

## 7. 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記憶形成機構への免疫-神経軸を介した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：山元昭二（独立行政法人国立環境研究所）  
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）  
樺田尚樹（産業医科大学）

### （1）研究要旨

MCSとアレルギー反応との関連について明らかにするために、これまで低濃度長期ホルムアルデヒド曝露によりみられるマウス免疫系での反応と卵白アルブミン抗原の感作によりマウスで誘導されるアレルギー反応との差異について検討した。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nerve growth factor (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を認めた。ホルムアルデヒド曝露と抗原感作との相加的な反応と考えられた。今年度は、低濃度トルエン曝露を行いこれまでのホルムアルデヒド曝露の結果と比較し、化学物質の特異性について解析した。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トルエン曝露した結果、肺における炎症性細胞数に増加はみられたが、NGF産生に関連する変動は見られなかった。次ぎに、学習・記憶に関与する海馬機能についてホルムアルデヒドとトルエン曝露による神経伝達物質受容体の遺伝子発現量を比較検討した。その結果、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。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結果、トルエン曝露によりドーパミンD1受容体<sup>注1</sup>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<sup>注1</sup>、NMDA型グルタミン酸受容体 $\epsilon$ 1及び $\epsilon$ 2サブユニット<sup>注2</sup>の発現量はトルエン曝露の影響がみられなかった。これらの結果は、ホルムアルデヒドとトルエン曝露により記憶形成機構に変化が生じたことを示しており、その異なる作用の可能性を示唆している。

注1：ドーパミン受容体のサブタイプであるD1,D2は、細胞内でのcAMPの増加、減少にそれぞれかかわっている。

注2：NMDA型グルタミン酸受容体の $\epsilon$ 1サブユニットはシナプス可塑性と記憶・学習の両方にかかわる分子であり、 $\epsilon$ 2サブユニットはシナプス可塑性と神経回路の発達・成熟にかかわる分子である。

### （2）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重要である。そこで、これま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て検討した結果、抗原特異的IgE抗体産生には顕著な影響はみられず、抗原として用いた卵白アルブミン(OVA)に対する反応においてもサイトカインレベルでのTh2タイプへの偏りはみられなかった。アレルギーモデルマウスへの2000 ppbホルムアルデヒド曝露により肺での炎症反応の増強が認められたが、それ以下では対照群と比べ有意な差はみられていない。ところで、80 や400 ppbホルムアルデヒド曝露のみでは、海馬における神経成長因子(NGF)産生量に差はみられなかったが、抗原感作が加わる事により海馬での顕著な増加が認められた<sup>1)</sup>。一方、肺胞洗浄液や血漿中では逆に顕著な低下が認められ、免疫-神経系における制御機構に何らかの変化が誘導されたことを示唆すると考えられた<sup>2)</sup>。今年度は、これまでの12週間曝露より短期の変動を検索するために、6週間の曝露で免疫系への影響を調べた。また、ホルムアルデヒド曝露によりみられた反応が化学物質特異的か否かを検索するために、低濃度トルエン曝露を行い比較検討した。

### (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、昨年と同様の条件で400 ppbの6週間、および12週間で行った。トルエン曝露については、危険性を考慮して日中の6時間/日、5日間/週で6週間と12週間曝露を50 ppmの濃度で実施した。曝露の詳しい条件については、トルエン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

OVA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アレルギーモデルマウスを作成した。ホルムアルデヒド、あるいはトルエンの曝露前に10 µg/マウスの濃度でOVAを2 mg alumとともに腹腔内投与し、以後曝露期間中に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、ネンブター麻酔下で肺胞洗浄液、脳組織、免疫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・神経成長因子等の測定

肺胞洗浄液中の炎症性細胞の検索については、採取した洗浄液を遠心し、その後に沈殿した細胞数を算定した。サイトスピン標本を作成し、乾燥後ディフクイック (国際試薬) で染色して炎症性細胞の割合について検討した。肺胞洗浄液の遠心後の上清中と血漿中のサイトカイン・ケモカイン等の産生量については、interleukin (IL)-1β, -6, tumor necrosis factor (TNF)-α, interferon (IFN)-γ, thymus and activation regulated chemokine (TARC), macrophage inflammatory protein (MIP)-1α (Biosource, R&D), substance P (Peninsula Lab. Inc. & Assay Designs, Inc.)とNGF (Promega)のELISAキットを用いてそれぞれ測定した。

#### 4) 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、昨年度とは異なりすみやかに全海馬組織を回収し液体窒素で凍結、-80℃にて保存した。その後total RNAを抽出し(各群5例)、各サンプルのNMDA型グルタミン酸受容体(ε1, ε2 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%シナガロー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。mRNA 発現量は、内在性コントロールである GAPDH の蛍光強度当たりの対象遺伝子産物の蛍光強度として示した。

#### 5) リアルタイム PCR によるサイトカイン mRNA の解析

BioRobot EZ1 (Qiagen) を用いて組織から total RNA を抽出し、量および質を Agilent 2100 Bioanalyzer で確認した。Random hexamer プライマーとスーパースク립ト II 逆転写酵素 (インビトロジェン社、Life technologies) を用いて total RNA から first strand cDNA を合成した。QuantiTech Gene Expression および Custom Assay (Qiagen) を用いて real time two step RT-PCR を行い、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) で Quantitect プローブ (Qiagen) の蛍光を検出した。リアルタイム PCR は、酵素活性化を 95°C で 15 分行った後、エクステンション 76°C (30 秒)、変性 94°C (15 秒)、アニーリング 56°C (30 秒) を 45-60 サイクルの条件で行い、Comparative threshold cycle 法でデータ分析を行った。サイトカインシグナル量は、GAPDH 1  $\mu$ g あたりのサイトカイン mRNA シグナル量として算出した。

#### 6) 統計処理

測定データは平均値  $\pm$  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) ホルムアルデヒド、あるいはトルエンの 6 週間曝露における免疫系への影響

低濃度ホルムアルデヒド曝露 (FA) とトルエン曝露 (To) による免疫臓器への影響を検討すると、ホルムアルデヒド曝露では脾臓重量の増加が、トルエン曝露では胸腺重量の低下が対照群 (C) と比較して認められた (図 1)。脾臓の細胞数には変化がみられなかったが、リンパ球亜集団の変動について FACS で解析した。その結果、CD3, CD4, CD8 陽性の T リンパ球ではホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露により影響はみられなかったが、CD19 陽性の B リンパ球においてはホルムアルデヒド曝露による低下がみられた (図 2)。

肺における炎症の指標としての炎症性細胞の集積では、トルエン曝露による細胞数の有意な増加がみられ、その中でマクロファージとリンパ球が特に増加した (図 3)。ホルムアルデヒド曝露では、炎症性細胞の有意な集積はみられなかった。肺胞洗浄液中のサイトカイン量では、トルエン曝露で IFN- $\gamma$  の顕著な低下がみられたが、TNF- $\alpha$  では差はみられなかった (図 4)。データは示していないが、IL-6 と MIP-1 $\alpha$  においてもホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露の影響はみられていない。血漿中の抗体価においては、トルエン曝露では IgE, IgG1, IgG2a とともに変化はみられなかったが、ホルムアルデヒド曝露で IgG2a の顕著な増加が認められた (図 5)。

#### 2) 12 週間トルエン曝露の免疫・アレルギー系への影響

低濃度ホルムアルデヒド曝露と抗原感作により脳の海馬における NGF 産生の増加、肺胞洗浄液中における NGF 産生の有意な低下を昨年報告した。化学物質の特異性を調べるために、低濃度トルエン曝露によるアレルギーモデルマウスでの変動について検討した。その結果、トルエン曝露のみで抗原感作していないマウスでは、胸腺重量、脾臓重量、脾臓細胞数において差はみられなかった (図 6)。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の炎症性細胞の集積については、トルエン曝露による増減は観察されなかった (図 7)。アレルギーモデルマウスにトルエン曝露を行うと、体重と脾臓細胞数に低下がみられたが、臓器重量には差はなかった (図 8)。脾臓細胞数に低下がみられたが、個々のリンパ球亜集団の比率には差が見られなかったことから、全体的な低下と考えられた (図 9)。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 (図 10)。抗原感作なし群でのトルエン曝露では、肺胞洗浄液中の IFN- $\gamma$  産生量の有意な低下がみられたが、TNF- $\alpha$  では差はみられなかった (図 11)。一方、アレルギーモデルマウスでの炎症性サイトカイン産生では有意な差はみられなかった。他の IL-1 $\beta$ , IL-6, TARC でも変動はなかった。

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 (図 12)。血漿中の総抗体価においては、トルエン曝露群の IgE 抗体価で有意な増加がみられた (図 13)。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-4mRNA も低下傾向を示した (図 14)。

脳内海馬でのトルエン曝露の影響を蛋白レベルで測定すると、抗原感作の有無に関係なく NGF と substance P において有意な増減は認められなかった (図 15)。

### 3) RT-PCR による神経伝達物質受容体 mRNA 発現量の半定量

低濃度ホルムアルデヒドとトルエンによる海馬での機能の修飾について明らかにするために、曝露したマウスの海馬における神経伝達物質受容体 mRNA 発現量を半定量 RT-PCR により調べた。D1 受容体 mRNA は、OVA (+) 群、OVA (-) 群ともに、Air 曝露 (対照群) と比較してホルムアルデヒド (400 ppb) 曝露により若干の上昇傾向が、トルエン (50 ppm) 曝露により有意な上昇がみられた ( $p < 0.01$ ) (図 16)。D2 受容体 mRNA では、OVA (-) 群において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 ( $p < 0.01$ )。また OVA (+) 群では、Air 曝露でも OVA 刺激による上昇が見られ ( $p < 0.01$ )、OVA (+) 群のホルムアルデヒド曝露と同じレベルであった。すなわち OVA (-) 群のホルムアルデヒド曝露、OVA (+) 群の Air 曝露およびホルムアルデヒド曝露が、OVA (-) 群の Air 曝露よりも高いレベルを示した。トルエン曝露では若干の上昇傾向がみられたが有意な変化は認められなかった。 $\epsilon$  1mRNA も、Air 曝露において OVA 刺激による有意な上昇がみられた ( $p < 0.05$ )。OVA (+) 群、OVA (-) 群ともに、ホルムアルデヒド曝露により発現が上昇しており (それぞれ 191% と 146%,  $p < 0.01$ )、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。 $\epsilon$  2mRNA は、OVA (+) 群と OVA (-) 群とではホルムアルデヒド曝露に対してまったく逆の反応がみられた。すなわち、OVA (-) 群ではホルムアルデヒド曝露により有意な低下がみられた (81%,  $p < 0.05$ ) のに対し、OVA (+) 群では 486% 上昇していた ( $p < 0.001$ )。また Air 曝露同士を比較すると、OVA (+) 群のほうが有意に高かった (125%,  $p < 0.05$ )。

## (5) 考察

これまでの低濃度ホルムアルデヒド (80 または 400ppb) 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

ン曝露をおこない比較検討した。トルエンの6週間、12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- $\gamma$ 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12週間曝露においては、アレルギー反応にかかわる抗原特異的IgE抗体や脾臓細胞を抗原刺激して産生されたIL-4サイトカインでの増加はみられずTh2タイプのアレルギー反応の増強効果は認められなかった。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トルエン曝露では認められなかった。今回の濃度のトルエン曝露では、これまで報告したホルムアルデヒド曝露の結果と同様な過敏状態は誘導されなかった。

昨年、海馬の一部を用いたmRNA半定量の解析結果から、NGF以外にも神経伝達物質受容体mRNAの発現が変化していることが示された。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、OVA抗原感作と組み合わせられ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示唆された。

今年度のmRNA半定量の解析では、まず第一に昨年度と同様、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。さらに今回は、トルエン曝露の影響とOVA抗原刺激による変動について比較検討したところ、興味深い結果が得られた。すなわち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で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。さらに $\epsilon$ 2 mRNAのホルムアルデヒド曝露による変動は、OVA刺激の有無により正反対の動きを見せ、特にOVA刺激とホルムアルデヒド曝露を組み合わせた場合には5倍近い増加という極めて大きな変化が見られた。今回のmRNA発現量の変動が、瞬時に同機能蛋白質の発現変動に結びつくかどうかは今後の検討が必要であるが、mRNAの発現変動は、その細胞（あるいは海馬組織）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。そして著者らの知識の中では、NMDA型受容体サブユニットのmRNA発現量がこれほど変化すること自体が極めて稀である。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)<sup>3)</sup>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な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いえる。

今年度の研究から、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刺激が加わることがより過敏な状態を誘導しやすいことを示唆している。

## (6) 参考文献

1. Fujimaki H, Kurokawa Y, Takeyama M, Kunugita N, Fueta Y, Fukuda T, Hori H, Arashidani K. Inhalation of low-level formaldehyde enhances nerve growth factor production in the hippocampus of mice. Neuroimmunomodulation (in press)

2. Fujimaki H, Kurokawa Y, Kunugita N, Kikuchi M, Sato F, Arashidani K. Differential immunogenic and neurogenic inflammatory responses in an allergic mouse model exposed to low levels of formaldehyde. *Toxicology* 2004, 197: 1-13.
3. Pall ML. NMDA sensitization and stimulation by peroxy nitrite, nitric oxide, and organic solvents as the mechanism of chemical sensitivity in multiple chemical sensitivity. *FASEB J.* 2002, 16:1407-17.

**(7) Abstract**

To investigate the effects of low level of toluene and compare with the results of formaldehyde inhalation described previously, C3H/HeN mice were exposed to 0 (control), and 50 ppm toluene for 12 weeks with or without ovalbumin sensitization. In another experiment, exposure to formaldehyde or toluene was performed and compared the expression of NMDA and dopamine receptors mRNA. The production of NGF in the hippocampus of immunized mice exposed to 50 ppm toluene was not increased. However, the RT-PCR evaluation showed higher concentrations of hippocampal D1 receptor mRNA in mice exposed to toluene. Expression of NMDA receptors mRNA markedly enhanced in mice exposed to 400 ppb FA with immunization, but not in mice exposed to toluene. Thus, exposure of immunized mice to low levels of formaldehyde and toluene may differentially affect neuro-immune network via antigen stimulation.