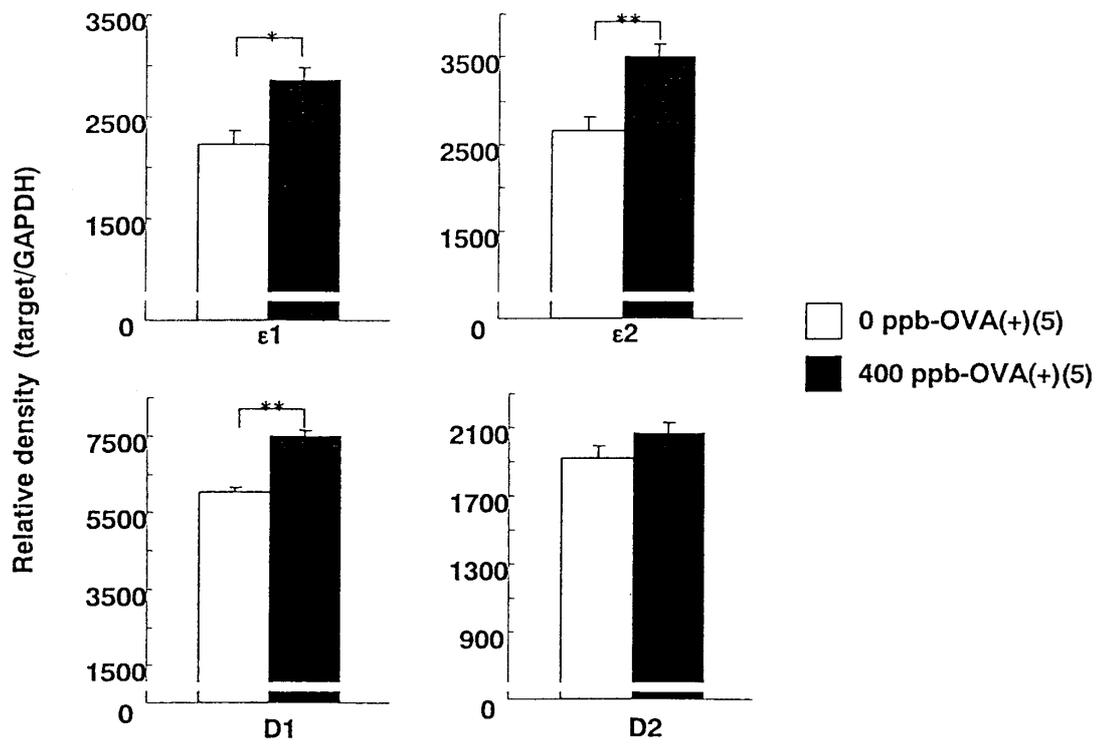


図9 扁桃体におけるNMDA型グルタミン酸受容体サブユニット $\epsilon 1$ mRNA、 $\epsilon 2$ mRNA、ドーパミン受容体D1 mRNA、D2 mRNA発現量
* $p < 0.01$ 、** $p < 0.001$