

### 3. 低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅覚系の形態学的解析

研究協力者：市川眞澄、林洋（（財）東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所）

#### （1）研究要旨

化学物質の低濃度長期曝露によって、嗅覚系ニューロンに与える影響を調べるため、これまでに明らかになった嗅球ニューロンへの解析を追試し、さらに嗅覚系大脳辺縁系における解析をおこなった。このために、ホルムアルデヒド (0, 400, 2000ppb) に3ヶ月間持続的に曝露しマウスの嗅球および大脳辺縁系を形態学的に解析した。また、さらにアレルギーモデルに対する影響をも検討した。

嗅球の解析では、嗅球系球体に存在するドーパミンニューロンを観察した。この結果、0 ppb に比べて曝露群で陽性ニューロンの数が増えることが確かめられた。嗅球におけるドーパミンニューロンの機能は明らかでないが、GABA と共存することから抑制性ニューロンとして、刺激依存的に増加し嗅覚情報を調節していると考えられる。また、アレルギーモデルとして作成したアルブミン投与マウス群では、有意の差は認められなかった。

大脳辺縁系の解析では、扁桃体におけるホルムアルデヒド曝露の影響を調べるため、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質の Parvalbumin と Calbindin の発現を免疫細胞化学的に解析した。その結果、扁桃体皮質核では、Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンが曝露群で多くなる傾向が認められた。扁桃体の Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンは GABA と共存する抑制性ニューロンであるとの報告がある。したがって、扁桃体においても、ホルムアルデヒド曝露により抑制性ニューロンの活動が高まっていることが示唆される。また、アルブミン投与群で、Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンが多くなる傾向を示した。扁桃体における抑制性ニューロンの役割はほとんど明らかになっていない。あくまでも、推測であるが、ホルムアルデヒドによる扁桃体抑制性ニューロン活動が、アレルギーモデル動物ではさらに強まる。これがさらにストレスとして働いている可能性が高い。

嗅球のドーパミンニューロンおよび大脳辺縁系の扁桃体 Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質陽性ニューロンが曝露群で増加している結果を得た。これらのニューロンは抑制性の機能を有する。持続的に刺激が嗅覚系に入力するため、これを抑制する必要から、抑制性ニューロンの活動が高まり、この結果、共存するドーパミンや Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質の発現も増加し、この免疫陽性ニューロン数も増加したものと思われる。抑制性ニューロンの活動の増強が動物の脳にどのような影響を与えているか推測の域を出ないが、ホルムアルデヒドの持続的な刺激を解除するような脳内メカニズムが働いていると考えられる。

#### （2）研究目的

嗅覚はニオイを感受する感覚系である。ニオイは化学物質により引き起こされる。このニオイ物質は吸気とともに鼻腔に取り込まれ鼻腔の奥にある嗅覚器に到達する。ここで、感覚細胞（嗅細胞）に受容され、その情報は嗅覚系を經由して高次脳中枢へと運ばれる。

このように、嗅覚器の特徴は、嗅細胞が外界に接していることである。この理由から、外界の様々な物質に曝露されてその影響を直接を受けることである。これまで、低濃度ホルムアルデヒド（80、400、2000 ppb）長期曝露により、嗅覚系にどのような影響を与えるかを形態学的に解析してきた。その結果、嗅覚系の感覚器である嗅上皮では、2000 ppb濃度のものでも微絨毛の脱落と言った軽微な障害があるものの機能障害を引き起こすとおもわれる形態変化は認められなかった。一方、嗅球ニューロンの解析から、嗅球の糸球体に存在する傍糸球体ニューロンのうち、ドーパミンニューロンの機能亢進を示唆する結果をえた(Hayashi et al, Brain Research 2004)。この結果は、低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露が嗅覚系の第一次中枢に影響を与えていることを示している。この影響がさらに高次中枢にも達しているかは脳の機能にとって重要である。なぜならば、嗅覚系の中枢は大脳辺縁系に属し、情動や摂食など本能行動に関わる扁桃体などが存在するからである。そこで、平成15年度は、低濃度ホルムアルデヒド長期曝露の影響を、嗅球からさらに高次中枢への影響を明らかにするために、嗅球の大脳辺縁系投射部位である梨状葉および扁桃体におけるニューロンを解析した。また、アレルギーとの関連を明らかにする目的で、アルブミンを投与したモデル動物への影響も解析した。

### （3）方法

低濃度ホルムアルデヒド（0、400、2000 ppb）を3ヶ月間曝露、また同時にアルブミンを投与したマウス（C3H/HeN）（各曝露群5匹）を、組織標本用に固定し、嗅球および大脳辺縁系を含む脳部位を40mmの厚さの連続横断切片を作成した。嗅球では、ドーパミンニューロンのマーカーであるチロシン水酸化酵素（TH）をもちいた免疫細胞化学、大脳辺縁系では、Ca結合タンパク質のうち、Parvalbuminと、Calbindinの抗体を用いた免疫細胞化学法をもちいて解析をおこなった。

### （4）嗅球ニューロンの解析

#### 1）嗅球の構造（図1）

嗅球を構成するニューロンは、嗅球から軸索を高次中枢に投射する出力ニューロン（中継ニューロンあるいは投射ニューロンともよばれる）である僧帽細胞と房飾細胞、そして嗅球内に限局する介在ニューロンの顆粒細胞と傍糸球体細胞がおもなものである。その他に嗅球を構成する神経要素としては、嗅球に入力する線維である。代表は、嗅上皮に存在してにおいを受容する嗅細胞の軸索である嗅神経で、ほかには、高次中枢からの入力線維がある。これらの神経要素が組織的に構成され、6層構造が形成される。

嗅神経は糸球体に入り枝分かれして糸球の形となる。また糸球体はまわりを小型の傍糸球体細胞で取り巻かれて、ユニットを形成している。嗅神経終末は糸球体内の他の神経要素とシナプスを形成する。糸球体の中には、僧帽細胞、房飾細胞および傍糸球体細胞の樹状突起が存在し、それぞれが嗅神経終末とシナプスを形成している。傍糸球体細胞は伝達物質としてGABAをもっており、中継ニューロンの興奮を抑制する機能を持つ。このように、糸球体は嗅神経からのにおい情報に関して、最初に情報処理をする部位である。糸

球体の数はネズミでおよそ 1700～2000 個といわれている。これらが、主嗅球に同心円状にほぼ一列に並んでいる

## 2) ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅球 TH 陽性 (ドーパミン) ニューロンの免疫細胞化学による解析

糸球体を取り囲む傍糸球体ニューロンの一部はドーパミンを含有している。(TH はドーパミン合成酵素群の律速酵素である)。ドーパミンの存在意義はいまだ不明であるが、共存する GABA の抑制機能を修飾していると推測されている。たとえば、嗅上皮を破壊したりあるいは鼻腔をふさぐなどして嗅神経の活動を抑制すると、TH 量あるいは TH 陽性細胞が減少することが知られている。したがって、嗅神経の活動をモニターするには、大変有効である。

そこで、TH 抗体により免疫染色し、染色された細胞数を計測した。嗅球糸球体はほぼ一定の大きさで同心円状に並んでいる。嗅球背側の TH 陽性ニューロンを 1 糸球体あたりの数で示した結果が図 2 である。0 ppb 群に比べて 400、2000 ppb 曝露群で有意に TH 陽性細胞が増加している。これは、曝露の結果 TH の合成が高まり免疫的に染色された細胞数が増加した結果と考えられる。TH はドーパミン合成酵素である、したがって、ドーパミンの含有量も増加していると推測される。

アルブミン投与群は、それぞれのホルムアルデヒド曝露濃度において、無投与群との間で差がなかった。嗅球の糸球体ドーパミンニューロンはアルブミン投与すなわちアレルギーの影響はないと思われる。

## 3) まとめ

嗅球のドーパミンニューロンが低濃度ホルムアルデヒド長期曝露の影響を受け、その細胞内発現量を増加させている事が明らかになった。これらのニューロンは、GABA と共存していることから、抑制的に働いている。したがって、嗅球における抑制機構が高まっていると考えられる。持続的な曝露によるホルムアルデヒドの刺激を抑制する機構が働いている可能性を示唆するものである。

## (5) 大脳辺縁系ニューロンの解析

### 1) 大脳辺縁系

大脳辺縁系は大脳を中心である大脳新皮質の縁を構成する部位の総称である。主なものは、海馬、梨状葉、扁桃体などである。このうち、嗅球から投射するものは、梨状葉、扁桃体である(図 3)。そこで、これらの部位のホルムアルデヒド長期曝露の影響を解析することを開始した。

### 2) Ca 結合タンパク質含有ニューロン (図 4, 5, 7)

Ca 結合タンパク質はニューロンに存在し、Ca の輸送あるいは細胞内の Ca バッファーとしての役割を持つと言われている。また、脳内に広く特異的に分布するので、ニューロンのマーカーとしても用いられている。嗅覚系のニューロンでは、GABA ニューロンと共存し、活動依存的にその発現が変化する事が報告されている。おそらく、ニューロンの活動を抑制的に調節する役割を持つものと考えられる。したがって、嗅覚系のニューロンの

活動をモニターするのに有効であると考え、免疫細胞化学的に解析した。

### 3) Ca 結合タンパク質 Parvalbumin 陽性ニューロンの解析

Ca 結合タンパク質のうち Parvalbumin の免疫細胞化学法により、曝露の影響を解析した。

扁桃体のなかで嗅球から投射する部位は扁桃体皮質核である。そこで、扁桃体皮質核と梨状葉皮質で、Parvalbumin 陽性ニューロンの数を計測した。表に単位面積当たりの陽性ニューロン数を各曝露群ごとに示してある(図6)。扁桃体皮質核および梨状葉ともに曝露された個体で、Parvalbumin 陽性ニューロンの数が増加する傾向を示す。また、アルブミン投与群は、無投与群とくらべて、Parvalbumin 陽性ニューロンの数が増加する傾向がある。この傾向は、扁桃体でより強い。

### 4) Ca 結合タンパク質 Calbindin 陽性ニューロンの解析

Ca 結合タンパク質のうち Calbindin の免疫細胞化学法により、曝露の影響を解析した。扁桃体皮質核と梨状葉皮質で、陽性ニューロンの数を計測した。単位面積当たりの陽性ニューロン数を各曝露群ごとに示してある(図8)。扁桃体皮質核では、および梨状葉で曝露された個体で、陽性ニューロンの数が増加する傾向を示す。しかし、アルブミン投与の影響は扁桃体皮質核で、強く現れた。

### 5) まとめ

Ca 結合タンパク質陽性ニューロンの免疫細胞化学的解析により、ホルムアルデヒド長期曝露の影響としては、Ca 結合タンパクの発現ニューロンが増加することから、嗅覚系が強く関わる大脳辺縁系に影響を及ぼしていることが明らかになった。Ca 結合タンパク発現ニューロンは、GABA と共存し、活動依存的にその発現が変化する事が報告されている。おそらく、ニューロンの活動を抑制的に調節する役割を持つものと考えられる。ホルムアルデヒドの持続的な刺激を抑制機能により解除するような脳内メカニズムが働いている可能性を示唆する。また、アルブミン投与の影響は、扁桃体でより強く現れた、これはアレルギーに関わる機能が扁桃体の機能と結びついた結果なのか不明である。扁桃体は本能行動、特に摂食や情動に強く関わっている、また、視床下部との神経連絡も密であることから、ストレスと密に関わる自律機能や内分泌機能への影響も考えられる。

## (6) 考察

ホルムアルデヒドの低濃度長期曝露により、嗅球のドーパミンニューロンおよび大脳辺縁系の  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質陽性ニューロンすなわち GABA 抑制ニューロンの一部が曝露群で増加している結果を得た。これは、持続的に刺激が嗅覚系に入力するため、これを抑制する必要から、抑制性ニューロンの活動が高まり、この結果免疫陽性ニューロン数が増加したものと推測される。これら抑制性ニューロンの活動の増強が動物の脳にどのような影響を与えているか推測の域を出ないが、少なくとも嗅覚系においては、ホルムアルデヒドの持続的な刺激を抑制機能により解除するような脳内メカニズムが働いていると思われる。

低濃度ホルムアルデヒド曝露の影響とアルブミン投与の関連を  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質の

抗体を用いて解析した。その結果、扁桃体皮質核の Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンが曝露群で多くなる傾向が認められた。扁桃体が視床下部と密な連絡があり、内分泌機能や自律神経系を制御していることから、アレルギーとの関係も考えられる。

## 図の説明

### 図1 嗅球の構造

嗅球から軸索を高次中枢に投射する出力ニューロンである僧帽細胞 (MC)、そして嗅球内に限局する介在ニューロンの顆粒細胞 (gc) と傍糸球体細胞 (ニューロン) (pgc) がおもなものである。嗅球を構成する神経要素は、嗅上皮に存在してにおいを受容する嗅細胞の軸索である嗅神経 (ON)と高次中枢からの入力線維がある。これらの神経要素が組織的に構成され、6層構造が形成される。嗅神経は糸球体に入り枝分かれして糸球の形となる。また糸球体はまわりを小型の傍糸球体細胞で取り巻かれて、ユニットを形成している。嗅神経終末は糸球体内の他の神経要素とシナプスを形成する。

### 図2 ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅球 TH 陽性ニューロン数

縦軸に糸球体あたりの TH 陽性ニューロン数、横軸に曝露ホルムアルデヒド濃度を示す。斜線カラムがアルブミン投与群 (OVA+) 黒カラムは無投与群。\*はコントロール (0 ppb 曝露) との統計学的有意差 ( $p < 0.01$ ) を示す。

### 図3 マウス大脳辺縁系の組織像その解説

### 図4 大脳辺縁系の Ca 結合蛋白質

### 図5 大脳辺縁系における Parvabumin の免疫染色像

### 図6 ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅球 Parvalbumin 陽性ニューロン数

扁桃皮質核 (左) および梨状葉皮質 (右) の単位面積 ( $20 \times 10^3 / \text{mm}^2$ ) 当たりの細胞数を示す。斜線カラムがアルブミン投与群 (OVA+) 黒カラムは無投与群。横軸は曝露ホルムアルデヒド濃度 (0、400、2000ppb) を示す。

### 図7 大脳辺縁系における calbindin の免疫染色像

### 図8 ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅球 calbindin 陽性ニューロン数

扁桃皮質核 (左) および梨状葉皮質 (右) の単位面積 ( $20 \times 10^3 \text{mm}^2$ ) 当たりの細胞数を示す。斜線カラムがアルブミン投与群 (OVA+) 黒カラムは無投与群。横軸は曝露ホルムアルデヒド濃度 (0、400、2000ppb) を示す。