

平成15年度

本態性多種化学物質過敏状態の調査研究

研究報告書

平成16年3月

財団法人 日本公衆衛生協会

総 目 次

A. 目 的	1
B. 検討会委員	1
C. 調査研究結果	3
第 1 章 二重盲検法による微量化学物質曝露試験	3
第 2 章 マウスを用いた動物モデルに関する研究	3 3

本態性多種化学物質過敏状態の調査研究

A. 目的

近年、環境中に存在する微量な化学物質による環境汚染や人体汚染が大きな社会問題となっている。とりわけ、シックハウス症候群との関連性等が指摘されている本態性多種化学物質過敏状態（いわゆる化学物質過敏症）については、不確実な点が多いものの、科学的知見の収集を急ぐ必要がある。

そこで、本調査では、昨年度に引き続き二重盲検法を実施し、本病態が化学物質によって誘発されるか否かを検証するとともに、モデル動物を利用した非アレルギー性の過敏状態の発症機序を検討し、メカニズムの解明を図ることを目的とした。

B. 検討会委員（順不同 敬称略）

座長 大井 玄	独立行政法人国立環境研究所顧問、東京大学名誉教授
相澤 好治	北里大学医学部衛生学公衆衛生学教授
荒記 俊一	独立行政法人産業医学総合研究所理事長、東京大学名誉教授
安藤 正典	国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部長
浦野 紘平	横浜国立大学大学院環境情報研究院教授
久保木富房	東京大学医学部附属病院心療内科教授
竹中 洋	大阪医科大学医学部耳鼻咽喉科教授
土屋 悦輝	工学院大学工学部応用化学科講師
西岡 清	東京医科歯科大学皮膚科学教授
橋本 信也	医療法人元気会横浜病院長
藤巻 秀和	独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域室長
吉村 健清	産業医科大学産業生態科学研究所臨床疫学教授
鈴木 達夫	（社）北里研究所北里研究所病院医療環境科学センター長
坂部 貢	（社）北里研究所北里研究所病院臨床環境医学センター部長
遠乗 秀樹	北里大学医学部衛生学公衆衛生学助手
嵐谷 奎一	産業医科大学産業保健学部教授

C. 調査研究結果

第 1 章 二重盲検法による微量化学物質曝露試験

目 次

研究実施担当者	5
I. 目的	7
II. 方法	7
(1) 施設	7
(2) 対象	7
(3) 曝露実施施設	8
(4) 負荷ガス条件	8
(5) 検査項目	8
(6) 検査実施手順	9
(7) 症例の要約	10
III. 結果	11
A. 自覚症状スコア	11
B. バイタル、および呼吸機能検査（ピークフロー）	15
IV. 考察	16
V. 結論と今後の課題	17
VI. 本研究に関連した本年度（平成15年度）の研究発表	17

研究実施担当者

総括 坂部 貢 (社) 北里研究所・北里研究所病院臨床環境医学センター一部長
北里大学薬学部・公衆衛生学教室教授 (現本務先・役職)
(社) 北里研究所・北里研究所病院臨床環境医学センター長 (現兼
務先・役職)

遠乗 秀樹 北里大学医学部衛生学公衆衛生学助手

尾島 正幸 北里大学医学部衛生学公衆衛生学研究員

齋藤麻里子 東京大学大学院ストレス防御・心身医学研究員

鈴木 幸男 (社) 北里研究所・北里研究所病院呼吸器内科部長

田中館明博 北里大学医療衛生学部医療工学科助教授

I. 目的

本態性多種化学物質過敏状態（いわゆる化学物質過敏症）については、平成9年より研究班が設置され、微量化学物質に対して過敏性を有すると判断された被験者に対して平成12年度8名、平成13年度15名、平成14年度15名の計38名について、二重盲検方法による微量ホルムアルデヒド曝露負荷試験を施行、年度毎に結果を評価し検討を重ねてきた。しかしながら、曝露負荷試験後の自覚症状の増強が医学統計学的、即ち、科学的評価に耐えうる一定の傾向を示さなかったこと、また神経学的検査を中心とした他覚的検査においても曝露前後の生理学的変動を十分に捉えることが出来なかった。

そこで本年度は、これまでの研究結果・検討会において今後の課題としてあげられた種々の指摘・示唆を踏まえ、複数化学物質混合同時負荷・負荷時間の延長を中心として、負荷前後の自覚症状、バイタルサイン、各種神経学的検査等を記録・検討した。

II. 方法

本態性多種化学物質過敏状態を有する被験者に微量ガス曝露負荷試験を、化学的に正常な空間（クリーンルーム）で二重盲検法により施行し、それによって引き起こされる自覚的症状および他覚的所見の変動を検討した。

(1) 施設

使用施設はこれまでと同様、化学的清浄空間の準備が可能な社団法人北里研究所・北里研究所病院内に設置されている臨床環境医学センターとした。

(2) 対象

平成15年度の被験者は、本態性多種化学物質過敏状態と判断された9名（以下、本態性多種化学物質過敏状態患者という）とした。

また被験者の年齢はこれまでと同様に、20歳から40歳までとし、社会生活が極めて制限されている者は対象としなかった。本態性多種化学物質過敏状態の診断は、北里研究所病院臨床環境医学センターに所属する医師が行い、第三者の医師により、本態性多種化学物質過敏状態の診断基準に合致しているかどうかの判定を得て選択した。この第三者の医師としての診断は、今回もこれまで同様に呼吸器内科専門医に委任した。

また精神疾患患者を除外するために、精神科専門医の診察を受けた。すなわち、研究開始時の対象選定にあたり、精神疾患の有無についての判定を行い、精神疾患を除外した。その詳細はこれまでと同様である。

またすべての被験者に、本微量ガス負荷試験の目的と方法を詳しく説明し、十分なインフォームドコンセントを得た後にガス負荷試験を行うこととした。被験者

は、負荷試験後の体調等によっては、任意にプログラムから離脱出来る事とした。また本研究の実施については、事前に北里研究所病院倫理委員会の承認を得た。

(3) 曝露実施施設

使用施設は、前回と同様に化学的に清浄な空間の準備が可能な北里研究所病院臨床環境医学センターとした。

(4) 負荷ガス条件

負荷物質はホルムアルデヒドおよびトルエンの混合負荷とした。
負荷濃度は下記の通りである。

ホルムアルデヒド **20ppb** およびトルエン **18ppb**
プラセボ：**0ppb**

ホルムアルデヒドおよびトルエンの設定濃度は、室内における揮発性有機化合物に関する厚生労働省ガイドライン値の1/4の濃度である。これらの物質負荷は1日1回とした。負荷条件は、ガス負荷室入室後5分間安静、20分間負荷、さらに5分間の観察とした。ホルムアルデヒドおよびトルエンの混合ガス負荷については、再現性の評価のため、曝露1回目、曝露2回目として、計2回の負荷試験を施行した。

前回までと同様、ガス負荷は、0レベルから徐々にガス濃度を上げ、約8分後に設定濃度に到達する。徐々にガス濃度を上げるために、この濃度では被験者がガス臭を感じることはない。負荷の順序は第三者の立会い医師による阿弥陀クジにより決定した。このガス負荷試験では、被験者、および診療および検査を行う医師にはまったく負荷の順序は知らされず、立会い医師のみがクジの内容を知り、ガス負荷装置を操作した。

また、ガス負荷室の汚染の影響を防ぐために、ガス濃度変更の前には必ずガス負荷室のオゾン薫蒸を行い、壁材への負荷ガスのシンク効果除去を図った。薫蒸時間は2時間とし、薫蒸後はオゾンの消失を待つために、さらに2時間の換気時間を置くこととした。

(5) 検査項目

自覚症状

自覚症状の記入方式は、国内外で報告されている自覚症状を参考に、**25**項目を選定し、曝露前後で被験者が「ない」から「最も強い」まで直線上に自由にプロットできるように設定し、その症状の程度を直線上の長さからスコア化した。

検査項目

- ・ 脈拍数
- ・ 血圧
- ・ 体温
- ・ 指先の酸素飽和度
- ・ 重心動揺検査
- ・ 呼吸機能検査

(6) 検査実施手順

化学的清浄空間を有する病室に入院する期間は、前年度同様、6日間とした。マスクング（汚染環境に馴化し、汚染物質負荷により症状が誘発されにくい状態）除去のために、入院第1日目、2日目はガス負荷検査を施行しなかった。

第1日目：マスクング除去

第2日目：マスクング除去

- ・ 問診
- ・ 一般検査
- ・ 脈拍
- ・ 体温 鼓膜温度を測定（テルモ耳式体温計 ミミツピ H テルモ株）
- ・ 血圧 座位で測定
- ・ sPO₂ 測定（Onyx Nonin 社 ミネアポリス 米国）

- ・ 自覚症状票記入
- ・ 胸部診察および胸部X線検査、呼吸機能検査
- ・ 呼吸器内科専門医師による診断基準に該当するかの確認作業。
- ・ 精神科医診察
- ・ 自覚症状記入票の自己記入と実際の症状の一致性と精神疾患除外のための確認作業

第3日目：ガス負荷

- ・ 負荷前問診
- ・ 負荷前一般検査（脈拍、体温、血圧、sPpO₂）
- ・ 負荷前自覚症状票記入
- ・ ガス負荷（プラセボあるいは混合ガス）
- ・ 負荷後一般検査（脈拍、体温、血圧、sPO₂）

- ・ 負荷後自覚症状票記入
- ・ 負荷後問診
- ・ 病室に帰宅

第4日目：ガス負荷

- ・ 第3日目と同じ

第5日目：ガス負荷

- ・ 第3日目と同じ。

第6日目：退院前検査

退院前検査として以下の検査を行う。

- ・ 一般検査（脈拍、体温、血圧、**sPO₂**検査を含む）
- ・ 症状票記入
- ・ 問診
- ・ 退院

(7) 症例の要約

被験者9名の概要をまとめて次に示す。

被験者概要

症例	年齢・性	主要発症推定原因・場所
1	24歳男性	大学の化学研究室。アレルギー歴あり。
2	27歳女性	化粧品会社勤務から発症
3	27歳男性	新築ビルにおける勤務。アレルギー歴あり。
4	25歳男性	大学の化学研究室。
5	35歳女性	主要発症要因不明。アレルギー歴あり。(平成14年度症例5)
6	26歳女性	新築住居。
7	32歳男性	組織ホルマリン固定作業。アレルギー歴あり。
8	30歳男性	大学の化学研究室
9	37歳男性	建材作業で発症。中毒後遺症状と本症の境界型。 アレルギー歴あり。(平成14年度症例3)

Ⅲ. 結果

各検査項目とも、結果資料が膨大であるため、本年度の研究の目的と結論が理解できるように必要十分な結果のみを記載し、必要に応じて、各検査項目の方法、結果、小考察、および小括を含めて記載する。

各検査項目は下記の通りである。

- A. 自覚症状スコア
- B. バイタル検査

A. 自覚症状スコア

プラセボあるいはホルムアルデヒド+トルエン混合負荷（1回目・2回目）した前後で、症状に差が認められるかどうかを、独自に作成した自覚症状スコアを用いて検討した。スコア記入票の詳細は、表 A-1 を参照のこと。

本年度の曝露検査は、昨年度と同様に化学物質過敏状態を有すると判断された被験者のみの9名で施行された。従って対照との比較は行っていない。

解析方法は以下の通りである。

（1）症例ごとの検討

各患者のスコアは、以下の方法で解析した。

- (1) 曝露条件ごとに、曝露直前と曝露直後の自覚症状のスコアを、症状ごとに対応させた上で比較する (**Wilcoxon signed-rank test**)。 (以下、曝露前後比較)
- (2) 全条件での曝露後の症状スコアを、症状ごとに対応させた上で、3群間比較する (**Freidman test**)。 (以下、3群比較)
- (3) 昨年度報告書と同様、曝露前後の自覚症状を比較した解析の結果をもとに9名の被験者を以下の4型に分類できる。

Type 1: プラセボでは自覚症状の増強がなく、混合曝露（1回目・2回目）のみで自覚症状増強が認められた者

Type 2: プラセボ、混合曝露（1回目・2回目）ともに、自覚症状増強が認められた者

Type 3: プラセボ、混合曝露（1回目・2回目）ともに、自覚症状増強が認められなかった者

Type 4: プラセボのみで自覚症状の増強が認められた者

(2) 平成 15 年度症例の曝露試験結果 (表 A-1 参照)

- ・ 症例 1 について

負荷の順序は：曝露 1 → プラセボ → 曝露 2 とした。

プラセボ負荷前後、曝露 1 負荷前後では、有意な症状の変化は認められなかった。曝露 2 負荷前後では、負荷後に有意な症状の増強が認められた ($p=0.028$) (不完全な **Type 1**)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、**Freidman** 検定では、3 群間に差が認められていたが ($p=0.041$)、ボンフェローニの不等式で訂正した場合、3 群間の症状に差は認められなくなった。

- ・ 症例 2 について

負荷の順序は：プラセボ → 曝露 1 → 曝露 2 とした。

プラセボ負荷前後、曝露 2 負荷前後では、症状の強さに有意な差は認められなかった。曝露 1 負荷前後の比較では、曝露後に有意な症状の増強が認められた ($p=0.011$) (不完全な **Type 1**)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較しても、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 3 について

負荷の順序は：曝露 1 → プラセボ → 曝露 2 とした。

プラセボ負荷試験前後、曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後の全てで、症状の強さに有意な差は認められなかった。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較しても、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 4 について

負荷の順序は：曝露 1 → 曝露 2 → プラセボとした。

プラセボ負荷試験前後、曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後の全てで、症状の強さに有意な差は認められなかった。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較しても、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 5 について

負荷の順序は：プラセボ→曝露 1 →曝露 2 とした。

プラセボ負荷前後では、有意な症状の変化は認められなかった。曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後では、有意な症状の増強が認められた(曝露 1 ・ $p=0.017$ 、曝露 2 ・ $p=0.030$)。この被験者では、プラセボに反応せず、曝露で症状が強くなるパターンを呈している (Type 1)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較しても、3 群間の症状に強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 6 について

負荷の順序は：曝露 1 →プラセボ→曝露 2 とした。

プラセボ負荷試験前後、曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後の全てで、症状の強さに有意な差は認められなかった。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較しても、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 7 について

負荷の順序は：曝露 1 →曝露 2 →プラセボとした。

プラセボ負荷前後では、負荷後、有意な症状の増強が認められた($p=0.045$)。この被験者では、プラセボのみで症状が強くなるパターンを呈している (Type 4)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較しても、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 8 について

負荷の順序は：曝露 1 →プラセボ→曝露 2 とした。

プラセボ負荷前後では、負荷後、有意な症状の増強が認められた($p=0.046$)。この被験者では、症例 7 と同様、プラセボのみで症状が強くなるパターンを呈している (Type 4)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較しても、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 9 について

負荷の順序は：プラセボ→曝露 1 →曝露 2 とした。

プラセボ負荷前後、曝露2負荷前後では、症状の強さに有意な差は認められなかった。曝露1負荷前後の比較では、曝露後に有意な症状の変動が認められた($p=0.001$)(不完全な **Type 1**)。プラセボ負荷後、曝露1負荷後、曝露2負荷後の症状の強さを比較すると、**Freidman** 検定では、3群間に有意の差が認められていた($p=0.0000004$)。ボンフェローニの不等式で訂正しても、有意差が認められ、プラセボ負荷後は、他の2つの曝露負荷後に比べ、症状が強いことが認められた。ただし、この結果は負荷前の状態を反映しているものと考えられ、考慮出来ない結果と判断される。

表 A-1 曝露負荷前後における自覚症状の変化について

症例	年齢	性別	発症要因	プラセボ負荷前後の症状	曝露1負荷前後の症状	曝露2負荷前後の症状	Type
1	24	男性	化学研究室	×	×	○	1 不完全
2	27	女性	化粧品会社	×	○	×	1 不完全
3	27	男性	新築ビル	×	×	×	3
4	25	男性	化学研究室	×	×	×	3
5	35	女性	不明	×	○	○	1
6	26	女性	新築住居	×	×	×	3
7	32	男性	組織固定作業	○	×	×	4
8	30	男性	化学研究室	○	×	×	4
9	37	男性	建材作業	×	○	×	1 不完全

○：有意差あり

×：有意差なし

各症例の自覚症状スコアとその比較解析結果については表 A-2-1 ～A-2-9 を参照。

(3) 平成15年度症例の曝露検査結果：まとめ・小考察

本年度における混合負荷曝露前後の自覚症状の解析では、9名中、プラセボ負荷では、負荷前後における自覚症状スコアの有意な差が認められず、曝露1回目、曝露2回目のみで、自覚症状スコアの有意な差が認められる「**Type1**」に相当するのは、症例5の1名のみであった。また、プラセボ負荷では、負荷前後における自覚症状スコアの有意な差が認められず、曝露1回目あるいは曝露2回目のどちらかで、自覚症状スコアの有意な差が認められる、いわば「不完全な **Type 1**」が、症例1、症例2、症例9の3名、プラセボ負荷のみで、自覚症状スコアの有意な差が認められる「**Type 4**」に相当したものは、症例7、症例8の2名、症例3、症例4、症例6については、いずれの負荷においても自覚症状スコアに有意な差が認められない「**Type 3**」に相当した。よって、プラセボ負荷においては、症状の出現・悪化は認めないが、混合負荷においてのみ自覚症状の出現・悪化が認められた症例が存在したものの（曝露1回目・曝露2回目の再現性に乏しい不完全な症例も含めて）、日常的に化学物質に対し

て過敏性を有すると自覚している被験者の特徴を捉えるのに、前年度まで施行したホルムアルデヒド単独負荷と比較して、ホルムアルデヒド+トルエン混合負荷が、より有利であるという結果を得ることは出来なかった。

即ち、日常的に化学物質に対して過敏性を有すると自覚している多種多様な愁訴を呈する集団から、それらの愁訴が、微量化学曝露がどの程度関与しているかについて、高い信頼性をもって評価するのは、曝露負荷前後における自覚症状の比較のみでは、困難であるということを今回の結果は示していると判断できる。

B. バイタル所見、および呼吸機能検査（ピークフロー）

すべてのバイタル検査は入室30分間を過ごして、安定化した後に実施した。

(1) 脈拍数

負荷前後の脈拍数を表B-1に示した。プラセボを含めて、ガス負荷後に脈拍数の変動は被験者間で一定の傾向は認めず、負荷後の脈拍数の変動について、t検定を用いて比較したが、各群間には有意差は認められなかった。ガス負荷による自覚症状の出現は、この負荷に対する緊張よりも高いときに、初めてスコアに表現されることを示していると考えられた。

(2) 血圧

プラセボを含めてすべてのガス負荷で、負荷後に血圧の低下を示している傾向が認められた(表B-2)。その血圧の変動値をt検定で比較を行ったが有意差が認められなかった。被験者がガス負荷に対して緊張感をもって臨んでいることが分かる。

(3) 体温

表B-3に示すように、負荷後体温の低下を示す患者は、プラセボ負荷で9名中3名であり、曝露1回目で3名、曝露2回目では2名であった。その体温の低下値を比較したが、t検定で有意差が認められなかった。体温上昇は、プラセボでは9名中4名、曝露1回目では5名、曝露2回目では2名であった。いずれにせよ、一般生理学的変動の範囲内であり、本負荷試験において体温解析が有用であるという結果は、今回得られなかった。

(4) 経皮的動脈酸素飽和度 (SPO₂)

表B-4に示すように、各群間のt検定ではまったく有意差が認められなかった。しかし、本態性多種化学物質過敏状態の患者に負荷試験を行い、肺機能、PCO₂、PO₂を測定した結果では、過換気が生じ、PCO₂が減少したが、PO₂は変化を示さなかったとの報告(Leznoff A: Provocative challenges in patients with multiple chemical sensitivity. J Allergy & Clinical Immunol 99: 438-442, 1997)があり、不安からの過換気によるものとしているが、本年度の結果では過換気を呈したと判

断できる例は認めなかった。

(5) 呼吸機能検査（ピークフロー）

ガス負荷前後における気道抵抗変動の評価としてピークフロー値を評価した。表 B-5 に示すように、プラセボ負荷も含め負荷後低下する傾向が認められた。特に曝露 1 回目では、9 名中 6 名において低下が認められた。しかし、統計学的群間比較では（t 検定）、有意な差は認めなかった。

本態性多種化学物質過敏状態の呼吸器症状については、すでに関心が持たれてきている。上部気道に関しては、反応性気道機能障害症候群（**reactive airway dysfunction syndrome**）や反応性上部気道機能障害症候群（**reactive upper airway dysfunction syndrome**）と本態性多種化学物質過敏状態が重なり合うところが多い疾患であることが報告されている（**Meggs WJ: Hypothesis for induction and propagation of chemical sensitivity based on biopsy studies. Environ Health Perspective 105: Suppl 2: 473-478, 1997**）。上気道の粘膜上皮の障害、末梢神経線維の増殖などを報告している。その他にも、本態性多種化学物質過敏状態の呼吸器障害についての展望もなされている（**Bascom R: Multiple chemical sensitivity: a respiratory disorder. Toxicol & Indust Health 8: 221-228**）。

IV. 考 察

本態性多種化学物質過敏状態の発症機序、本態、さらにはその存在についてさえ、なお議論が続けられている。本研究は前年度までの（平成 12 年～平成 14 年度）の二重盲検曝露負荷研究の結果・検討会における討議・本症に関する内外の研究動向を踏まえて、微量化学物質負荷による被験者の症状誘発を確認するために行われた。可能な限り前年度における研究協力者の再入院検査を行う予定であったが、種々の都合で 2 名のみが可能であった（症例 5、症例 9）。

本年度は、これまで検討されていなかった混合曝露負荷試験としたところが、研究デザインの特徴である。また、これまでの研究結果から、解析が煩雑であり、かつ、現時点での科学的評価・一定のコンセンサスに耐えることの難しい検査項目は評価せず、「自覚症状の誘発の有無」に最大重点をおいて検討を加えた。

自覚症状の単純な総スコアの集計・統計学的解析では、これまでのホルムアルデヒド単独負荷と同様、混合曝露負荷が、プラセボ負荷に比べて悪化を示す症例が認められたものの、微量化学物質負荷が被験者の自覚症状を悪化させているという十分な証拠を提出するには十分な結果を得ることは出来なかった。

即ち、これらの結果は、多種化学物質に対して過敏状態を有すると自覚している集団では、個々において身体的・精神的に非常に不安定な状態にあり、自覚症状の群間比較から一定の傾向・知見を得ることが困難であることを示している。

一方、負荷前後における他覚的検査においては、これら被験者の状況に多くの示唆

を示す情報が得られたものの、結果のごとく、微量化学物質曝露により生理学的パラメータが有意に変動するという解釈は困難であった。しかしながら、昨年度までの結果と同様に、被験者がガス負荷に対して非常に緊張をもって臨んでいること、プラセボ負荷終了後、混合曝露負荷後ともに、血圧・脈拍数は変動する傾向を示し、化学物質負荷により引き起こされる反応が、化学物質負荷試験に対する緊張からの反応より強い時にのみ変動が検出され得ることは継続して示唆された。また、体温の変動に関しては、本年度の結果は、生理的変動の範囲であると解釈された。

負荷前後の気道抵抗値の変動（ピークフロー検査）に関しては、昨年までと同様、負荷後に気道抵抗の増加が認められる傾向は存在したが、統計学的有意差は見出せなかった。しかし今後の病態解析の一助となる検査項目ではあるとは判断された。

本態性多種化学物質過敏状態を有する被験者の多様性と不安定性のために、本年度はじめて施行した混合曝露負荷においても、各自覚症状スコアの変動に科学的に有意な結論は見出せなかった。微量化学物質曝露で自覚症状を呈する集団が存在することに間違いはないが、被験者の内容は非常に変化に富んでおり、曝露負荷試験のみで、本症の病態解析を行うことの難さが再度浮き彫りになった。

V. 結論と今後の課題

本年度の研究は、昨年度までの研究を踏まえ、ごく微量の混合化学物質曝露による症状誘発の有無を確認するために施行した。

昨年度の結論と同様、本態性多種化学物質過敏状態と診断された集団の中には、様々な状態の患者が混在し均一な集団ではなく、今回の結果からも、ごく微量（混合曝露でガイドライン値の半分以下）のホルムアルデヒド+トルエンの曝露と被験者の症状誘発との間に、統計学的に有意差をもった関連性は、確認出来なかった。

次年度は、これまでの研究結果の総括として、集団の詳細な臨床的分類を行った上での曝露負荷試験結果の再評価、本研究以外で施行された被験者の検査結果（薬物代謝酵素の遺伝子多型性、神経学的検査、負荷前後における血中タキキニン（サブスタンス-P）濃度変化、生活環境調査など）を加味した再評価を施行し、二重盲検法における本症の病態解析に関わる有用性について最終的結論を出したいと考えている。

VI. 本研究に関連した本年度（平成 15 年度）の研究発表

- 1) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲：化学物質過敏症の見方・考え方（1）—環境化学物質感受性のジェネティクスとエピジェネティクス—、神経眼科、20（3）：350—354、2003
- 2) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲：化学物質過敏症の見方・考え方（2）—神経内分泌免疫学からみた化学物質過敏症—、神経眼科、20（4）：457—460、2003

- 3) 坂部 貢 : 環境化学物質の免疫毒、科学、74 (1) : 50-52、2003
- 4) 坂部 貢 : シックハウス症候群と化学物質過敏症—オーバービュー—、アレルギー・免疫、10 (12) : 15-19、2003
- 5) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲 : 化学物質過敏症の治療と対策、アレルギー科、16 (2) : 163-165、2003
- 6) 石川 哲、坂部 貢、宮田幹夫、鈴木幸男 : Sick house syndrome、呼吸器科、4 (4) : 363-368、2003

表 A-2-1 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	10	10	14	9	11	10
筋肉の痛み	10	8	15	9	11	10
けいれん	0	0	0	7	0	0
こわばり	0	0	0	0	0	0
鼻と眼の刺激	6	6	11	16	12	12
しみる感じ	0	0	0	0	0	0
舌がぴりぴりする	5	0	0	0	0	0
息苦しい	16	19	9	19	4	10
どうき	19	23	11	12	12	11
脈の異常	7	15	9	8	0	0
お腹の不快感	7	8	9	6	10	9
吐き気	16	12	8	12	16	11
気持ちが悪い	12	19	10	12	10	17
頭がぼーっとする	16	18	26	43	10	15
眠い あくび	31	19	26	30	5	11
いらだち気味	22	9	8	10	8	10
体がだるい	33	30	19	21	6	13
意欲低下	15	19	20	7	7	15
頭痛 重い感じ	20	18	23	6	6	15
頭痛	7	15	6	0	0	0
めまい	6	19	8	0	10	10
ふらつき	6	23	9	8	9	10
発疹 かゆみ	23	26	16	5	22	23
口やのどの乾き	6	31	12	7	11	10
手足の冷たい感じ	0	0	0	0	0	2
合計/2500	293	347	269	247	180	224

p=	0.204	0.531	0.028
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.041		
	(Friedman test)		

表 A-2-2 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	0	0	0	0	0	0
筋肉の痛み	0	0	0	0	0	0
けいれん	0	0	0	0	0	0
こわばり	0	1	0	0	0	0
鼻と眼の刺激	3	1	0	11	4	16
しみる感じ	0	0	0	0	0	0
舌がぴりぴりする	0	0	0	0	0	0
息苦しい	0	0	0	0	0	0
どうき	0	0	0	0	0	0
脈の異常	0	0	0	0	0	0
お腹の不快感	3	2	0	0	4	2
吐き気	0	0	0	6	0	2
気持ちが悪い	2	0	0	17	4	11
頭がぼーっとする	0	2	0	30	0	0
眠い あくび	0	0	0	0	0	0
いらだち気味	0	1	0	0	0	7
体がだるい	0	2	0	37	0	0
意欲低下	0	0	0	23	1	2
頭痛 重い感じ	0	0	0	32	0	0
頭痛	0	0	0	18	0	0
めまい	1	0	0	0	0	0
ふらつき	2	0	0	0	1	0
発疹 かゆみ	2	1	0	0	0	0
口やのどの乾き	1	6	0	35	7	30
手足の冷たい感じ	0	0	0	0	0	1
合計/2500	14	16	0	209	21	71

p=	1.000	0.011	0.057
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.232		
	(Friedman test)		

表 A-2-3 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	0	0	0	0	0	0
筋肉の痛み	0	0	9	8	0	0
けいれん	0	0	0	0	0	0
こわばり	0	0	0	0	0	0
鼻と眼の刺激	0	0	0	0	0	0
しみる感じ	0	0	0	0	0	0
舌がぴりぴりする	0	0	0	0	0	0
息苦しい	0	0	0	0	0	0
どうき	0	0	0	0	0	0
脈の異常	0	0	0	0	0	0
お腹の不快感	0	0	0	0	0	0
吐き気	0	0	0	0	0	0
気持ちが悪い	0	0	0	0	0	0
頭がぼーっとする	0	2	0	30	0	11
眠い あくび	0	0	10	12	0	0
いらだち気味	0	0	0	11	0	0
体がだるい	0	0	8	14	0	0
意欲低下	0	0	0	0	0	0
頭痛 重い感じ	0	0	0	0	0	0
頭痛	0	0	0	0	0	0
めまい	0	0	0	0	0	0
ふらつき	0	0	0	0	0	0
発疹 かゆみ	0	0	0	0	0	0
口やのどの乾き	0	0	0	0	0	0
手足の冷たい感じ	0	0	0	0	0	0
合計/2500	0	0	27	45	0	11

p=	1.000	0.144	1.000
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.074		
	(Friedman test)		

表 A-2-4 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	0	0	0	0	0	0
筋肉の痛み	0	0	0	0	0	0
けいれん	0	0	0	0	0	0
こわばり	0	0	0	0	0	0
鼻と眼の刺激	0	0	0	0	0	0
しみる感じ	0	0	0	0	0	0
舌がぴりぴりする	0	0	0	0	0	0
息苦しい	0	0	0	0	0	0
どうき	0	0	0	0	0	0
脈の異常	0	0	0	0	0	0
お腹の不快感	0	0	0	0	0	0
吐き気	0	0	0	0	0	0
気持ちが悪い	0	0	0	0	0	0
頭がぼーっとする	0	2	1	8	0	2
眠い あくび	0	3	2	7	0	2
いらだち気味	0	0	0	0	0	0
体がだるい	0	0	0	0	0	0
意欲低下	0	0	0	0	0	0
頭痛 重い感じ	0	0	0	0	0	0
頭痛	0	0	0	0	0	0
めまい	0	0	0	0	0	0
ふらつき	0	0	0	0	0	0
発疹 かゆみ	0	0	0	0	0	0
口やのどの乾き	0	0	0	0	0	0
手足の冷たい感じ	0	0	0	0	0	0
合計/2500	0	5	3	15	0	4

p=	1.000	1.000	1.000
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.156		
	(Friedman test)		

表 A-2-5 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	0	0	0	0	0	0
筋肉の痛み	0	0	0	0	0	0
けいれん	0	0	0	0	0	0
こわばり	0	0	0	0	0	0
鼻と眼の刺激	25	25	0	0	0	0
しみる感じ	25	26	0	26	0	25
舌がぴりぴりする	0	0	0	0	0	0
息苦しい	0	0	0	25	0	15
どうき	0	0	0	0	0	0
脈の異常	0	0	0	0	0	0
お腹の不快感	0	0	0	0	0	0
吐き気	0	0	0	0	0	0
気持ちが悪い	0	0	0	0	0	0
頭がぼーっとする	27	26	0	25	0	50
眠い あくび	24	25	22	26	0	0
いらだち気味	0	0	0	0	0	33
体がだるい	24	0	22	50	25	0
意欲低下	0	0	0	0	0	0
頭痛 重い感じ	24	24	24	25	24	50
頭痛	27	33	25	28	11	75
めまい	0	0	0	0	0	0
ふらつき	0	0	0	0	0	0
発疹 かゆみ	0	0	0	0	0	0
口やのどの乾き	0	0	0	0	0	0
手足の冷たい感じ	50	59	15	75	10	65
合計/2500	226	218	108	280	70	313

p=

0.596

0.017

0.030

(Wilcoxon signed-ranks test)

p=

0.590

(Friedman test)

表 A-2-6 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	0	0	0	0	0	0
筋肉の痛み	0	0	0	0	0	0
けいれん	0	0	0	0	0	0
こわばり	0	4	7	0	0	0
鼻と眼の刺激	6	2	0	0	5	0
しみる感じ	0	0	0	0	0	0
舌がぴりぴりする	0	0	0	0	0	0
息苦しい	0	0	0	0	0	0
どうき	0	0	0	0	0	0
脈の異常	0	0	0	0	0	0
お腹の不快感	0	0	26	26	0	0
吐き気	0	0	0	0	0	0
気持ちが悪い	0	0	0	0	0	0
頭がぼーっとする	0	0	0	0	0	0
眠い あくび	0	0	0	0	0	0
いらだち気味	0	0	0	0	0	0
体がだるい	0	0	0	0	0	0
意欲低下	0	0	0	0	0	0
頭痛 重い感じ	0	0	0	0	0	0
頭痛	0	0	0	0	13	16
めまい	0	0	0	0	0	0
ふらつき	0	0	0	0	0	0
発疹 かゆみ	57	63	58	66	75	75
口やのどの乾き	9	10	0	0	0	3
手足の冷たい感じ	60	70	56	74	55	58
合計/2500	132	149	147	166	148	152

p=	0.176	0.285	0.706
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.883		
	(Friedman test)		

表 A-2-7 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	0	0	0	0	0	0
筋肉の痛み	0	0	0	0	0	0
けいれん	0	0	0	0	0	0
こわばり	0	0	0	0	0	0
鼻と眼の刺激	0	6	9	22	0	0
しみる感じ	0	0	0	0	0	0
舌がぴりぴりする	0	0	0	0	0	0
息苦しい	0	0	0	0	0	0
どうき	0	0	0	0	0	0
脈の異常	0	0	0	0	0	0
お腹の不快感	7	14	0	0	24	24
吐き気	0	0	0	0	0	0
気持ちが悪い	0	0	50	41	0	0
頭がぼーっとする	7	14	74	50	10	50
眠い あくび	0	0	58	42	0	62
いらだち気味	0	0	0	0	0	0
体がだるい	7	4	75	50	24	20
意欲低下	0	0	24	0	0	0
頭痛 重い感じ	0	8	41	42	11	37
頭痛	0	0	50	67	0	50
めまい	0	0	22	0	0	0
ふらつき	0	0	23	0	0	0
発疹 かゆみ	0	0	0	0	0	0
口やのどの乾き	0	8	0	0	42	26
手足の冷たい感じ	0	0	0	0	0	0
合計/2500	21	54	426	314	111	269

p=	0.045	0.059	0.116
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.065		
	(Friedman test)		

表 A-2-8 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	0	0	0	0	0	0
筋肉の痛み	14	23	0	0	0	0
けいれん	0	0	0	0	0	0
こわばり	0	0	0	0	0	0
鼻と眼の刺激	0	0	0	1	0	3
しみる感じ	0	0	0	0	0	0
舌がぴりぴりする	0	0	0	0	0	0
息苦しい	0	0	0	0	0	2
どうき	0	0	0	2	0	3
脈の異常	0	0	0	0	0	0
お腹の不快感	0	0	0	0	0	0
吐き気	0	0	0	0	0	0
気持ちが悪い	0	0	0	0	1	0
頭がぼーっとする	23	45	2	4	5	5
眠い あくび	16	50	2	6	4	12
いらだち気味	10	15	0	0	0	0
体がだるい	10	42	2	4	5	0
意欲低下	10	25	0	0	0	0
頭痛 重い感じ	0	0	2	0	0	0
頭痛	0	0	0	0	0	0
めまい	0	0	0	0	0	0
ふらつき	0	0	0	0	0	0
発疹 かゆみ	0	0	0	0	0	0
口やのどの乾き	0	0	0	0	0	0
手足の冷たい感じ	0	0	0	0	0	0
合計/2500	83	200	8	17	15	25

p=	0.046	0.131	0.344
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.168		
	(Friedman test)		

表 A-2-9 各負荷前後における自覚症状の解析結果

	プラセボ		曝露 1 回目		曝露 2 回目	
	前	後	前	後	前	後
関節の痛み	50	50	26	20	50	50
筋肉の痛み	50	50	24	19	19	22
けいれん	73	77	25	18	20	20
こわばり	23	28	23	20	20	21
鼻と眼の刺激	68	78	27	19	24	36
しみる感じ	50	74	21	20	21	22
舌がぴりぴりする	30	75	27	17	20	37
息苦しい	72	70	25	18	22	23
どうき	27	28	23	20	25	22
脈の異常	23	29	23	19	25	20
お腹の不快感	22	25	24	19	19	17
吐き気	21	26	20	18	18	20
気持ちが悪い	72	26	26	22	19	19
頭がぼーっとする	69	50	23	24	18	42
眠い あくび	69	28	23	23	22	20
いらだち気味	27	24	22	23	21	20
体がだるい	72	41	20	22	50	50
意欲低下	50	50	22	22	20	17
頭痛 重い感じ	50	29	22	21	16	40
頭痛	74	28	18	18	50	50
めまい	50	68	27	23	20	22
ふらつき	72	65	27	21	20	20
発疹 かゆみ	50	50	23	23	20	17
口やのどの乾き	50	29	20	22	20	17
手足の冷たい感じ	25	23	22	22	17	18
合計/2500	1239	1121	583	513	596	662

p=	0.446	0.001	0.571
	(Wilcoxon signed-ranks test)		
p=	0.0000004		
	(Friedman test)		

表 B-1 各曝露前後における脈拍の変動

	プラセボ				曝露1回目				曝露2回目			
	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差
症例1	75	76		1	74	77		3	72	80		8
症例2	88	84	↓	-4	71	78		7	80	84		4
症例3	74	68	↓	-6	72	69	↓	-3	72	70	↓	-2
症例4	63	63		0	71	55	↓	-16	63	76		13
症例5	64	59	↓	-5	58	58		0	65	63	↓	-2
症例6	74	70	↓	-4	64	86		22	72	76		4
症例7	68	68		0	61	70		9	69	70		1
症例8	60	62		2	69	72		3	62	60	↓	-2
症例9	74	82		8	70	75		5	70	80		10
測定値 mean	71.11	70.22			67.78	71.11			69.44	73.22		
SD	8.48	8.79			5.47	9.73			5.57	8.09		
p		0.561				0.353				0.077		
差 mean				-0.89				3.33				3.78
SD				4.40				10.14				5.59
p								0.295				0.022

表 B-2 各曝露前後における血圧の変動

	プラセボ				曝露1回目				曝露2回目															
	収縮時		拡張時		収縮時		拡張時		収縮時		拡張時													
	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差												
症例1	106	96	↓	-10	66	72		6	104	120		16	70	82		12	132	122	↓	-10	78	78		0
症例2	90	90		0	58	64		6	102	102		0	68	72		4	98	98		0	64	70		6
症例3	108	106	↓	-2	72	70	↓	-2	114	114		0	72	76		4	110	102	↓	-8	76	68	↓	-8
症例4	106	104	↓	-2	72	72		0	100	98	↓	-2	66	64	↓	-2	106	102	↓	-4	74	66	↓	-8
症例5	102	100	↓	-2	60	62		2	104	96	↓	-8	64	58	↓	-6	100	100		0	58	60		2
症例6	110	122		12	78	80		2	126	122	↓	-4	78	84		6	122	120	↓	-2	76	72	↓	-4
症例7	92	102		10	64	66		2	98	94	↓	-4	70	70		0	98	90	↓	-8	68	64	↓	-4
症例8	110	104	↓	-6	48	46	↓	-2	110	106	↓	-4	59	58	↓	-1	120	110	↓	-10	68	60	↓	-8
症例9	120	118	↓	-2	86	78		-8	120	108	↓	-12	78	76	↓	-2	108	102	↓	-6	76	70	↓	-6
測定値 mean	104.89	104.67			67.11	67.78			108.67	106.67			69.44	71.11			110.44	105.11			70.89	67.56		
SD	9.28	10.00			11.36	10.12			9.59	10.25			6.19	9.55			11.91	10.40			6.79	5.81		
p	0.9268				0.6586				0.4609				0.3803				0.0039				0.0805			
差 mean				-0.22			0.67					-2.00			1.67									-3.33
SD				7.03			4.36					7.75			5.39									5.00
p												0.6801												0.010412227

表 B-3 各曝露前後における体温の変動

	プラセボ				曝露1回目				曝露2回目			
	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差
症例1	36.7	36.3	↓	-0.4	36.4	36.8		0.4	36.6	36.6		0
症例2	36.3	36.1	↓	-0.2	36.6	36.5	↓	-0.1	36.5	36.5		0
症例3	36.1	36	↓	-0.1	36.4	36.5		0.1	36.6	36.6		0
症例4	35.6	35.6		0	35.5	35.5		0	35.6	35.5	↓	-0.1
症例5	37	37		0	36.9	36.6	↓	-0.3	37	37		0
症例6	36.5	36.6		0.1	36.3	36.5		0.2	36.5	36.5		0
症例7	35.9	36.2		0.3	36	36.3		0.3	36.1	36.2		0.1
症例8	35.5	35.7		0.2	35.4	35.7		0.3	35.6	35.8		0.2
症例9	35.9	36.1		0.2	36.1	35.9	↓	-0.2	36.2	35.8	↓	-0.4
測定値 mean	36.17	36.18			36.18	36.26			36.30	36.28		
SD	0.50	0.43			0.49	0.45			0.47	0.49		
p		0.88357				0.36658				0.69529		
差 mean				0.01				0.08				-0.02
SD				0.22				0.24				0.16
p								0.57162				0.72873

表 B-4 各曝露前後における sPO₂ の変動

	プラセボ				曝露1回目				曝露2回目			
	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差
症例1	95	95		0	96	97		1	96	96		0
症例2	98	96	↓	-2	97	98		1	98	97	↓	-1
症例3	98	98		0	98	98		0	98	99		1
症例4	97	98		1	96	98		2	98	98		0
症例5	98	98		0	98	98		0	98	98		0
症例6	100	99	↓	-1	99	100		1	99	100		1
症例7	95	97		2	97	96	↓	-1	96	96		0
症例8	98	98		0	98	98		0	98	98		0
症例9	96	96		0	97	95	↓	-2	96	96		0
則定値 mean	97.22	97.22			97.33	97.56			97.44	97.56		
SD	1.64	1.30			1.00	1.42			1.13	1.42		
p		1				0.594				0.594		
差 mean				0.00				0.22				0.11
SD				1.12				1.20				0.60
p								0.729				0.782

表 B-5 各曝露前後におけるピークフローの変動

	プラセボ				曝露1回目				曝露2回目			
	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差	前	後	傾向	差
症例1	590	740		150	750	650	↓	-100	860	620	↓	-240
症例2	420	350	↓	-70	410	370	↓	-40	410	390	↓	-20
症例3	680	610	↓	-70	690	620	↓	-70	600	690		90
症例4	570	570		0	560	560	↓	0	550	600		50
症例5	440	440		0	440	430	↓	-10	440	430	↓	-10
症例6	400	320	↓	-80	400	370	↓	-30	400	380	↓	-20
症例7	490	440	↓	-50	500	460	↓	-40	495	500		5
症例8	500	540		40	530	550		20	540	570		30
症例9	410	440		30	460	460		0	430	420	↓	-10
測定値 mean	500.00	494.44			526.67	496.67			525.00	511.11		
SD	95.92	133.05			122.47	102.96			143.48	112.97		
p		0.8267				0.0443				0.6642		
差 mean				-5.56				-30.00				-13.89
SD				73.67				37.75				92.46
p								0.4291				0.8753

第2章 マウスを用いた動物モデルに関する研究

目 次

I. 研究結果の概要	37
II. 研究者及び研究協力者名簿	41
III. 研究結果報告	42
1. 吸入曝露装置および曝露条件	42
(1) 実験動物	42
(2) ホルムアルデヒド吸入曝露装置	42
(3) ホルムアルデヒドガス曝露方法	43
(4) ホルムアルデヒド曝露濃度評価	43
(5) トルエン吸入曝露装置	43
(6) トルエン蒸気曝露方法	43
(7) トルエン曝露濃度評価	43
(8) OVA感作	44
(9) 体重変化	44
2. ホルムアルデヒドおよびトルエン吸入曝露によるマウスのくしゃみ様症状の定量、およびトルエン代謝物の測定	50
(1) 研究要旨	50
(2) 目的	50
(3) 方法	50
(4) 結果	50
(5) 考察	51
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	57
(1) 研究要旨	57
(2) 研究目的	57
(3) 方法	58
(4) 嗅球ニューロンの解析	58
(5) 大脳辺縁系ニューロンの解析	59
(6) 考察	60
4. 脳内海馬での情報処理変化の検討	67
(1) 研究要旨	67
(2) 研究目的	68
(3) 研究方法	68

(4) 結果研究	70
(5) 考察	72
(6) 結論	73
5. トルエン吸入曝露によるマウスへの生体影響に関する病理組織学的検索	
—気道粘膜上皮の変化と炎症細胞の動態を中心として—	80
(1) 研究要旨	80
(2) 目的	80
(3) 方法	80
(4) 結果	81
(5) 考察	81
(6) 参考文献	82
6. トルエン長期曝露による視床下部—下垂体—副腎軸の変化	87
(1) 研究要旨	87
(2) 研究目的と経過	87
(3) 研究方法	87
(4) 研究結果	88
(5) 考察と結果	88
(6) 引用文献	88
(7) Abstract	89
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	93
(1) 研究要旨	93
(2) 研究目的	93
(3) 研究方法	94
(4) 結果	95
(5) 考察	96
(6) 参考文献	97
(7) Abstract	98

I. 研究結果の概要

平成 15 年度は、これまでの 3 年間の研究で得られた動物モデルでのホルムアルデヒド曝露による過敏状態の誘導を支持する指標のより詳細な検討を行うとともに、化学物質の特異性との関連、およびその過敏状態とアレルギー反応との相違について検索した。以下に、概要を示す。

1. 吸入曝露装置

ホルムアルデヒド吸入曝露装置は昨年度までの実験に使用したものと同様である。装置はホルムアルデヒドガス発生装置と、曝露チャンバーとから構成されている。また、トルエン吸入曝露装置は、トルエン蒸気発生装置と曝露チャンバー A、B の 2 基とから構成されている。

2. 行動毒性における影響

低濃度ホルムアルデヒド曝露によりくしゃみの増加がこれまでに観察されたが、今回の 50 ppm トルエン濃度ではくしゃみの誘発はみられなかった。トルエンの曝露指標として、尿中代謝産物である馬尿酸を測定した結果、曝露直後には高いレベルを示したが、翌日の曝露直前には正常レベルに戻っていた。

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

化学物質の低濃度長期曝露による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、ホルムアルデヒドに 3 ヶ月間連続的に曝露した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比較検討した。嗅球の解析では、嗅球糸球体に存在するドーパミンニューロンを観察した結果、Oppb (対照) 群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卵白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、Ca²⁺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。扁桃体におけるこれらの陽性ニューロンは GABA と共存する抑制性ニューロンであるとの報告があり、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、アレルギーモデルマウスで、Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンが多くなる傾向を示した。

以上、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 Ca²⁺結合タンパク質陽性ニ

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^{2+} 結合タンパク質の発現も増加し、この免疫染色陽性ニューロン数も増加したものと思われる。

4. 脳内海馬での情報処理変化の検討

これまで、2000ppb ホルムアルデヒド濃度においては、海馬での形態学的に顕著な変化は認められなかったが、神経細胞内リン酸化酵素活性の変化というシグナルトランスダクションの変化、海馬神経細胞シナプスの可塑性の変化、GABA 抑制系の減弱を報告してきた。

今年度は、MCS と診断された患者にアレルギー性疾患の既往が多いという疫学的報告があることから、ホルムアルデヒド曝露による海馬における長期増強 (long-term potentiation, LTP) の変化と生物学的因子 (アレルゲン投与) による影響との異動について解明することが課題となった。アレルギーモデルとして一般的な卵白アルブミン感作モデルマウスを用いた。Input/Output 曲線と LTP を群間で比較した結果、400ppb 濃度のホルムアルデヒド曝露と卵白アルブミン感作の単独および重複付加いづれも Input/Output 曲線および LTP 増強度に影響しなかった。次に、MCS 患者による中枢神経関連の愁訴のなかに不安が報告されている。2000ppb ホルムアルデヒドを1-2週間曝露した雌 C3H/HeN マウスを用いての行動試験として、活動性・探索行動を評価するオープンフィールド試験、加えて不安行動を評価する高架プラス迷路試験、空間学習を評価するラシュリー迷路試験、回避学習を評価する受動的回避学習試験、侵害受容 (痛覚) を評価するホットプレート試験の5試験を行った。その結果、マウスへの慢性ホルムアルデヒド曝露は、不安を増強し、回避学習を促進するが、一般活動性、空間学習機能、侵害受容には影響しないことが示唆された。

5. その他の影響

トルエン曝露およびアレルギーモデルとしての OVA 感作マウスの気道系を中心とした病理学的検索を実施した。その結果、鼻腔呼吸上皮において OVA 感作群では好酸球の浸潤を認めたが、トルエン曝露の影響は観察されなかった。また、粘液産生細胞である杯細胞の出現頻度ではトルエン単独群、OVA 感作群で増加がみられた。気管・肺の組織においては、OVA 感作により杯細胞の増生、肥満細胞の上皮内への浸潤を認めたが、トルエン曝露による修飾作用は観察されなかった。以上、今回曝露に用いたトルエン濃度では、顕著な炎症像は認められなかった。

6. トルエン長期曝露による視床下部-下垂体-副腎軸の変化

これまでに、低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露およびアレルギー反応はともにストレスアースとして視床下部-下垂体-副腎軸に影響を及ぼすことを明らかにした。このような影響がホルムアルデヒド特異的に誘導されるのか否かを検討するために、MCS 発症に関与すると考えられている低濃度トルエンの長期曝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)神経細胞と下垂体の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、計量計測法と RT-PCR 法により解析した。マウスは、非アレルギー(NAG)群と卵白アルブミン感作したアレルギーモデル (AG) 群からなる。それぞれの群は、3ヶ月間 0ppm (清浄空気) の対照群と 50ppm のトルエン曝露群に分かれる。室旁核の CRH-免疫陽性(-ir)神経細胞数は、非アレルギー群の比較では対照群に比べトルエン曝露群で増加していた。非アレルギーの対照群に比べアレルギーモデルのトルエン曝露群でも増加していた。下垂体前葉の ACTH-ir 細胞数は、非アレルギー群では対照群に比べトルエン曝露群で増加していた。また、非アレルギーの対照群に比べアレルギーモデルのトルエン曝露群でも増加していた。下垂体前葉の ACTH-mRNA 発現量は、非アレルギー群では対照群に比べトルエン曝露群で増加がみられた。アレルギー群でも対照群に比べトルエン曝露群で増加していた。

このように、低濃度のトルエンとアレルギー感作は、共にストレスラーとして視床下部—下垂体—副腎軸に影響を与えると考えられるが、低濃度のホルムアルデヒド曝露でみられたアレルギー感作との相乗的な作用はみられなかった。

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機構への免疫—神経軸を介した影響についての検討

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・相乗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、免疫関連の指標について化学物質の特異性の有無を検討した。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誘導されたドーパミン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、NMDA型グルタミン酸受容体 ϵ 1及び ϵ 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。

これらの結果から、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が示唆された。

以上、平成 15 年度のまとめとして、低濃度ホルムアルデヒド曝露による脳神経—免疫軸への作用は、病理学的変化のみられない濃度のトルエンを曝露したときにみられる作用とは異

なる可能性が示唆された。また、アレルギーモデルにおける嗅覚、大脳辺縁系の変動はわずかではあるが、低濃度化学物質曝露とアレルギー状態の共存とにより、より脳神経—免疫軸への作用を増強させることも示された。今後は、アレルギー状態の併用効果に見られる機構の解明、化学物質特異性に係わる遺伝的な素因の検討、低濃度複合化学物質曝露による影響解明により低濃度化学物質による真の過敏状態誘導の有無を明らかにすることが可能と考える。

II. 研究者及び研究協力者名簿

1. 吸入曝露装置および曝露条件

櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部
保利 一 産業医科大学産業保健学部
嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部

2. ホルムアルデヒドおよびトルエン吸入曝露によるマウスのくしゃみ様症状の定量、およびトルエン代謝物の測定

櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部
嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部

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

市川 眞澄 (財) 東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所
林 洋 (財) 東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所

4. 脳内海馬での情報処理変化の検討

笛田由紀子 産業医科大学産業保健学部第1 生体情報
黒河 佳香 独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域
吉田 安宏 産業医科大学医学部免疫学
栗生 修司 九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報
竹田 勝一 九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報

5. トルエン吸入曝露によるマウスへの生体影響に関する病理組織学的検索 —気道粘膜上皮の変化と炎症細胞の動態を中心として—

佐藤 房枝 産業医科大学産業保健学部
櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部
嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部

6. トルエン長期曝露による視床下部—下垂体—副腎軸の変化

佐々木文彦 大阪府立大学大学院
ドウイケマサ 大阪府立大学大学院
桑原 佐知 大阪府立大学大学院

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

藤巻 秀和 独立行政法人国立環境研究所
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
櫻田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

Ⅲ. 研究結果報告

1. 吸入曝露装置および曝露条件

研究協力者：樺田尚樹・石田尾徹・保利 一・嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

今年度は、昨年度までのホルムアルデヒドを中心とした曝露において認められた現象の再現性の確認と機序解明を目的に曝露実験を実施した。加えて、これらの現象がホルムアルデヒドに特異的なものであるのか、あるいはその他の化学物質による曝露によっても同様に認められるのかを検討した。そのために、ホルムアルデヒド同様に化学物質過敏状態との関係が懸念され、曝露機会も非常に多いトルエンについてホルムアルデヒド同様の **12** 週間吸入曝露実験を実施した。

ホルムアルデヒドおよびトルエンの吸入曝露は、昨年までと同様に産業医科大学・産業保健学部において行った。なお、動物実験の実施にあたっては、産業医科大学・動物実験および飼育倫理委員会に申請を行い許可を得たうえで実施した。

以下に曝露方法の概要を示す。

（1）実験動物

実験動物は、日本チャールス・リバー(株)の**C3H/HeN** 雌性マウスを使用し、**10**週齢より曝露開始した(図1)。次項以降の各実験課題項目のグループわけと各群の使用マウス匹数を表1に示す。

マウスは、ホルムアルデヒド **2000ppb** 曝露群、**400ppb** 曝露群、トルエン **50ppm** 曝露群およびコントロール群の **4** 群に分け、曝露群には調整したホルムアルデヒドガスあるいはトルエンを、また、コントロール群には清浄空気のみを曝露した。

（2）ホルムアルデヒド吸入曝露装置

吸入曝露装置は昨年までの実験と同様である。吸入曝露実験装置の概略図（図2）を示す。装置はホルムアルデヒドガス発生装置と、曝露チャンバーとから構成されている。

ホルムアルデヒドガスの発生には、パラホルムアルデヒドからの昇華現象を利用したホルムアルデヒドガス発生装置**(1)**を用いた。この装置を一定温度の室内（**20℃**）に設置し、空気を通じることにより、一定濃度のホルムアルデヒドガスを発生させた。ガスの発生量はパラホルムアルデヒドの充填量および空気流量でコントロールした。

曝露チャンバー（容積 **400L**）**(6)**はステンレス製で、下部に尿・糞を廃棄処理するための容器と配管**(7)**が取り付けられている。また、チャンバー側面には、内部の空気をサンプリングするためのガス採取口が取り付けられている。このチャンバーの下部は常設の排ガス処理装置**(9)**に接続されており、ブローア**(10)**を用いて処理された空気を排気することにより、チャンバー上部から **HEPA** フィルター**(8)**を通した室内空気を希釈空気として導入する。ホルムアルデヒドガスを含む空気は、チャンバー上部の **T** 字型の配管部の側面から

導入され、希釈空気と混合されてチャンバー内に入る。

(3) ホルムアルデヒドガス曝露方法

ホルムアルデヒドの吸入曝露時間は午後 5 時 30 分から翌朝 9 時 30 分までの夜間帯 16 時間とし、最大 3 ヶ月の曝露を行った (図 3)。また、曝露中は自由飲水・摂食(CE-2 日本クレシア株式会社)とした。なお曝露室の照明は午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の 12 時間サイクルとした。

(4) ホルムアルデヒド曝露濃度評価

チャンバー内曝露濃度は化学分析により評価した。すなわち 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) を含浸したシリカゲルカラム (Waters Sep-Pak XPoSure™ Aldehyde Sampler) に気中ホルムアルデヒドを捕集し、アセトニトリルで溶出後、高速液体クロマトグラフィーにて分離・定量を行った。その結果、曝露期間中の平均濃度および標準偏差は、2000ppb 曝露では 2002 ± 31 ppb、400ppb 曝露では 401 ± 11 ppb であった (図 4)。

(5) トルエン吸入曝露装置

吸入曝露実験装置の概略図を示す(図 5)。装置は、トルエン蒸気発生装置と曝露チャンバー A、B の 2 基とから構成されている。

蒸気発生装置 (4) にトルエンを入れ、直接清浄空気バブリングすることによりトルエン蒸気を発生させた。蒸気発生量は恒温槽 (3) の温度と空気流量 (2) でコントロールできる。

曝露チャンバー A、B (容積 100L) (5) はステンレス製で、下部に尿・糞を廃棄処理するための容器 (6,7) が取り付けられている。また、チャンバー側面には、内部の空気をサンプリングするためのガス採取口が取り付けられている。このチャンバーの下部に接続されたポンプで空気を排気することにより、チャンバー上部から室内空気を希釈空気として導入する。トルエン蒸気を含む空気は、チャンバー上部の T 字型の配管部の側面から導入され、希釈空気と混合されてチャンバー内に入る。

(6) トルエン蒸気曝露方法

トルエン蒸気の吸入曝露はホルムアルデヒドと異なり、曝露時間は午前 10 時から午後 4 時までの昼間帯 6 時間とし、最大 3 ヶ月の曝露を行った (図 3)。また、曝露中は自由飲水・摂食(CE-2 日本クレシア株式会社)とした。曝露終了後は汚染した餌・水からの経口摂取の可能性をなくすために毎回新規の餌・水に置き換えた。

(7) トルエン曝露濃度評価

チャンバー側面のガス採取口から自動ガスサンプラー (GL Sciences, GS-5000AP) を用いて定期的に空気をサンプリングし、FID 付ガスクロマトグラフ (GL Sciences, GC353B) で濃度を測定した。その結果、設置したチャンバー A、B の曝露期間中の濃度は、それぞれ 51.0 ± 1.4 、 50.3 ± 1.8 ppm であった(図 6)。

(8) OVA 感作

実験群は、ホルムアルデヒド曝露単独分に加え、昨年同様に卵白アルブミン(OVA)感作を行ったアレルギー性炎症モデルの群を設けた(図6)。すなわち OVA の感作は、初回はホルムアルデヒド曝露開始時に OVA とアルミニウムの混合液の腹腔内投与を行い、その後は曝露期間中に 3 週間毎に生理食塩水に溶解した OVA のみを、臨床用吸入器を改良したエアロゾル発生装置と曝露装置を用いて 1 回あたり 6 分間吸入曝露した (図7)。

(9) 体重変化

12 週間曝露期間中の C3H/HeN マウスの体重変化はホルムアルデヒド曝露群、コントロール群ともに順調な体重増加を認め、両群に相違は認めなかった(図8)。トルエン曝露においては、曝露期間の 2,3,4,5,6,7 週において、一時的にトルエン 50ppm&OVA 一群において、Cont (0ppm&OVA-) に対し有意水準 5% で有意に体重が大きい時期があるがその後の体重増加を含め全体的には差は認めなかった (図9)。

以上、まとめると今年度も非常に安定した曝露が実施され、曝露期間中の感染等の兆候も認めなかった。またホルムアルデヒドおよびトルエン曝露による有意な体重増加の変化は認められなかった。これらのマウスを以下の項目の実験に供し各検討を行った。

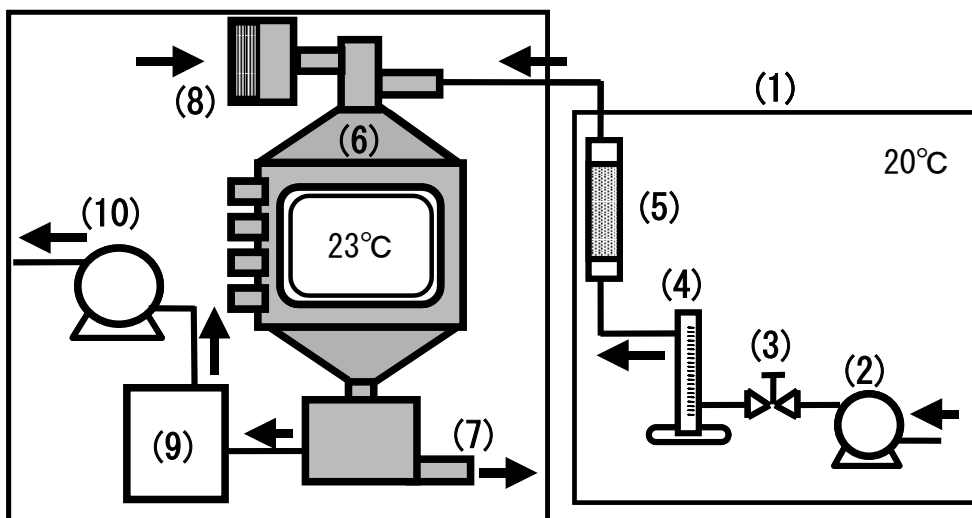
図1 実験動物

日本チャールスリバー
・ C3H/HeN
メスを8週齢で購入、
10週齢より曝露

表1 実験群 (匹数)

課題	OVA有無	Control	トルエン	ホルムアルデヒド	
		0	50ppm	400ppb	2000ppb
嗅球・扁桃体	OVA-	5		5	5
	OVA+	5		5	5
視床下部・下垂体	OVA-	10	10		
	OVA+	10	10		
免疫系	OVA-	12	12	12	
	OVA+	10	10	10	
くしゃみ	OVA-	20			20
海馬	拘束のみ	10			
	OVA-	10		10	6
	OVA+	10		10	6
行動	OVA-	10			10
合計	OVA-	77	22	27	41
	OVA+	35	20	25	11
総計		112	42	52	52

図2 吸入曝露装置の概略図



- (1):ホルムアルデヒドガス発生装置 (2):ポンプ (3):バルブ
 (4):流量計 (5):試料充填セル (6):吸入曝露チャンバー
 (7):セパレータ (8):HEPAフィルター (9):排ガス処理装置
 (10):ブローア

図3 曝露タイムスケジュール

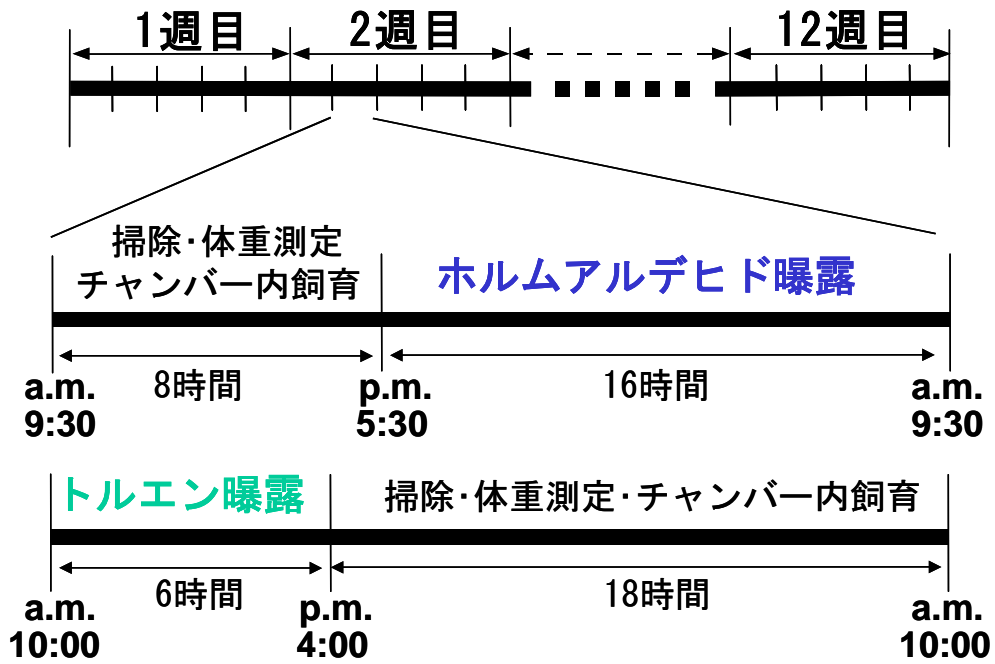


図4 チャンバー内ホルムアルデヒド濃度

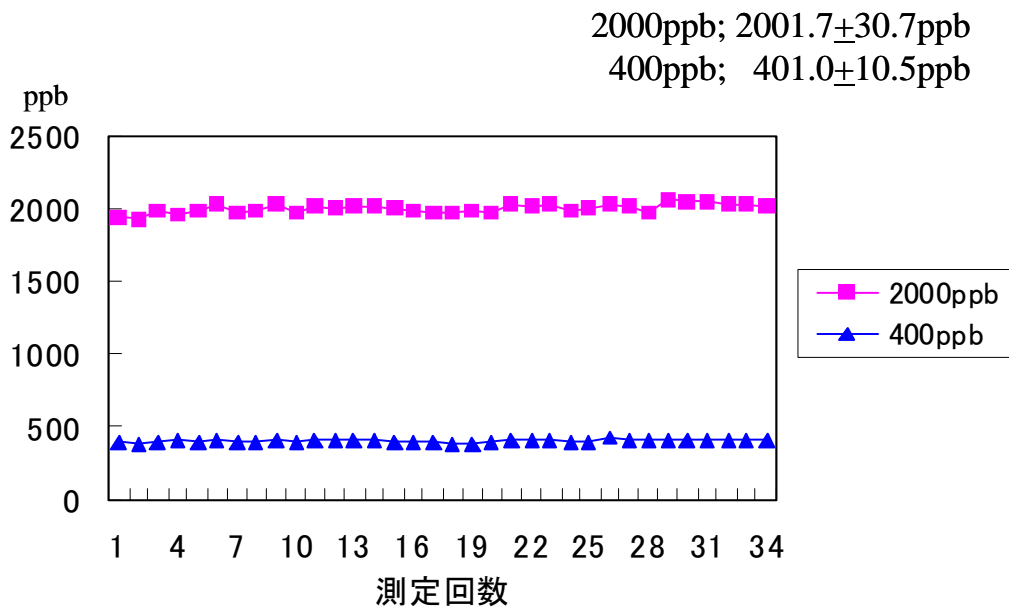
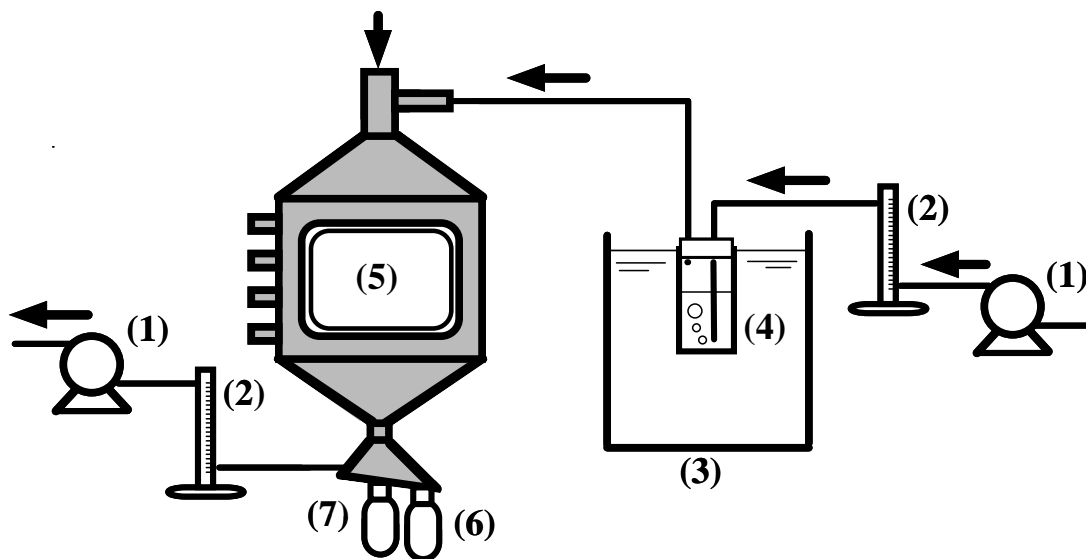
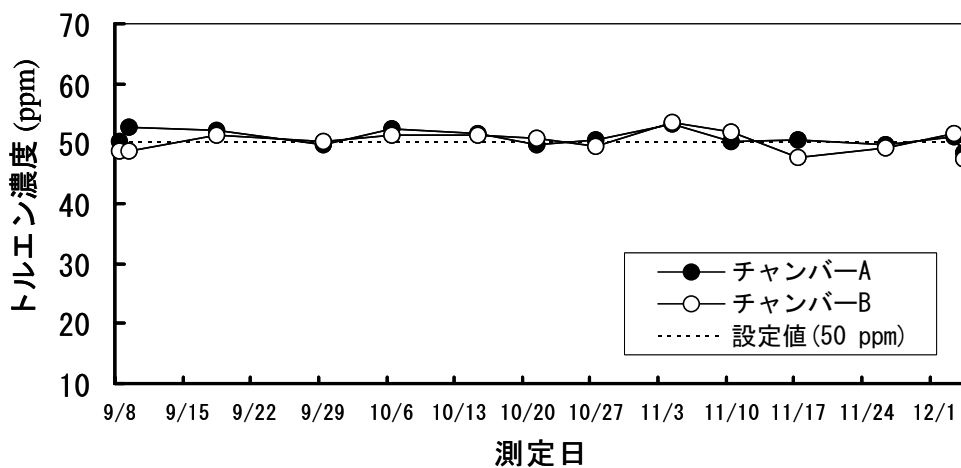


図5 トルエン吸入曝露装置の概略図



- (1):ポンプ (2):流量計 (3):恒温槽 (4):蒸気発生装置
 (5):曝露チャンバー (6):尿採取ビン (7):糞採取ビン

図6 チャンバー内トルエン濃度の測定結果



Chamber A; 51.0 ± 1.4 ppm
 Chamber B; 50.3 ± 1.8 ppm

図7 アレルギー性疾患モデルのOVA感作

曝露開始時 (第0週)	第3週	第6週	第9週	第11週	第12週終了後
↑	↑	↑	↑	↑	↓
OVA + Alum (ip)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	解剖

図8 体重変化(ホルムアルデヒド曝露群)

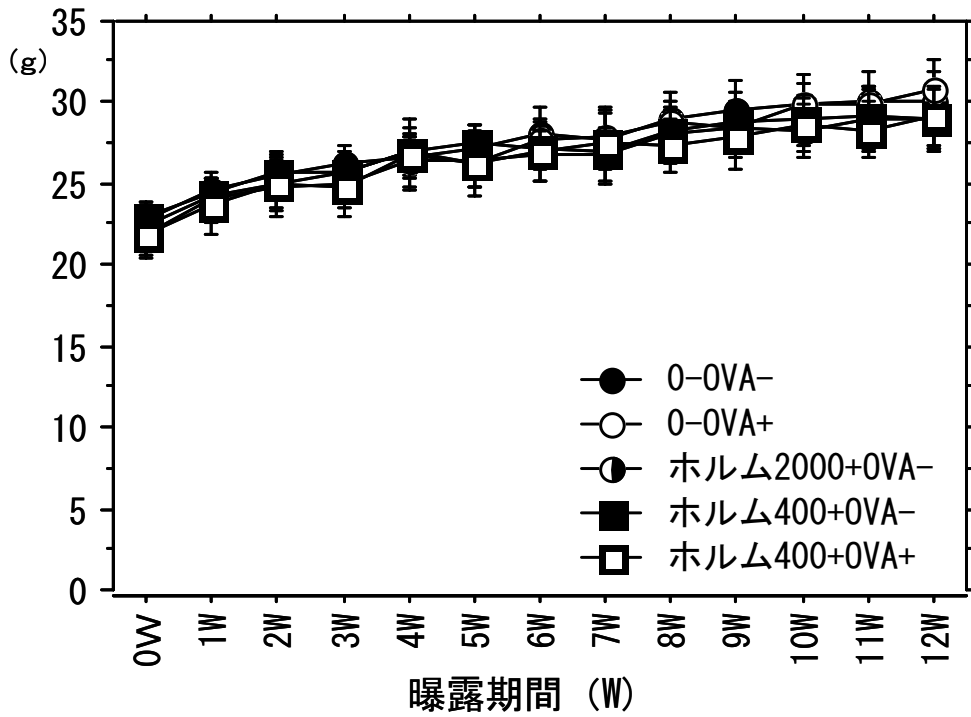
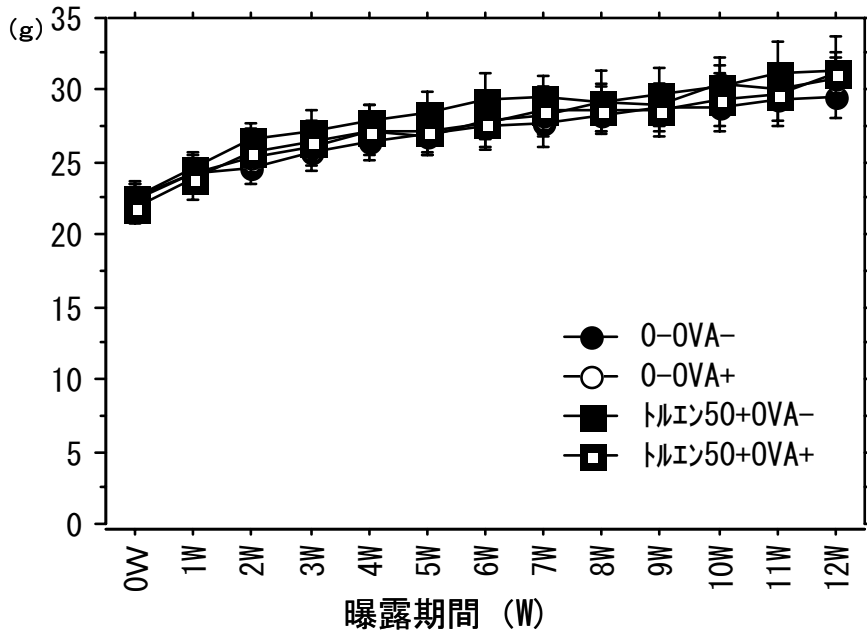


図9 体重変化(トルエン曝露群)



2. ホルムアルデヒドおよびトルエン吸入曝露によるマウスのくしゃみ様症状の定量、およびトルエン代謝物の測定

研究協力者：樺田尚樹・嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

（1）研究要旨

ホルムアルデヒド曝露により特異的にくしゃみの増加が観察されたが、トルエン曝露でくしゃみの誘発はなかった。トルエンの曝露指標として、尿中代謝産物である馬尿酸を測定した。曝露直後には高く翌日には正常レベルに戻っており、経気道曝露により確実にマウス生体内に取り込まれていることが確認された。

（2）目的

昨年までの曝露実験でホルムアルデヒド曝露により、濃度依存的にくしゃみ様症状の増加が観察されたので、この症状がホルムアルデヒド特異的な現象なのかトルエン曝露群との比較から検討した。また、トルエン曝露により曝露指標としてトルエンの代謝物である尿中馬尿酸を測定して曝露の確認をおこなった。

（3）方法

① くしゃみの定量法

3ヶ月曝露終了時点において、各マウスを一匹用個別ケージに入れ、15分間目視にてくしゃみを計測した。

② 尿中馬尿酸の定量法

10週曝露終了直後および11週目の曝露開始前にマウス自然排尿をプールして測定サンプルとした。さらに12週最終曝露時に、曝露開始前（前日の曝露終了後18時間後）と曝露終了30分以内の自然排尿を各個体別に採取し測定サンプルとした。

各サンプルを50%メタノールで40倍希釈し、図1に示す条件で高速液体クロマトグラフィ HPLC にて分離定量した。同時に尿中クレアチニン濃度を測定し、尿中馬尿酸濃度はクレアチニン補正值として評価した。図2、図3にそれぞれ馬尿酸、クレアチニンの測定クロマトグラムを示す。

（4）結果

1) くしゃみの変化

① ホルムアルデヒド曝露

C3H/HeN マウスにホルムアルデヒド 400ppb を曝露した結果を図4に示す。昨年までの観察と同様にホルムアルデヒドの曝露でくしゃみの増加する傾向と ON 感作によりその影響が増強される可能性が認められるが、今年の観察匹数が少ないために、ホルムアルデヒド曝露および ON 感作の有無を2要因とした2要因分散分析の結果いずれも有意差は認めなかった。さらに2000ppb 群を加え1要因分散分析の結果、2000ppb ホルムアルデヒド曝露群は他の4群いずれに対しても有意にくしゃみの増加を認めた(P<0.001, 図5)。

② トルエン曝露

トルエン曝露時のくしゃみの回数を図6にホルムアルデヒド **2000ppb** 群を一緒にして示す。**1** 要因分散分析の結果、**2000ppb** ホルムアルデヒド曝露群は他の**4**群いずれに対しても有意にくしゃみの増加を認めた(**P0.0001** , 図6)。ホルムアルデヒド曝露群をのぞいた**4**群間に関しては分散分析の結果、差を認めなかった。すなわちトルエン曝露はマウスにくしゃみを誘発することはなかった。

2) 尿中馬尿酸の定量法

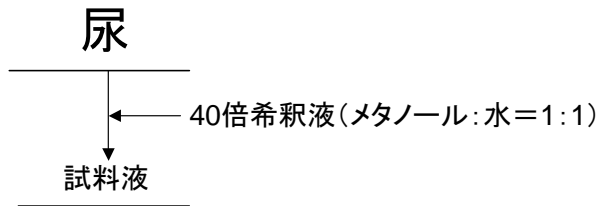
トルエンの尿中代謝産物である馬尿酸濃度は、**10**週、**12**週いずれも曝露直後は約**6 g/g creatinine**を示し、一方曝露開始直前の尿では約**1 g/g creatinine**前後であった(表1、図7)。

(5) 考察

昨年度までの観察で、ホルムアルデヒド曝露により比較的鋭敏に観察される指標としてくしゃみが見出されたが、今年度の観察でも再現性よく観察された。一方、今年度はじめてトルエン **50ppm** を **12** 週間曝露実験を行った。この結果、**50ppm** トルエン曝露群は、ホルムアルデヒド曝露群と比較して高い濃度であるにもかかわらずくしゃみの誘発は観察されず、化学物質による特異性が見出された。ホルムアルデヒドにより惹起されるくしゃみが単なる刺激症状であるのか、他の何らかの変化と関係するののかについては残念ながら不明である。

今年度初めて **12** 週間曝露したトルエンに関しては、産業現場でも幅広く使用され、比較的高濃度での毒性は広く知られ、曝露指標としての尿中代謝産物・馬尿酸の測定もトルエン作業従事者には実施されている。今回、マウス尿中の馬尿酸を測定すると曝露直後には有意に高い濃度を示し、**16** 時間後の翌日曝露直前の尿では低値に復していた。トルエンの代謝は図 **8**, **9** に示すように大半が尿中に馬尿酸として代謝され排泄されることがわかっている。今回の実験でも曝露指標として尿中馬尿酸の増加が観察され、有効な経気道曝露が行われたことを示すとともに、速やかに代謝されていることが認められた。

図1 馬尿酸・クレアチニン測定法(マウス)



高速液体クロマトグラフにて分離・定量

カラム: Wakosil-II 5C18HG 150mm × 4.0mmØ

移動相: 20mMKH₂PO₄ + 1mMDecanesulfonic Acid acetonitrile (85:15,v/v)
(クレアチニン)

20mMKH₂PO₄ acetonitrile (85:15,v/v)(馬尿酸)

検出: 225nm

流速: 0.7ml / min

図2 尿中馬尿酸のクロマトグラム

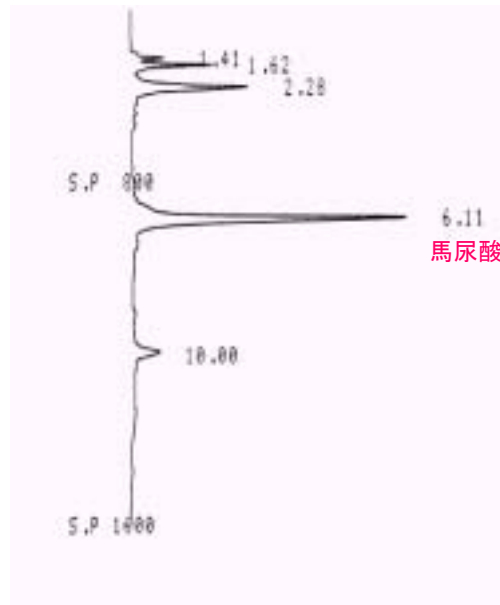


図3 尿中のクレアチニンのクロマトグラム

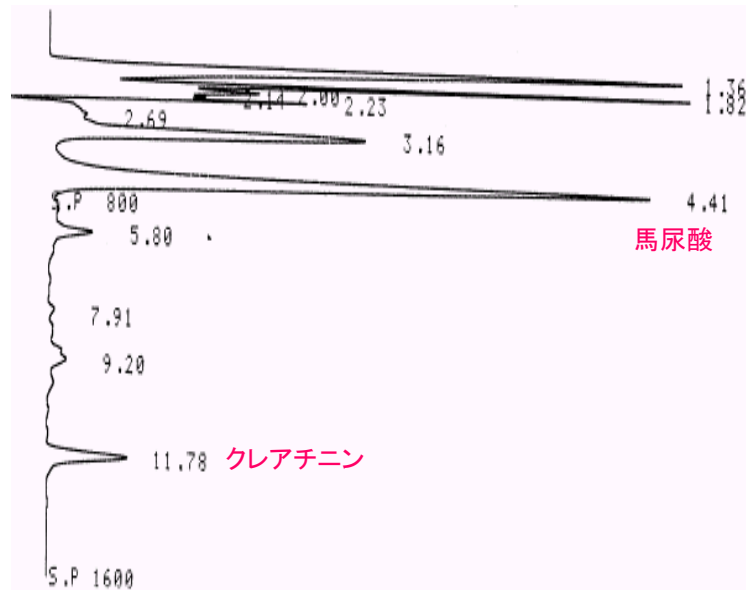


図4 くしゃみ(ホルムアルデヒド)

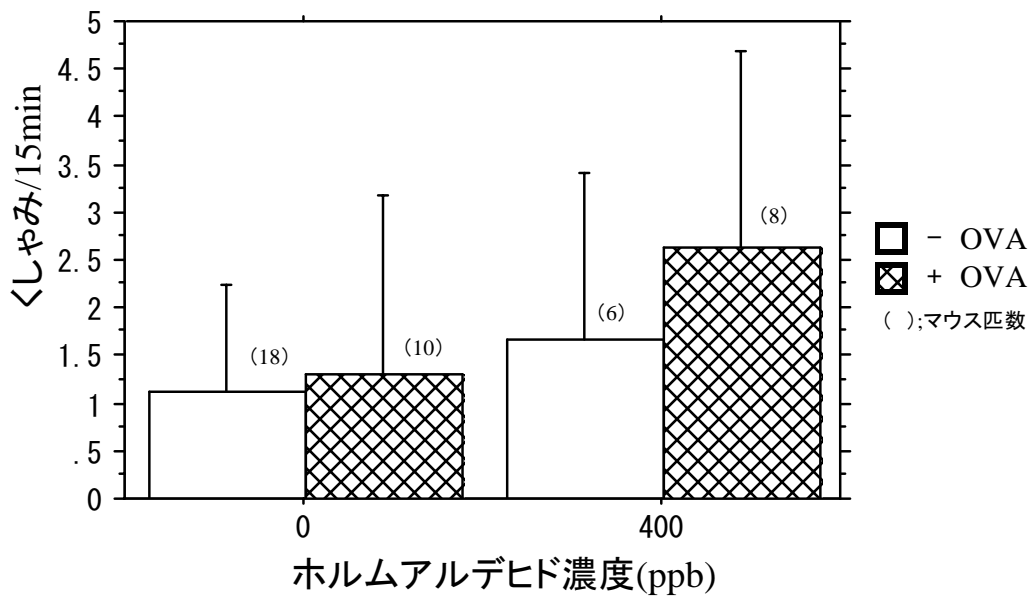


図5 くしゃみ(ホルムアルデヒド)

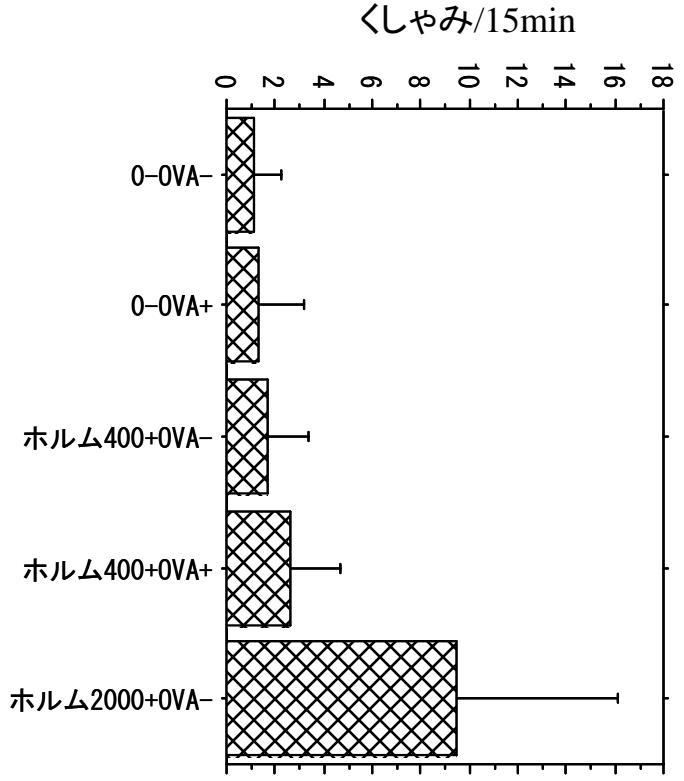


図6 くしゃみ(トルエン)

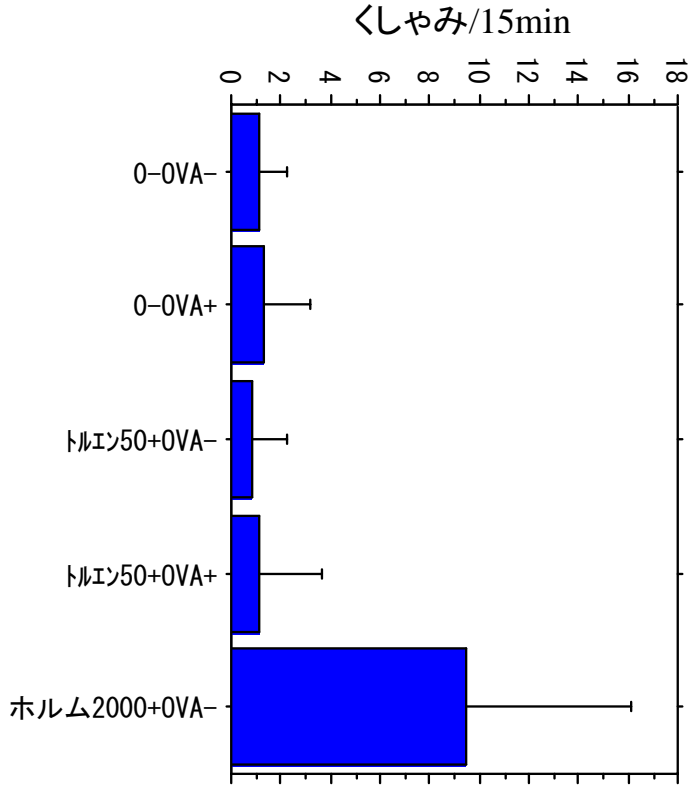


表1 トルエン曝露マウスの尿中の馬尿酸濃度測定結果

	馬尿酸濃度 (g/g・creatinine)	
10週曝露直後	6.31	
11週曝露直前	0.98	
12週曝露直前のケージ		
No.1	1.85	
2	1.31	
3	1.41	1.49±0.25
4	1.15	(S.D)
5	1.68	
6	1.55	
12週曝露直後のマウス		
No.1	6.94	
2	5.88	
3	5.11	5.75±0.93
4	4.50	(S.D)
5	6.63	
6	5.43	

図7 マウス尿中馬尿酸濃度
(トルエン曝露: 50ppm)

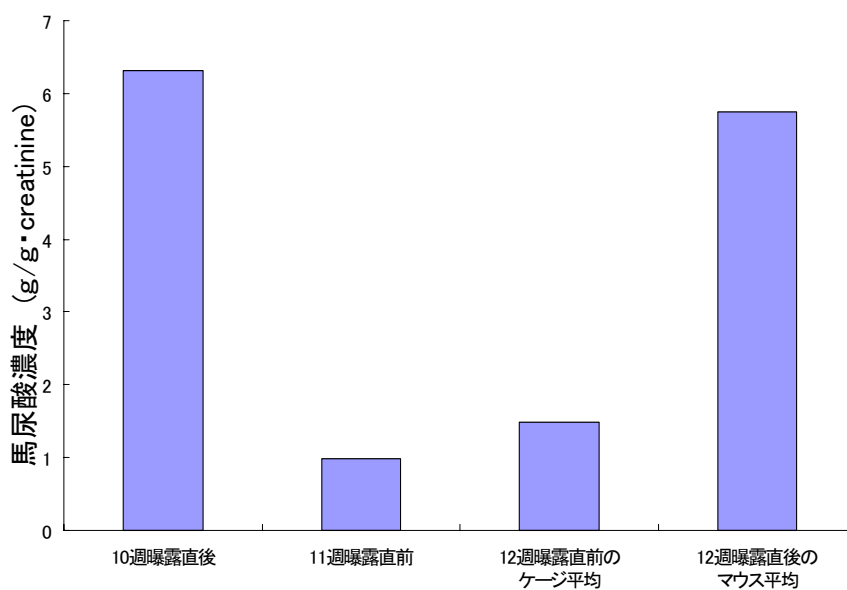
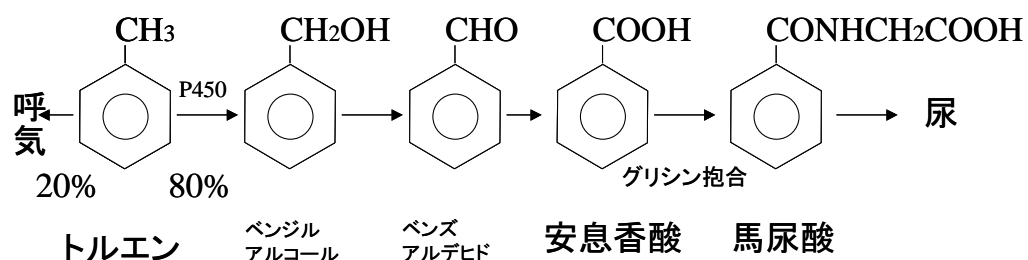


図8 トルエン（体内動態）

吸入曝露

- ・吸入量の86～96%が吸収され、5時間以内に吸入量の15～20%が呼気中に未変化で排出
- ・肺から完全にトルエンが除去されるのは24時間かかる
- ・P450によりベンジルアルコールとo-クレゾール、p-クレゾールに代謝される。ベンジルアルコールは、アルコール脱水素酵素(ADH)、アルデヒド脱水素酵素の代謝を受け、安息香酸、最終的に馬尿酸になって尿中に排出
- ・90%以上が馬尿酸に代謝
- ・生物学的半減期は数時間(1～2時間)、馬尿酸は24時間以内に全て排出

図9 トルエン代謝



安息香酸: あんず、梅肉エキス、清涼飲料水などに含まれているので馬尿酸増加に注意 (ヒトの場合)

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、**Ca²⁺**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 **Ca²⁺**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 **Ca²⁺**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** 曝露群で有為に **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 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 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) と傍系球体細胞 (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系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。

嗅球の構造と神経回路

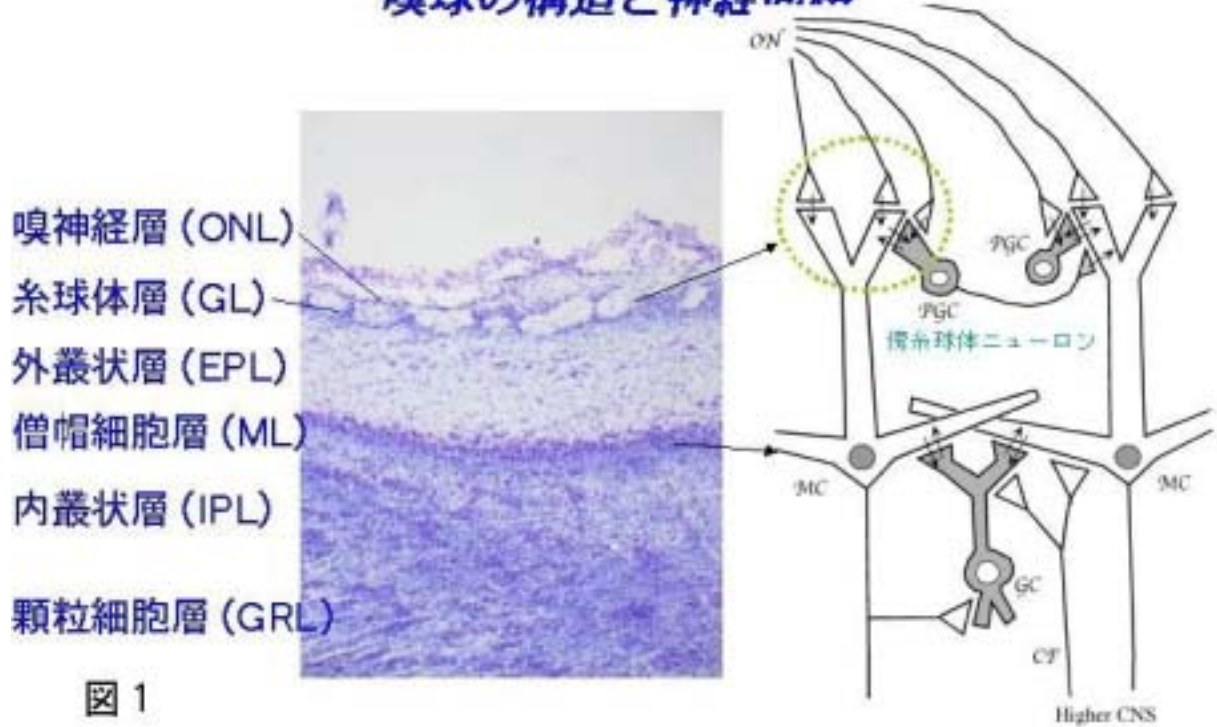


図 1

ホルムアルデヒド曝露マウス嗅球 TH Immunocytochemistry

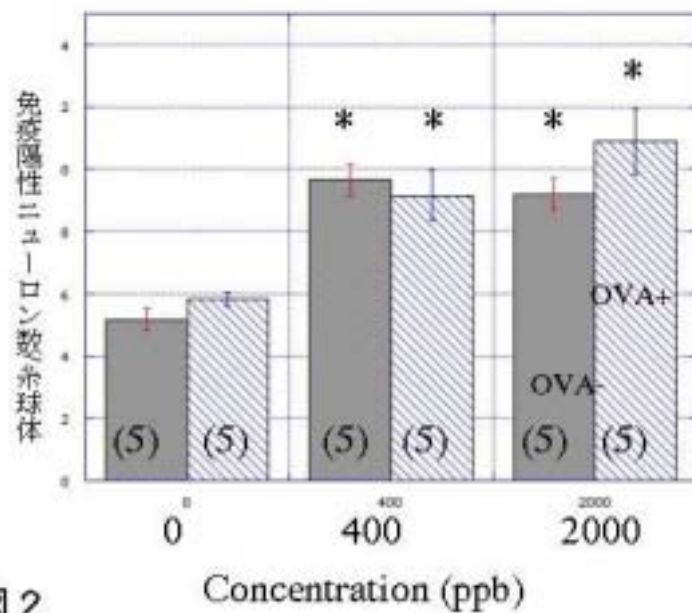


図 2

大脳辺縁系

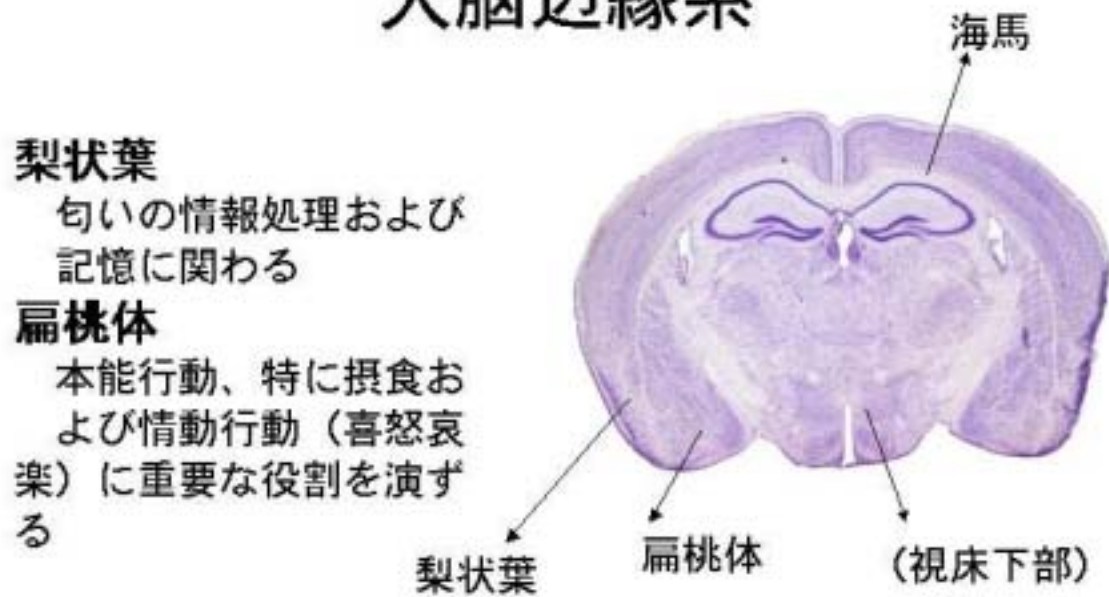


図 3

大脳辺縁系の *Ca binding protein*

- 大脳辺縁系ニューロンにおけるカルシウム結合タンパク質の発現の一部は、嗅球からの入力によって制御されている (Lim & Brunjes 1999)。
-
- 扁桃体では、Parvalbumin(94%), Calbindin(75%)が GABA と高い共存を示す (Kemppainen & Pitkanen 2000)。

図 4

Ca binding protein

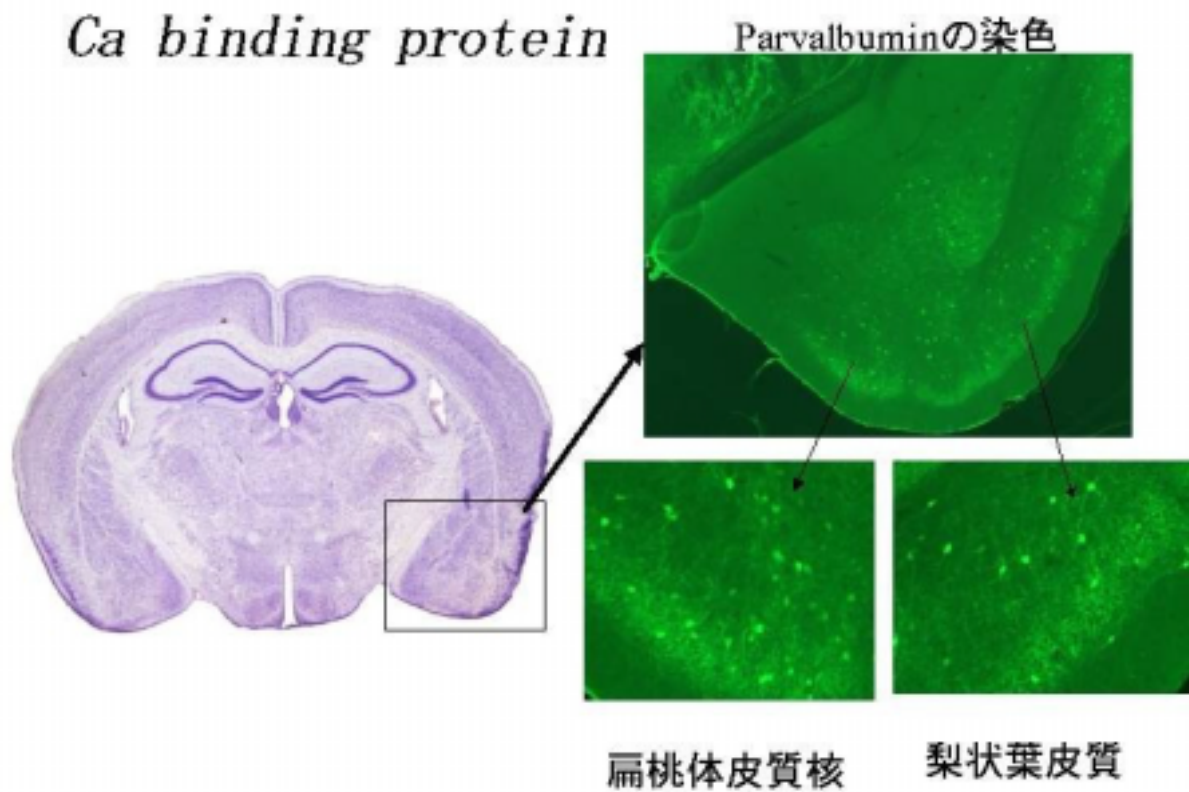


図 5

ホルムアルデヒド長期曝露マウス大脳辺縁系 Parvalbumin

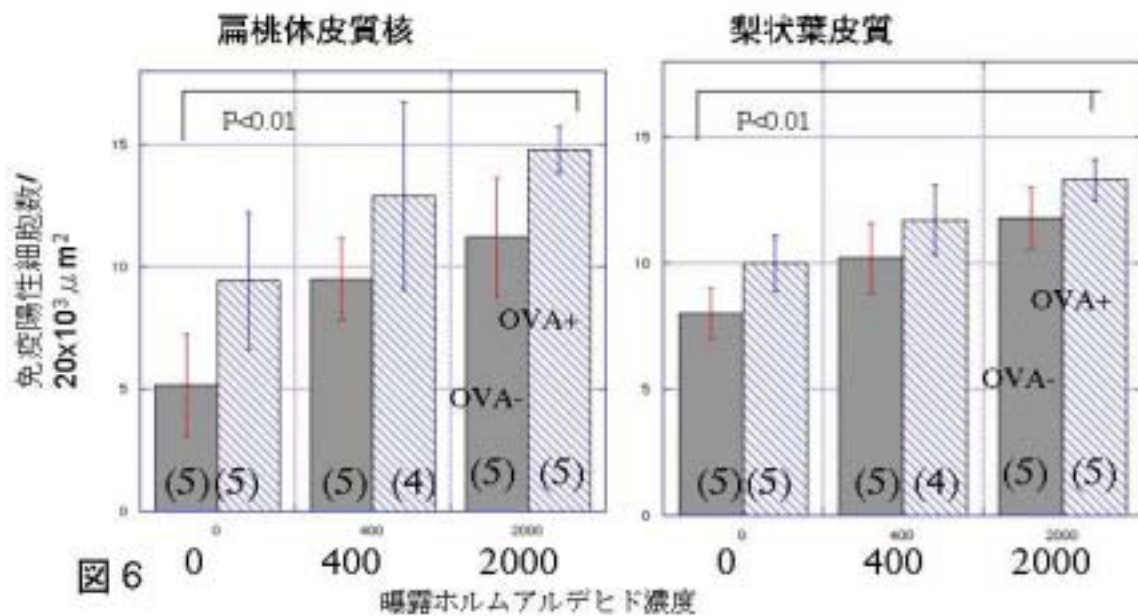
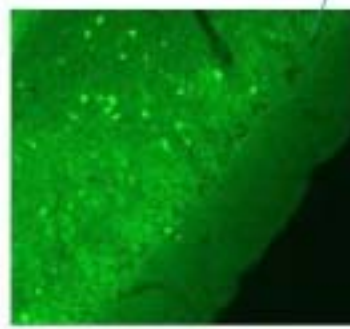
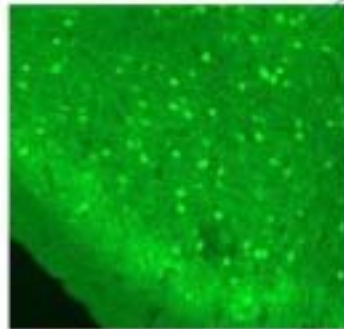
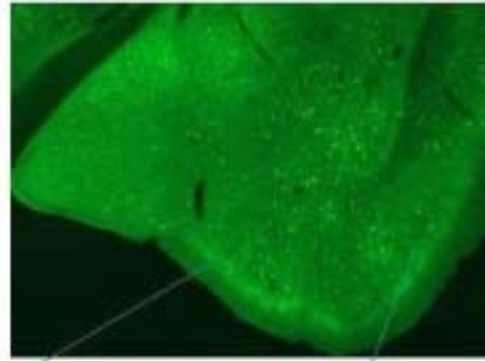


図 6

大脳辺縁系の
Ca binding protein

Calbindin



扁桃体皮質核

梨状葉皮質

図 7

ホルムアルデヒド長期曝露マウス大脳辺縁系
Calbindin

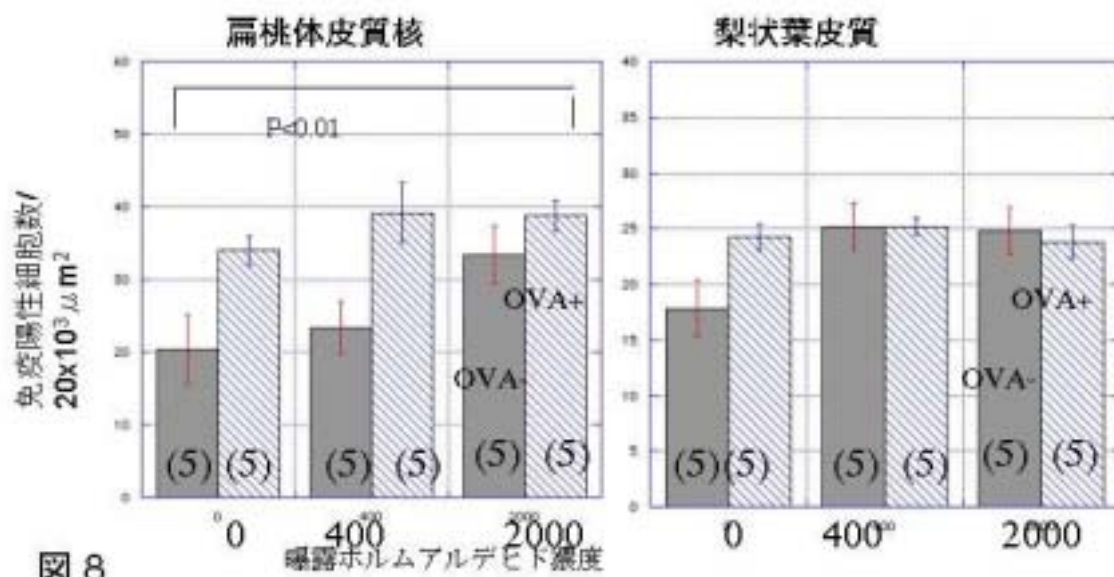


図 8

4. 脳内海馬での情報処理変化の検討

研究協力者

笛田由紀子（産業医科大学産業保健学部第1生体情報学）

黒河佳香（独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域）

担当：海馬のLTP増強度の解析

吉田安宏（産業医科大学医学部 免疫学）

担当：サイトカイン発現量の検討

栗生修司（九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報）

担当：行動変化を検索

研究補助者

竹田勝一（九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報）

（1）研究要旨

FA2000ppb 濃度においては、海馬の形態学的顕著な変化は認められないのだが、神経細胞内リン酸化酵素活性の変化というシグナルトランスダクションの変化、海馬神経細胞シナプスの可塑性の変化、GABA 抑制系の減弱を報告してきた。

今年度は、本態性多種化学物質過敏状態(以下 MCS)と診断された患者にアレルギー症の既往が多いという疫学的研究報告があることから、ホルムアルデヒド(FA)曝露による長期増強(long-term potentiation, LTP)増強度変化に対する生物学的因子（アレルゲン投与）の影響について検討することが課題となった。アレルギーモデルとして一般的な卵白アルブミン(ovalbumin, 以下 OVA)感作モデルマウスを用いた。雌性 C3H/HeN マウス(10 週令)を、対照群、拘束のみの群、OVA 感作群、ホルムアルデヒド(以下 FA, 400ppb)曝露群、FA 曝露+OVA 感作群の 5 群に分け、12 週間の繰り返し負荷を与えた。性周期が LTP 増強度を修飾する可能性を排除するために、今年度は発情前期のマウスからの結果を各群から除外した。Input/Output 曲線と LTP を 5 群間で比較した結果、400ppb 濃度の FA 曝露と OVA 感作の単独および重複付加いずれも Input/Output 曲線および LTP 増強度に影響しなかった。また LTP の増強度と炎症性サイトカインの発現 profile を比較検討することを目的として、海馬内の炎症性サイトカイン、IL-1 β 、IL-6、IL-4 の mRNA の発現変動を解析した。OVA 感作群の対照として拘束のみを与えた群および負荷群では IL-6 の発現量増加が認められたが、対照群では増加が認められない例があった。また、IL-1 β 、IL-4 に関しては顕著な発現の誘導はどの群においても認められなかった。今回の結果からは、LTP の増強度に対するアレルギーの関与は明らかではなく、FA を曝露されたマウス海馬において MCS の仮説のひとつと考えられているキンドリング現象^注は認められなかった。

注：キンドリングとは、初めは何の変化も起こさないような弱い電気刺激を毎日1回繰り返し与えることによってほぼ3週間で同レベルの刺激でてんかん発作を起こすという現象をいう。キンドリング現象は化学物質の反復投与によっても起こるので、時間依存的な感受性の亢進を説明する仮説として考えられている。）

MCS 患者による中枢神経関連の愁訴のなかに不安が報告されている。FA 濃度 2000ppb で 12 週間曝露した雌性 C3H/HeN マウスを用いて、行動試験として、活動性・探索行動を評価するオープンフィールド試験、加えて不安行動を評価する高架プラス迷路試験、空間学習を評価するラッシュリー迷路試験、回避学習を評価する受動的回避学習試験、侵害受容（痛覚）を評価するホットプレート試験の 5 試験をおこなった。マウスへの慢性 FA 曝露は、不安を増強し、回避学習を促進するが、一般活動性、空間学習機能、侵害受容には影響しないことが示唆された。昨年度までに、FA 曝露によって海馬での興奮・抑制系や細胞内シグナルトランスダクション関連酵素蛋白量の変動を報告してきたが、海馬以外の脳内の色々な部位でもそれぞれのレベルで健康な情報処理が攪乱されていることが予測された。また海馬での影響指標どうしの関連性を調べる実験の必要性も示唆された。

（２）研究目的

平成 15 年度の課題は、『低濃度ホルムアルデヒド曝露による海馬シナプスにおける LTP 低下に生物学的因子たとえばアレルゲン投与などが影響するかどうかを解明するために、アレルギーモデルマウス海馬の LTP について検討する』であった。MCS 患者にアレルギー既往が多いという疫学研究報告がある。われわれは、海馬のシナプス伝達効率に対して、FA への反復曝露が影響を及ぼすか、さらに、影響が存在すると仮定して、その影響の発現に免疫学的メカニズムがどの程度関わるのかを知るために、FA 負荷と免疫学的感作との組合せ実験を実施した。また、MCS 患者では種々の不定愁訴に加えて不安情動の亢進が報告されている。FA への反復曝露が情動・学習行動に影響を及ぼすのかどうか知るために種々の行動試験を実施した。

（３）研究方法

１）実験動物と実験群

C3H/HeN マウス（10 週齢、メス）70 匹を用いた。スライス実験に使用する 50 匹のマウスを 10 匹ずつの 5 群に分け、そのうち第 3 群には OVA 感作、第 4 群には FA 負荷、第 5 群には OVA 感作+FA 負荷を実施した。第 2 群には OVA 感作にともなう身体拘束のみを実施し、第 1 群には拘束、感作、負荷の一切の処置を実施しなかった。今年度の FA 負荷は、これまでの年度で実施したモードのうちの 400ppb 負荷のみを実施した。FA 曝露と OVA 感作は、これまでの年度と同様に行い、今年度報告書の「曝露装置と曝露条件」の章に記載されたスケジュールに従った。

行動試験には、のこり 20 匹を 10 匹ずつ 2 群に分けて、2000ppbFA 曝露群と対照群とした。

２）性周期判定

海馬の摘出に際して、今年度はこれまでの年度と異なり、新たにマウスの性周期を膣垢検査で判定する手技を加えた。すなわち、実験日の午前中にマウスの膣を生理食塩水で洗浄し、その洗浄液をスポイドに採り、その 1 滴をスライドガラスに滴下した。その風乾標本に対してギムザ染色を施し、後日顕微鏡下で膣垢の観察を行った。細胞の構成要素により性周期を判定し、最終的に発情前期にあるマウスのデータを解析から除いた。この理由

としては、性周期により海馬の電気生理学的検査の結果に変動が見られるとする実験結果が集積していること、さらにこの現象がエストロゲンの海馬への直接作用であるとする状況証拠が集積していることをふまえて、エストロゲンの血中濃度が高まる発情前期のデータを解析からはずすことで、海馬機能への交絡因子を減らすことを意図したものである。無作為で実験と解析を行うために、LTP 解析者と性周期判定者を異なる研究者とした。

3) 海馬スライス標本作成と電気生理学的計測

これまでの年度の方法と同じである。各群のスケジュールが終了した翌週に、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、断頭した後、左海馬を取り出し、スライスチョッパー (McIlwain tissue chopper) で septo-temporal 軸の middle third 部分から $450\ \mu\text{m}$ の海馬スライスを切り出した。右海馬は後述するサイトカイン発現量を検討する実験に供した。切り出したスライスを人工脳脊髄液溶液 (124mM NaCl , 2mM KCl , $1.25\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, 2mM MgSO_4 , 26mM NaHCO_3 , 10mM Glucose , 2mM CaCl_2) に浸し、スライスして1時間後から測定を開始した。LTP の測定は、CA1 への入力線維である Schaffer 側枝を両極性のタングステン刺激電極にて刺激して、CA1 のシナプス層 (*stratum radiatum*) からガラス微小電極 (抵抗 $1\text{--}2\ \text{M}\Omega$) を用いて集合シナプス後電位 (以下 fEPSP) を記録した。テスト刺激は、 $1/60\text{Hz}$ で行い、LTP を誘導する刺激には、 θ バースト刺激 (*theta burst stimulation*; TBS; $100\text{Hz} \times 5$, $5\text{Hz} \times 5$) を使用した。テスト刺激強度は、fEPSP の最大値の半分の振幅を与える電流値に設定し、TBS も同じ電流値で刺激した。

シナプス伝達効率の指標として、従来どおり、2種類の評価指標を求めた。

① Input/Output 曲線

大きさを変えながら単一パルス電流を順次負荷した。得られた PSFV (Presynaptic fibre volley) の振幅と fEPSP の傾きとの関係を2次元プロットし、Hill 方程式 (くわしくは後述) をあてはめて、そのシグモイド曲線の特性を表す数値を得た。

② LTP の増強度

TBS 前 10 分間の fEPSP 傾きの平均値を 1 とした時の、TBS 後 35~40 分めの fEPSP 傾きを算出した。

上記①、②の各指標に関して、5群での Kruskal-Wallis 検定を行った。

4) RNA の調製と半定量 RT-PCR

各群のラット右海馬の middle third より TRIzol (Invitrogen) を用い RNA を調製した。その後、 260nm の吸光度を測定することにより、total RNA 濃度を決定した。

$0.25\ \mu\text{g}$ の total RNA に $250\ \mu\text{g}$ の random primer と H_2O を加え $12\ \mu\text{l}$ とし、 70°C で 10 分加熱することにより熱変性させた。氷中で急冷後、 $5\times$ buffer $4\ \mu\text{l}$ 、 $0.1\ \text{M DTT}$ $2\ \mu\text{l}$ 、 10mM dNTP $1\ \mu\text{l}$ 、Superscript II RNase H-reverse transcriptase (Fermentas) $1\ \mu\text{l}$ を加え、 42°C で 50 分、 70°C で 10 分反応させることにより逆転写し、cDNA を得た。PCR による増幅は次のように行った。1 サンプルにつき得られた cDNA 溶液 $1\ \mu\text{l}$ 、PCR プライマー 100pmol 、 $250\ \mu\text{M}$ dNTP、 $10\times$ buffer $5\ \mu\text{l}$ 、 $1\ \text{mM MgCl}_2$ 、1 unit Taq polymerase (Fermentas) を加え、total $50\ \mu\text{l}$ で PCR を行った。PCR は 94°C で 2 分間インキュベートした後、 94°C 1 分、 55°C 1 分、 72°C 2 分のサイクルを 23 から 30 サイクル行って増幅した。

得られた PCR 産物は 1%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドによる染

色後、それぞれの PCR 産物の量を CCD analyzer (ATTO)により解析した。また、各群はそれぞれの β -actin の量により normalize した。用いたプライマーのシーケンスは mouse β -actin sense :5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAA-3'、mouse β -actin anti-sense :5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'、mouse IL-6 sense :5'-GACAACCACGGCCTTCCCTA-3'、mouse IL-6 anti-sense :5'-GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA-3'。

5) 行動試験

① オープンフィールド試験

オープンフィールドにマウスを入れ、10 分間行動を観察した。総移動距離、平均移動速度、動作回数、立ち上がり回数・時間、毛づくろい回数・時間、中央部侵入回数、中央部滞在時間を測定した。これらは活動性・探索行動の指標である。

② b. 高架プラス迷路試験

壁付きアームと壁なしアームが直交している高架プラス迷路の中央部にマウスを置き、5 分間行動を観測した。総移動距離、平均移動速度、オープンアーム侵入回数、オープンアーム移動距離、オープンアーム滞在時間、オープンアーム平均移動速度、オープンアーム覗き込み回数・時間、オープンアーム下覗き込み回数・時間、ストレッチ回数・時間、立ち上がり回数・時間、毛づくろい回数・時間を測定した。総移動距離、平均移動速度、立ち上がり回数・時間、毛づくろい回数・時間は活動性および探索行動の指標であり、その他は不安レベルの指標である。

③ ラッシュリー迷路試験

ラッシュリー迷路に摂食制限をしたマウスをスタートボックスに置く。餌を報酬とし、スタートボックスからゴールボックスまでの到達時間を測定した。ゴールへの到達時間が短いほど空間学習が優れているとされている。

④ 受動的回避学習試験

明室と暗室からなる装置の明室にマウスを置く。マウスは暗い場所を好むので暗室に入る。暗室にマウスが入ると電気ショックを与え、これを学習させる。24 時間後、再びマウスを明室に置き、暗室に侵入するまでの時間を測定した。この時間が長いほど、回避学習をしたとされる。

⑤ ホットプレート試験

55°C のホットプレート上にマウスを置き、マウスが足をホットプレートから離すまでの時間を測定した。これは、痛覚閾値を評価する試験とされている。

受動的回避学習試験のみ Mann-Whitney 符号順位検定を用いた。他の試験に関しては Student's *t* 検定を用いた。

(4) 研究結果

1) 海馬 CA1 における電気生理学的検討

① Input/Output 曲線

単一パルス電流の漸増負荷により得られた PSFV 振幅と fEPSP 傾きとの関係を 2 次元プロットし、以下に示す Hill 方程式をあてはめた。

$$y = Y_{\max} * x^n / (K^n + x^n)$$

この式より、3つの指標を算出した（図1参照）。

Y_{max} : Yの最大飽和値

x_0 : 曲線が立ち上がるX閾値

Y'_{max} : Yの最大増加速度

この3つの値を、CA1シナプスにおける刺激・反応（前シナプスの刺激・後シナプスの反応）関係の指標とした。

5群におけるサンプル数、3つの指標の分布および統計学的検定結果を表1に示した。これらの指標に関して、5群間での有意な差は認められなかった。

② LTPの増強度

θ バースト刺激（TBS）前10分間のfEPSP傾きの平均値を1とした時の、TBS後35～40分めのfEPSP傾きを算出し、LTPの増強度とした。5群におけるサンプル数、指標の分布および統計学的検定結果を表2に示した。5群間に有意な差は認められなかった。

2) サイトカイン発現量

今回はLTPの増強度とサイトカインの発現profileを比較検討することを目的とした。各群間でのLTPの増強度に関しては有意差が認められなかったため、各群においてLTP値の高いものと、低いものをピックアップし、その中での炎症性サイトカインの発現を半定量的RT-PCR法により解析した。

炎症性サイトカインとして、IL-1 β 、IL-6、IL-4のmRNAの発現変動を解析したが、IL-1 β 、IL-4に関しては顕著な発現の誘導はどの群においても認められなかった（data not shown）。IL-6に関しては、図に示した4群間では恒常的な発現は検出されたものの、LTPの高低とは有意な関係はなく、ほぼ同程度の発現であった（図2）。無処置コントロール群では発現が認められなかった個体も確認された（data not shown）。

3) 行動試験

① オープンフィールド試験

総移動距離や立ち上がり行動など全ての評価項目において、FA曝露群と対照群の間に有意な差はなく、活動性や探索行動への影響は認められなかった（表3）。

② 高架プラス迷路試験

オープンアーム侵入回数やオープンアーム覗き込み回数には影響が認められなかったが、オープンアーム覗き込み時間、オープンアーム滞在時間、オープンアーム移動距離、オープンアーム下覗き込み回数・時間が有意に減少した（図3、表4）。またrisk assessment行動であるストレッチ回数・時間も減少した。高架プラス迷路試験における総移動距離、平均移動速度、立ち上がり回数・時間はオープンフィールド試験と同様に影響を受けなかった。また毛づくろい回数・時間もFA曝露群と対照群の間に有意な差はなかった。

③ ラッシュリー迷路試験

ゴール到達時間、袋小路進入回数など全ての項目でFA曝露群と対照群の間に有意差はなかった（図4）。なお、第2試行目においてFA曝露群のゴール到達時間が見かけ上短縮したが有意差はなかった。

④ 受動的回避学習試験

電気ショック負荷 24 時間後、暗室に侵入するまでの時間が FA 曝露群のほうが対照群に比べ有意に延長した (図 5)。

⑤ ホットプレート試験

回避学習の促進に痛覚亢進が関与しているかどうか検討するため、ホットプレート試験を施行した。FA 曝露群と対照群の間に有意差はなく、侵害受容への影響は認められなかった (図 6)。

(5) 考察

1) 海馬 CA1 領域で誘導された LTP に対する OVA 感作と FA 曝露の影響

FA 負荷、免疫学的感作、その重複条件のいずれも、海馬 CA1 シナプスの伝達効率に有意な影響を与えなかった。単独負荷 (FA 負荷のみ、および免疫学的感作のみ) で変化が観察されなかったため、交互作用の有無にまで言及することはできないが、少なくとも強い相乗作用は存在しないことがうかがわれた。免疫学的感作によって影響が見られないことは、神経系のメモリー誘導に対して免疫系のメモリー誘導が修飾をかけないことを示しており、今回の FA 慢性曝露動物モデルでは、化学物質過敏状態に関しての 2 つの仮説すなわちアレルギー仮説とキンドリング仮説を切り離して考えるべきであることが示唆された。

2) サイトカイン発現量と LTP の大きさ

今回は海馬の middle third でのサイトカイン profile を RT-PCR 法により解析したが、LTP とサイトカイン発現誘導との関連は認められなかった。又、無処置群では IL-6 の発現が減弱している個体も見られたが、それが個体差によるものなのか、処置によるものなのかについては更なる検討が必要であると考えられる。一方、他のサイトカイン、例えば IL-1 β 等は Lipopolysaccharide で通常誘導されてくる発現量に比べ非常に低いものであった (data not shown)。LTP とサイトカイン全般の関連を考えるには、他の脳の部位を含めた更なる詳細な実験系を構築し、解析する必要があると考えられた。

3) 行動試験

オープンフィールド試験において、FA 曝露群と対照群の間に有意差はなかった。このことから、長期 FA 曝露は一般活動性に影響はないものと考えられる。高架プラス迷路試験において、不安レベルの指標となるオープンアーム滞在時間、オープンアーム覗き込み時間、オープンアーム下覗き込み回数・時間、ストレッチ回数・時間に FA 曝露群と対照群の間に有意な差が得られた。これらは、慢性 FA 曝露が不安レベルを高めることを示唆する。ラッシュリー迷路試験において、FA 曝露群と対照群の間に有意差はなかったが、FA 曝露群が 2 試行めに対照群に比べ学習促進を示した。本実験では、各群 10 匹を用いて試験を行ったために有意な差が得られなかったことも考えられる。個体数を増やすことで、有意な差が得られるかもしれない。受動的回避学習試験において、FA 曝露群の暗室進入時間が有意に延長し、回避学習の促進作用が認められた。痛覚を検査するホットプレート試験で両群に有意差はなかったことから、FA 曝露により痛覚過敏になったわけではなく、回避学習を促進したことを示唆する。

本実験で、長期 FA 曝露は、不安情動を増強し、回避学習を促進させることが明らかに

なった。一般活動性や痛覚には影響がないことから、回避学習の促進は感覚系や運動系の変化によるものでないと考えられる。空間学習には明らかな影響が認められず、不安や恐怖が強いと回避学習が促進する可能性があるので、FA 曝露の主要な標的は情動系の可能性がある。

(6) 結論

我々研究班は、昨年まで、シナプス伝達効率と抑制系の変化および細胞内シグナルトランスダクション関連蛋白量を指標に、FA 曝露による大脳辺縁系の海馬における情報処理変化を検討してきた。今年度は、MCS と診断された患者にアレルギー症の既往歴がある場合が多いことから、LTP 増強度への OVA 感作の影響を、対照群、拘束のみの群、OVA 感作群、FA 曝露群、FA 曝露+OVA 感作群の 5 群をもちいた組み合わせ実験によって検討した。その結果、400ppb 濃度の FA 曝露と OVA 感作の単独および重複付加いずれも LTP には影響しなかった。海馬内の炎症性サイトカインは、拘束群および負荷群で IL-6 発現量が増加したが負荷群の間では差が認められず、IL- β 、IL-4 は 5 群すべてで顕著な発現量は誘導されなかった。このように、今回の我々の実験条件では、LTP の増強度に対するアレルギーの関与と、MCS の動物モデルと想定したときのキンドリング仮説は認められなかった。

MCS 患者の中樞神経関連愁訴のなかに不安情動が報告されている。マウスへの慢性 FA 曝露は、不安を増強させて、回避学習を促進させたが、一般活動性、空間学習、侵害受容には影響しなかった。FA 曝露は、不安情動を増強し、海馬の興奮・抑制系機構や細胞内シグナルトランスダクションを攪乱するなど、脳内の神経情報処理能力が変化している可能性があると考えられる。

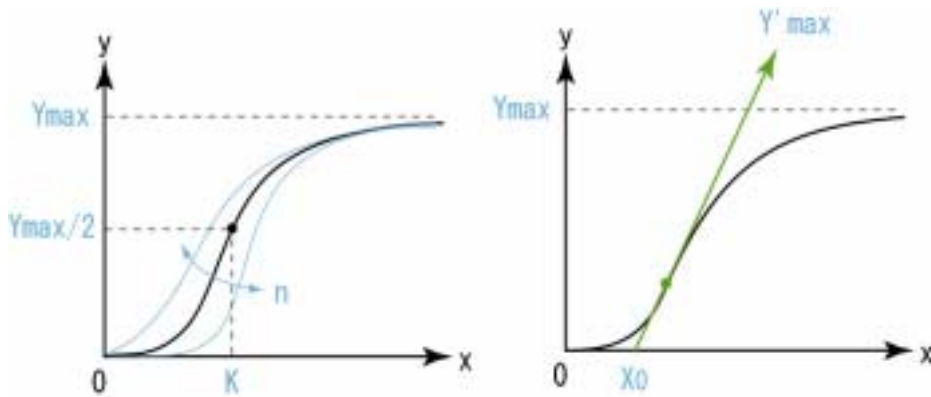


図1 Hill 方程式による指標の算定

	n (slice)	n (mouse)	Ymax [mV/ms]	X0 [mV]	Y'max [/ms]
			Mean (SEM)		
第1群 (無処置)	17	9	11.21 (1.68)	0.82 (0.19)	2.80 (0.41)
第2群 (拘束のみ)	10	5	14.38 (2.36)	1.02 (0.30)	2.47 (0.24)
第3群 (OVA感作)	10	5	13.50 (2.10)	1.14 (0.18)	2.92 (0.67)
第4群 (FA負荷)	13	9	11.51 (1.89)	0.92 (0.16)	3.07 (0.41)
第5群 (OVA感作+FA負荷)	13	9	12.86 (1.99)	0.89 (0.18)	2.71 (0.35)
p (Kruskal-Wallis test)			0.145	0.670	0.888

表1 Input/output 曲線についての各群のサンプル数、3つの指標の分布および統計学的検定結果

	n (slice)	n (mouse)	fEPSP Slope (% baseline) Mean (SEM)
第1群 (無処置)	17	9	166.0 (9.5)
第2群 (拘束のみ)	10	5	154.5 (9.2)
第3群 (OVA感作)	9	5	159.8 (9.4)
第4群 (FA負荷)	14	9	159.8 (7.1)
第5群 (OVA感作+FA負荷)	13	9	182.6 (15.5)
p (Kruskal-Wallis test)			0.75

表2 LTP についての各群におけるサンプル数、指標の分布および統計学的検定結果

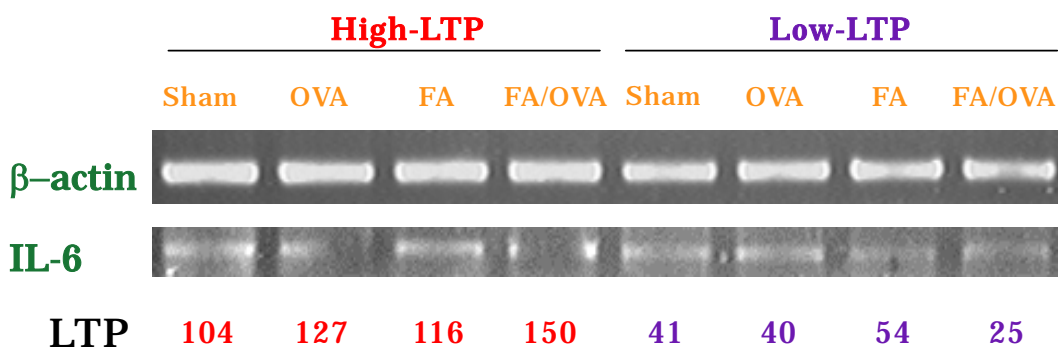


図2 半定量 RT-PCR 解析の結果と LTP 増強度

	control	formaldehyde
Total distance (cm)	2416.9±350.3	2481.0±317.0
Mean velocity (cm/s)	4.0±0.6	4.1±0.5
Number of moving (N)	91.4±17.1	86.0±14.9
Entry into center area (N)	12.0±3.8	9.5±3.5

	control		formaldehyde	
	Duration (s)	Frequency	Duration (s)	Frequency
Rearing	41.6±38.2	22.5±4.4	45.7±11.1	24.3±6.0
Grooming	29.0±6.0	4.4±0.6	33.7±10.6	3.4±0.6

(Mean±S.E.)

表3 オープンフィールド試験の結果

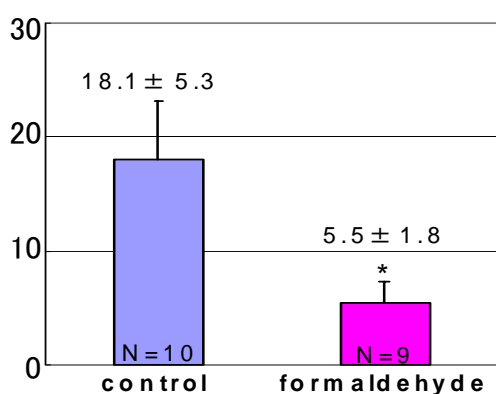
	control	formaldehyde
Total distance (cm)	784.0 ± 47.0	839.8 ± 42.2
Mean velocity (cm/s)	2.6 ± 0.2	2.8 ± 0.1
Mean velocity in the open arms (cm/s)	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.2
Entry in open arms (N)	6.3 ± 1.3	4.5 ± 1.0

	control		formaldehyde	
	Duration (s)	Frequency	Duration (s)	Frequency
Face into open arm	30.0 ± 2.3	62.3 ± 7.5	22.9 ± 1.7*	55.2 ± 5.1
Head dipping	20.4 ± 2.5	32.8 ± 5.2	9.3 ± 1.3**	14.4 ± 2.1**
Stretch	7.0 ± 1.2	14.3 ± 4.0	1.0 ± 0.3***	1.2 ± 0.5**
Rearing	23.3 ± 3.0	41.5 ± 6.6	22.1 ± 2.2	42.5 ± 4.9
Grooming	2.6 ± 0.5	13.8 ± 2.2	1.6 ± 0.3	11.2 ± 3.6

(Mean ± S.E.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ (vs CON, by Student's t 検定)

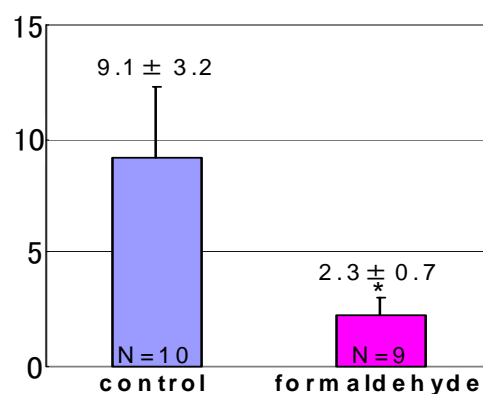
表 4 高架プラス迷路試験の結果

Total distance in the open arms (cm)



(Mean ± S.E.)

Time spend in the open arms (s)



* $P < 0.05$ (vs CON, by Student's t 検定)

図 3 高架プラス迷路試験の結果

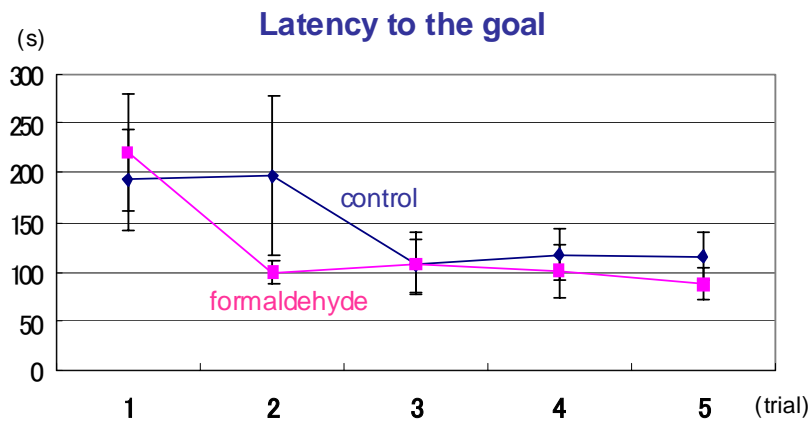


図4 ラシュリー迷路試験の結果

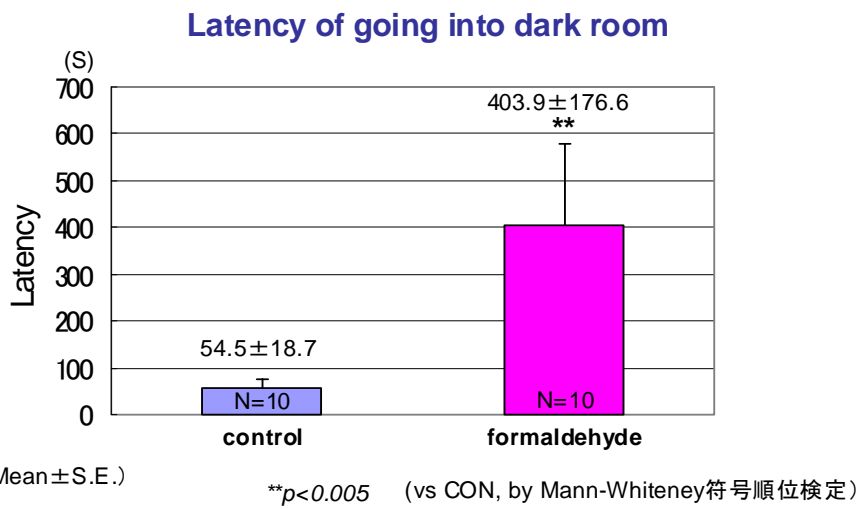
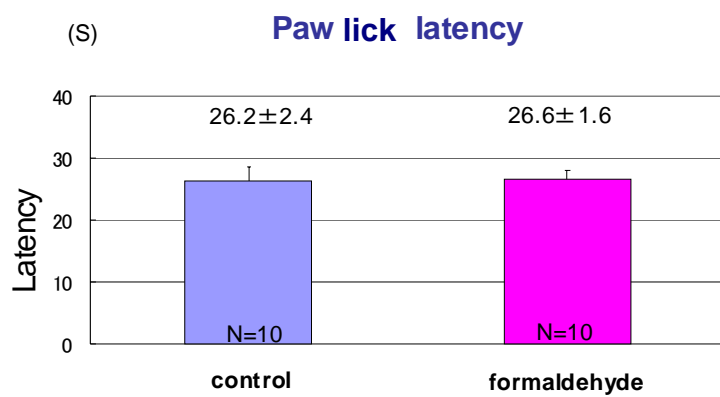


図5 受動的回避学習試験



(Mean ± S.E.)

図6 ホットプレート試験

5. トルエン吸入曝露によるマウスへの生体影響に関する 病理組織学的検索 －気道粘膜上皮の変化と炎症細胞の動態を中心として－

研究協力者：佐藤房枝・櫻田尚樹・嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

（1）研究要旨

トルエン曝露およびアレルギーモデルとしての **OVA** 感作群における気道系を中心とした病理学的検索を実施した。その結果、鼻腔呼吸上皮において **OVA** 感作群では好酸性変化と好酸球の浸潤を認めたがトルエン曝露の影響は観察されなかった。また粘液産生細胞である杯細胞の出現頻度は、個体差はあるものの呼吸上皮領域においてトルエン単独群でも **OVA** 感作群でも認められ刺激物質の吸入に対する共通的な鼻道上皮の変化と考えられた。すべての群において、肥満細胞の浸潤はなかった。気管・肺の組織においては **OVA** 感作により杯細胞の増生、肥満細胞の上皮内浸潤を認めたが、トルエン曝露による修飾作用は観察されなかった。以上、**OVA** 感作によるアレルギー炎症所見は観察されたが、トルエン曝露によってこれらが修飾される様子は観察されなかった。

（2）目的

溶剤やガソリンの添加剤として広く利用されているトルエンは、眼、皮膚、気道に刺激性を示し、高濃度長期吸入曝露では中枢神経毒性が指摘されている化学物質である。また、化学物質過敏状態やシックハウス症候群においては、アレルギーの発症に関与している可能性も懸念されている。

今回、本態性多種化学物質過敏状態への関与を探る一端として、トルエンの曝露濃度を作業環境評価基準の管理濃度である **50ppm** とし3ヶ月間吸入曝露して、マウスへの生体影響を気道粘膜上皮の変化と炎症細胞の動態を中心に、病理組織学的に検索した。さらに、アレルギーモデルとして卵白アルブミン (**OVA**) を前投与したマウスでも同様にトルエンの吸入曝露をおこない、アレルギー発症におけるトルエンの二次的効果についても検討した。

（3）方法

別項に述べられているように、**10** 週齢、雌の **C3H/HeN** マウス **20** 匹を用いた。マウスは1群を5匹とし、**OVA** もトルエンも曝露しない対照群、トルエンの単独曝露群、**OVA** の単独曝露群、**OVA** とトルエンの重複曝露群の4群に分けた。トルエンは、濃度 **50ppm** のチャンバー内で **6** 時間/日、**5** 日/週で3ヶ月間吸入曝露した。**OVA** 感作に関しては曝露の項目を参照いただきたい。

曝露終了後、マウスをネンブタール深麻酔下に失血死させてから断頭し、気管・肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、心臓、膵臓、腸管（食道・胃・小腸・大腸）、卵巣・子宮、膀胱を採取して、4%パラホルムアルデヒド/0.1M 磷酸緩衝液 (pH7.4) にて浸漬固定

した。頭部は、皮膚、下顎、脳を取り除き同固定液で浸漬固定した後、**EDTA** 脱灰液（和光純薬）にて脱灰して4つの部位に切り出した（図1）。すべての臓器は、型どりのパラフィン包埋と薄切をおこない、**HE** 染色標本を作製した。さらに、肺・気管ならびに頭部の組織は、**PAS** 反応、**Giemsa** 染色、**Toluidin blue** 染色を施した。

（4）結果

鼻腔では、呼吸上皮の細胞質内に **HE** 染色でエオジンに好染した小体が出現する好酸性変化（写真1）が、対照群の2匹、トルエン単独曝露群の2匹、**OVA** 単独曝露群の5匹、**OVA**・トルエン重複曝露群の5匹に観察された。好酸性変化を示す部分の **PAS** 反応は陰性であった。その他に、トルエン単独曝露群では鼻道の粘膜に組織学的な変化は確認されなかったが、**OVA** 単独曝露群と **OVA**・トルエン重複曝露群では、呼吸上皮の粘膜下に少数の好酸球の浸潤が確認された（写真2）。好酸球の浸潤は、**OVA** 単独曝露群と **OVA**・トルエンの重複曝露群で同程度であった。また、**OVA** を曝露した2つの群において、呼吸上皮領域に **PAS** 反応にて陽性を示す粘液物質を含有した杯細胞が多数観察されたが、これはトルエン単独曝露群でも頻繁に出現し、かなり出現頻度は下がるものの対照群にも同様の陽性像が観察された（写真3）。これら杯細胞の過形成には、個体差があった。**Toluidin blue** 染色にて、肥満細胞の上皮内への浸潤を検索したが、すべての群において、肥満細胞は上皮下組織に分布しており、扁平上皮、呼吸上皮、嗅上皮のいずれの上皮内にも肥満細胞の浸潤はなかった。

気管・肺の組織においても、トルエンの単独曝露群と対照群との間に組織学的な差はみられなかった（写真4）。**OVA** 単独曝露群と **OVA**・トルエン重複曝露群では、気管支から末梢の終末細気管支領域の上皮に著明な杯細胞の増生（写真5）を認め、気管支ならびに血管周囲にはリンパ球・形質細胞の浸潤（写真6）が観察された。**Toluidin blue** 染色にて、頭部と同様に気管・気管支上皮内への肥満細胞の浸潤を検索した結果、**OVA** を曝露した2つの群に肥満細胞の上皮内浸潤がみられた（写真7）が、トルエン曝露群ではみられなかった。**OVA** 単独曝露群と **OVA**・トルエン重複曝露群との間で、気管支の杯細胞の増生、炎症細胞の浸潤、上皮内への肥満細胞の浸潤所見に差はなかった。

肝臓では、トルエン曝露群の1匹、**OVA** 単独曝露群の1匹、**OVA**・トルエン重複曝露群の1匹において、肝細胞間に好酸球を含む炎症細胞の小さな集簇像が少数観察された（写真8）。

その他、心臓、脾臓、胸腺、腎臓、膵臓、腸管（食道・胃・小腸・大腸）、卵巣・子宮、膀胱には、組織学的な変化はみられなかった。

（5）考察

マウスを用いたトルエンの吸入曝露試験では、**120、600、1200ppm** 濃度にて、**6.5** 時間/日、**5** 日/週で2年間曝露した結果、鼻・気道において炎症、びらん、呼吸上皮の変性や嗅上皮の化生等の所見は見られず、がん原性も認められなかったという報告がある¹⁾。

今回、本態性多種化学物質過敏状態へのトルエンの関与を探る一端として、マウスに曝露実験としては比較的低濃度（50ppm）トルエンを 6.5 時間/日、5 日/週で3ヶ月間吸入曝露し、その生体影響について検討した結果、トルエン単独曝露群で観察された組織学的変化は、鼻道を覆う呼吸上皮の好酸性変化ならびに杯細胞の過形成、肝臓における好酸球を含む炎症細胞の集簇の3つであった。

呼吸上皮の好酸性変化は、老齢動物によく観察されることより加齢変化と考えられているが、化学物質の投与でも増強するという報告もある²⁾³⁾。今回、トルエン曝露群は対照群と出現頻度に差がなく加齢変化とみなされるが、OVA 曝露群においてはすべてのマウスにこの好酸性変化が出現していたことから、加齢変化のみではなく OVA 曝露による増強があったことが推測される。

トルエン吸入曝露にみられた呼吸上皮の杯細胞過形成は、OVA 曝露群においてもみられ、また対照群でも出現頻度は低いものの同所見が観察されることから、刺激物質の吸入に対する共通的な鼻道上皮の変化と考えられる。杯細胞の過形成は、多量の粘液産生と鼻腔内放出を示唆し、鼻汁の亢進が推察される。

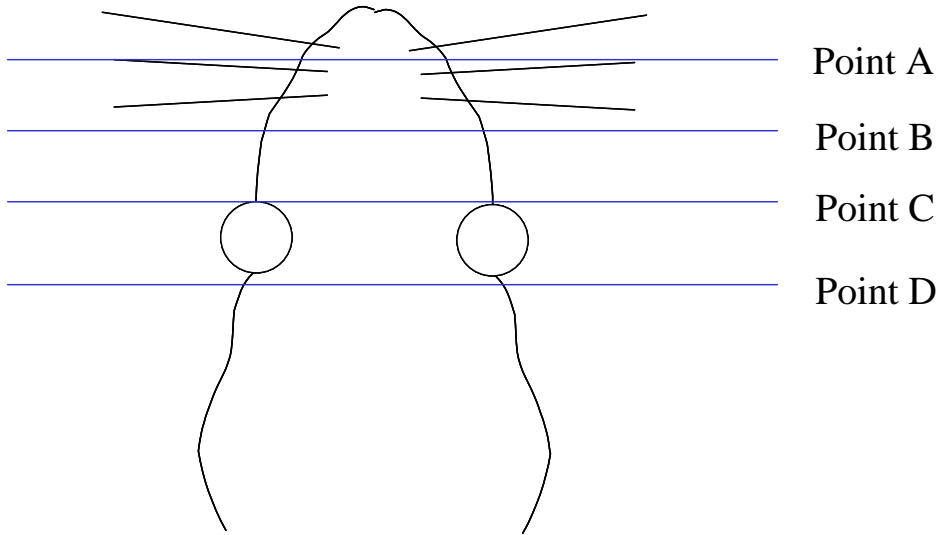
また、肝臓における好酸球を含む炎症細胞の小集簇像は、トルエン曝露群、OVA 単独曝露群、OVA・トルエン重複曝露群において、それぞれ5匹中の1匹に観察されている。いずれも所見に差はなく、その散発的な発生は感受性の個体差を考えさせるが、肝臓で観察されたこの好酸球を含む炎症細胞の小さな集簇像が、トルエンあるいは OVA に関係したアレルギー性の変化であるかどうかを考察するには個体数が少ないと思われる。

OVA を吸入曝露した群の組織学的な変化は、鼻道内呼吸上皮における好酸性変化と杯細胞過形成の他に、鼻道上皮下での好酸球の増加、気管上皮内への肥満細胞の浸潤、気管支から終末細気管支領域での著明な杯細胞の増生と気管支・血管周囲のリンパ球・形質細胞の浸潤に特徴づけられていた。鼻道上皮下の好酸球の増加ならびに気管上皮内への肥満細胞の浸潤はアレルギー性変化と考えられ、また気管支・血管周囲へのリンパ球・形質細胞の浸潤は、慢性の気管支炎の存在を示唆する所見である。これらの組織学的な変化のうち、鼻道呼吸上皮での好酸性変化と杯細胞過形成を除いては、トルエン単独曝露群には認められておらず、OVA 曝露による生体変化と考えられる。また、OVA 単独曝露群と OVA・トルエン重複曝露群との間でこれら所見に差がみられなかったことより、病理組織学的な検索からは、アレルギーの発症にトルエンの吸入曝露が二次的な影響を及ぼしているという結果は得られなかった。

（6）参考文献

- 1) James H et al: Absence of Carcinogenic Activity in Fisher Rats and B6C3F1 Mice Following 103-Week Inhalation Exposures to Toluene. *Int J Occup Environ Health*. 2003; 9(2):138-146
- 2) 日本毒性病理学会編: 上部気道. 毒性病理組織学. 2000; 99-116
- 3) Buckley LA et al: The toxicity of dimethylamine in F-344 rats and B6C3F1 mice following a 1-year inhalation exposure. *Fundament Appl Toxicol* 1985; 5: 341-352

図1 頭部の切片作成部位



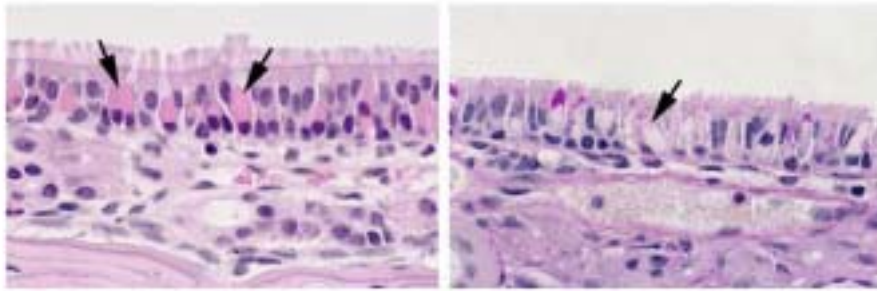


写真1 鼻中隔呼吸上皮の好酸性変化 (OVA 単独曝露群, point B)
 左:呼吸上皮の細胞質内に好酸性小体(矢印)がみられる。HE染色 40×4
 右:好酸性小体(矢印)はPAS反応で陰性を示している。PAS反応 40×4

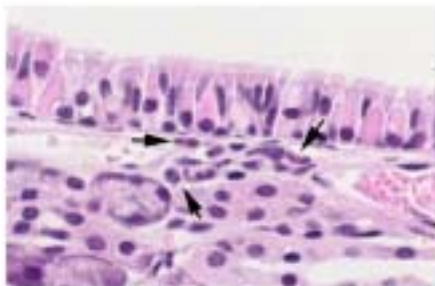


写真2 鼻中隔呼吸上皮下の好酸球浸潤像
 (OVA 単独曝露群, point B)
 呼吸上皮下の間質に好酸球(矢印)の浸潤がみられる。
 HE染色 40×4

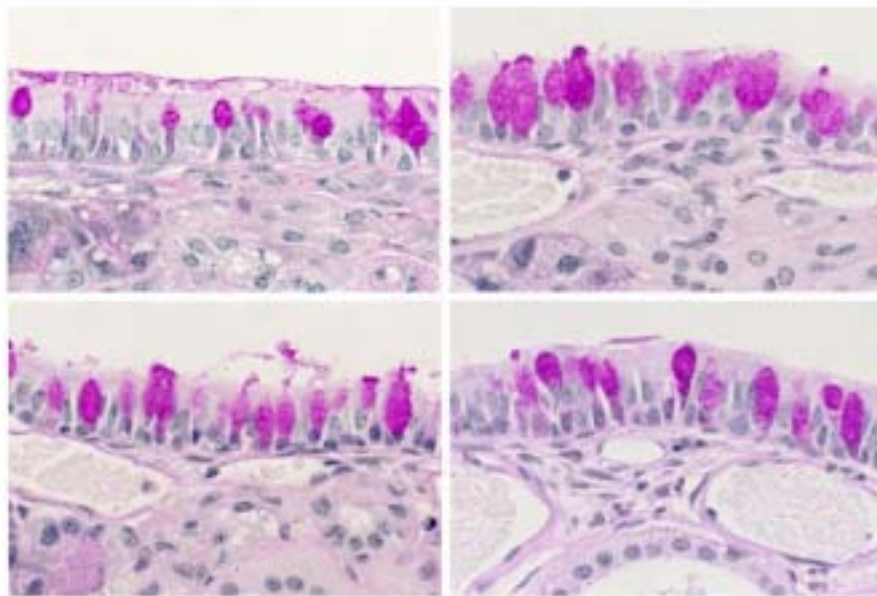


写真3 鼻中隔呼吸上皮の杯細胞過形成
 左上:対照群, point B
 右上:トルエン単独曝露群, point B
 左下:OVA 単独曝露群, point B
 右下:OVA・トルエン重複曝露群, point B
 対照群の一部でも杯細胞の粘液産生がみられるが、曝露群では一様に著明な粘液産生を示す杯細胞の増加がみられる。 PAS反応 40×4

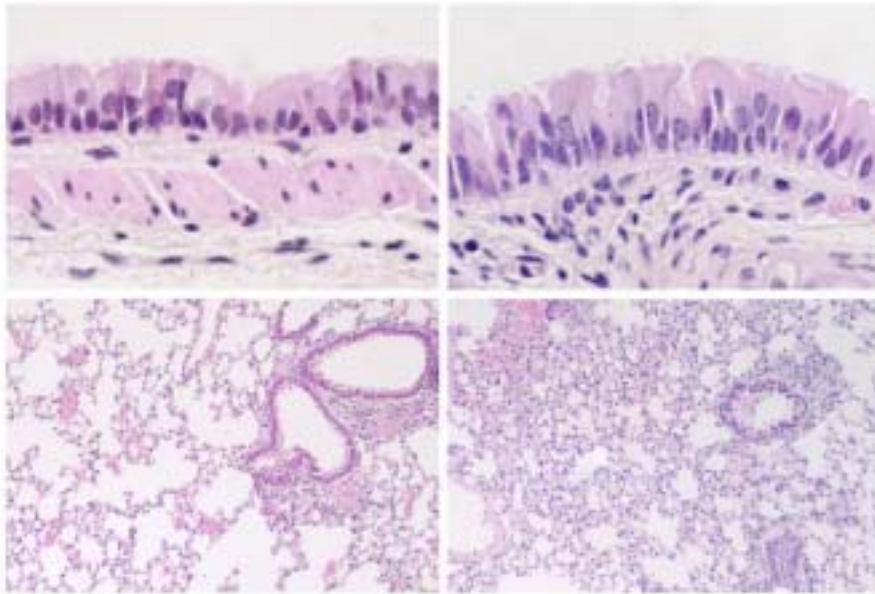


写真4 気管・肺の組織像

左上：対照群、気管上皮、

左下：対照群、肺、

対照群とトルエン単独曝露群との間に組織学的な差はみられない、

HE染色 上：40×4 下：10×2.5

右上：トルエン単独曝露群、気管上皮、

右下：トルエン単独曝露群、肺、

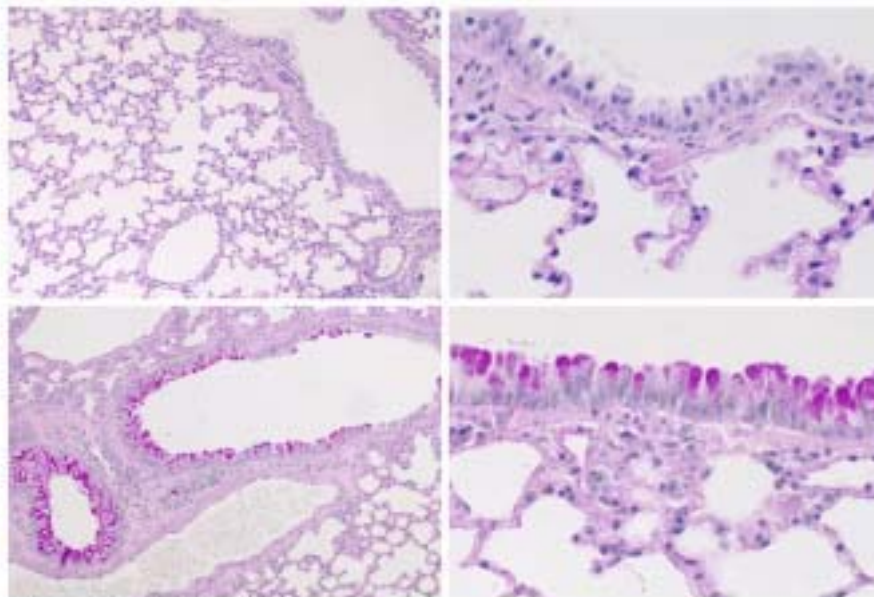


写真5 気管上皮の杯細胞過形成

左上：トルエン単独曝露群、

左下：OVA単独曝露群、

トルエン単独曝露群では末梢の気管支上皮に杯細胞はみられないが、OVA単独曝露群はPAS反応で赤紫色に染まる杯細胞の著明な増加がみられる。

PAS反応 左：10×2.5 右：40×4

右上：トルエン単独曝露群の拡大、

右下：OVA単独曝露群の拡大、

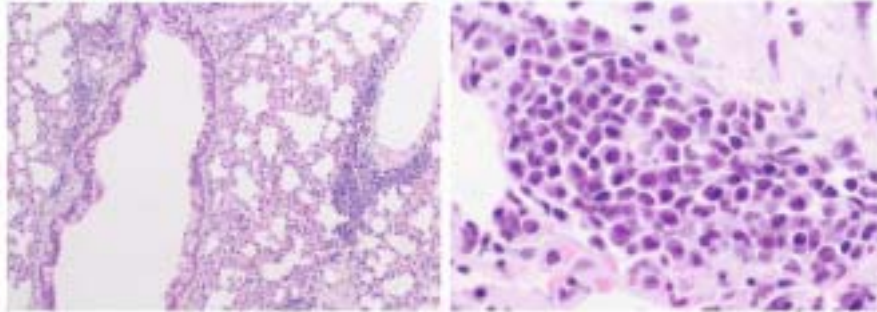


写真6 気管支・血管周囲の炎症細胞浸潤像 (OVA 単独曝露群)
 左: OVA を曝露したマウスでは、気管支・血管周囲の間質内にリンパ球を主体とした炎症細胞の浸潤がみられる。HE 染色 10×2.5
 右: 炎症細胞浸潤部位の拡大像。HE 染色 40×4

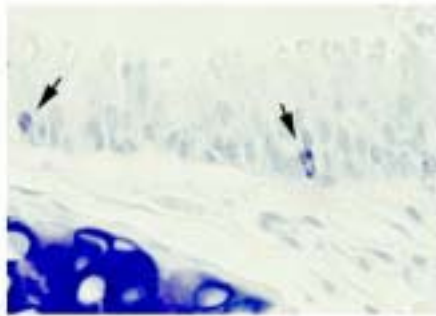


写真7 気管上皮内に浸潤する肥満細胞 (OVA 単独曝露群)
 OVA を曝露したマウスの気管上皮内にトルイジンブルーで青く染まる細胞質内顆粒を有した肥満細胞がみられる。トルイジンブルー染色 40×4

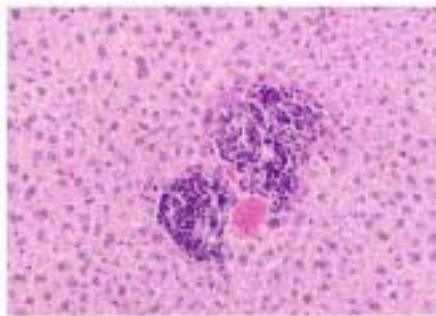


写真8 肝臓の炎症細胞集巣像 (OVA 単独曝露群)
 肝細胞間に好酸球を混じた炎症細胞の集巣が散発的にみられる。HE 染色 10×3

6. トルエン長期曝露による視床下部—下垂体—副腎軸の変化

研究協力者：佐々木文彦、ドゥイ ケスマ サリ、桑原佐知（大阪府立大学大学院）

（1）研究要旨

低濃度トルエンの長期曝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)神経細胞と下垂体の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、計量計測法と RT-PCR 法により解析した。マウスは、非アレルギー(NAG)群と卵白アルブミン感作したアレルギー(AG)群からなる。それぞれの群は、さらに、3ヶ月間 0ppm（空気）と 50ppm のトルエンを曝露した control 群と toluene 群に分かれる。結局、40 匹のマウスを、NAG-control、NAG-toluene、AG-control と AG-toluene の 4 群に分けた。

室旁核の CRH-免疫陽性(-ir)神経細胞数は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加していた。NAG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加していた。

下垂体前葉の ACTH-ir 細胞数は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加していた。NAG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加していた。下垂体前葉の ACTH-mRNA 発現量は、NAG-control 群に比べ NAG-toluene で増加していた。NAG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加していた。AG-control 群に比べ AG-toluene 群で増加していた。

このように、低濃度のトルエンとアレルギーは、共にストレスラーとして視床下部—下垂体—副腎軸に影響を与える。

（2）研究目的と経過

我々は、低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露及びアレルギーは共にストレスラーとして視床下部—下垂体—副腎軸に影響を及ぼす事を明らかにした。さらに、我々の使用したマウスは、MCS 並びにシックハウス症候群の動物モデルとして認められた¹⁾。トルエンは、ホルムアルデヒド同様、MCS を発症させると考えられている²⁾。さらに、トルエンは、接着剤、ラッカー、ペンキなどの成分に含まれ、広く産業界で使用されている³⁻⁵⁾。従って、本実験の目的は、マウスに 3ヶ月間トルエンを曝露すると共にアレルギー感作して、トルエン並びにアレルギーがいかに視床下部—下垂体—副腎軸に影響を及ぼすかを検討することである。

（3）研究方法

40 匹の成熟雌マウスは、非アレルギー(NAG)群と卵白アルブミン感作したアレルギー(AG)群からなる。それぞれの群は、さらに、3ヶ月間 0ppm（空気）と 50ppm のトルエンを曝露した 2 群づつに分かれる。これら 4 群のマウス(NAG-control, NAG-toluene, AG-control と AG-toluene)は、屠殺時に体重と副腎重量を計測した。各群 10 匹づつの視床下部と副腎は、ブアンの液、5 匹づつの下垂体は 10%ホルマリンで固定し、脱水後パラフィンで包埋した。各群 5 匹づつの下垂体前葉は ACTH-mRNA 発現量を RT-PCR で計測した。視床下部、下垂体と副腎のブロックは、それぞれ 10 μ の連続切片とした。視床下部

の室旁核と下垂体前葉は、それぞれ **CRH** 抗体と **ACTH** 抗体にて免疫染色後、**CRH-ir** 神経細胞数と **ACTH-ir** 細胞数を計測した。これらの方法は、以前の発表¹⁾で使用したものと同一である。

(4) 研究結果

室旁核の **CRH-ir** 神経細胞数は、**NAG-control** 群に比べ **NAG-toluene** 群で多い。**NAG-control** 群よりも **AG-toluene** 群で **CRH-ir** 神経細胞数は増加した。**NAG-toluene** 群に比べて **AG-toluene** 群で多い (図 1)。

下垂体前葉の **ACTH-ir** 細胞の出現率は、**NAG-control** 群に比べ **NAG-toluene** で多い。**NAG-control** 群に比べ **AG-toluene** 群で増加した。(図 2)。

下垂体前葉の **ACTH-ir** 細胞数は、**NAG-control** 群に比べ **NAG-toluene** で増加した。**NAG-control** 群に比べ **AG-control** 群と **AG-toluene** 群で増加していた (図 3)。

下垂体前葉の **ACTH-mRNA** 発現量は、**NAG-control** 群に比べ **NAG-toluene** で増加した。**NAG-control** 群に比べ **AG-control** 群と **AG-toluene** 群で増加していた。**NAG-toluene** 群に比較して **AG-toluene** 群で増加した (図 4)。

(5) 考察と結果

視床下部—下垂体—副腎軸は、ストレスに対応する系である。人や動物にストレスが加わると、視床下部室旁核の **CRH** 神経細胞は **CRH** の合成・分泌を増加する (免疫組織化学では **CRH-ir** 神経細胞数が増加する)。**CRH** は下垂体に運ばれ、**ACTH** 細胞に作用して **ACTH-ir** 細胞数を増加させることにより **ACTH** の合成・分泌を促進する¹⁾。**ACTH** は、副腎に運ばれてコルチコステロンの合成・分泌を促進して、ストレスを排除する⁶⁾。

前の実験によるホルムアルデヒドの長期曝露並びにアレルギー感作は、**CRH-ir** 細胞数、**ACTH-ir** 神経細胞数そして **ACTH-mRNA** 発現量を増加させ、ストレスに対応していることを示した¹⁾。

今回の実験においても、トルエンの低濃度の長期曝露並びにアレルギー感作は、前の実験同様にストレスとして視床下部—下垂体—副腎軸に作用していると考えられる。

前の実験に比較して今回のものは、次の点が異なる。前の実験では、アレルギー感作マウスに低濃度(80ppb)のホルムアルデヒドを曝露すると、2つのストレスが相乗的に視床下部—下垂体—副腎軸に作用した¹⁾。今回のアレルギーと低濃度のトルエン曝露の場合は、前述のような相乗的な作用は見られなかった。この原因として考えられることは、化学物質の相違と曝露量である。これを解決するためには、トルエンの曝露量を段階的に違えた実験の実施が望まれる。

(6) 引用文献

- 1) DK. Sari, S. Kuwahara, Y. Tsukamoto, H. Hori, N. Kunugita, K. Arashidani, H. Fujimaki, F. Sasaki. Effect of prolonged exposure to low concentrations of formaldehyde on the corticotropin releasing hormone neurons in the hypothalamus and adrenocorticotrophic hormone cells in the pituitary gland in

- female mice. *Brain Res*: 1013, 107-116 (2004).
- 2) YL. Lee, MC. Pai, JH. Chen, YL. Guo. Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occup Med (Lond)*: 53, 479-482 (2003).
 - 3) G. von Euler, SO. Ogren, SC. Bondy, M. McKee, M. Warner, JA. Gustafsson, P. Eneroth, K. Fuxe. Subacute exposure to low concentrations of toluene affects dopamine-mediated locomotor activity in the rat. *Toxicology*: 67, 333-349 (1991).
 - 4) G. von Euler, SO. Ogren, XM. Li, K. Fuxe, JA. Gustafsson. Persistent effects of subchronic toluene exposure on spatial learning and memory, dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 agonist binding in the rat. *Toxicology*: 77, 223-232 (1993).
 - 5) CM. Filley, W. Halliday, BK. Kleinschmidt-DeMaster. The effect of toluene on the central nervous system. *J Neuropath Exp Neur*: 63, 1-12 (2004).
 - 6) S. Makino, K. Hshimoto, PW. Gold. Multiple feedback mechanisms activating corticotrophin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Be*: 73, 147-158 (2002).

(7) Abstract

The effect of exposure to low concentration of toluene during long time (3 months) on
hypotalamo-pituitary-adrenal axis

Fumihiko Sasaki, Dwi Kesuma Sari, Sachi Kuwahara (Graduate School of Agriculture
and Biological Sciences, Osaka Prefecture University)

We analyzed the influences of exposure to low concentration of toluene during 3 months and the sensitization with ovalbumin (OVA) on hypotalamo-pituitary-adrenal axis utilizing immunocytological and RT-PCR methods. Mice were divided into 2 groups [non-allergy (NAG) group and allergy (AG) group]. Each group was subdivided into control group and toluene group, each of which was exposed 0 (air) and 50 ppm toluene. Thus, 40 mice consisted of NAG-control, NAG-toluene, AG-control and AG-toluene groups.

The number of corticotrophin releasing hormone (CRH)-immunoreactive (ir) neurons in paraventricular nucleus in the hypothalamus was more numerous in NAG-toluene group than that of NAG-control group. Immunoreactive neurons of AG-toluene group increased in number compared with those of NAG-control group.

The number of adrenocorticotropin hormone (ACTH)-ir cells in anterior pituitary in NAG-toluene group increased when compared with that of NAG-control group.

ACTH-ir cells were more numerous in AG-control and AG-toluene group than in NAG-control group. A similar pattern was found in ACTH-mRNA expression in anterior pituitary gland.

The present result suggests that toluene exposure and OVA sensitization have the effect on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis as a stressor.

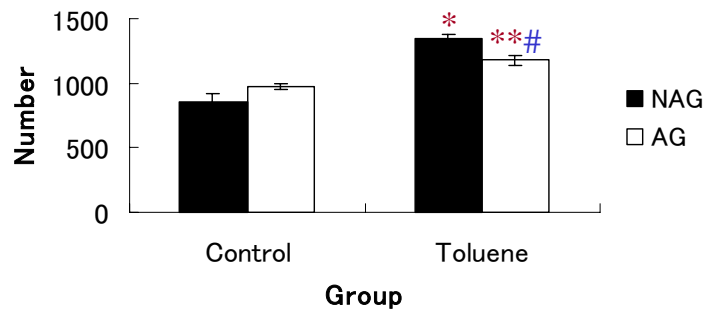


Fig. 1. The number of CRH-ir neurons in the paraventricular nucleus of hypothalamus of NAG and AG groups mice. Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NAG-control, ** $p < 0.05$ vs. AG-control and # $p < 0.05$ vs. NAG-toluene.

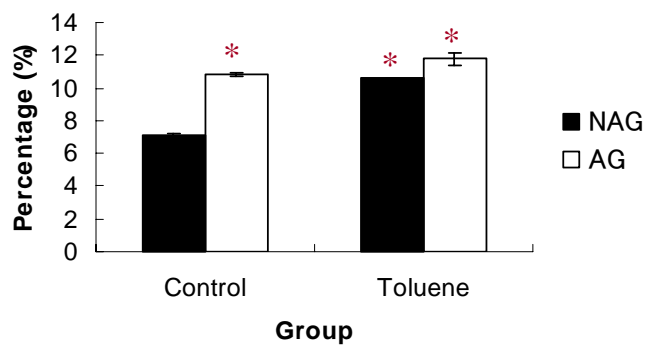


Fig. 2. The percentage of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland of NAG and AG groups mice. Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NAG-control.

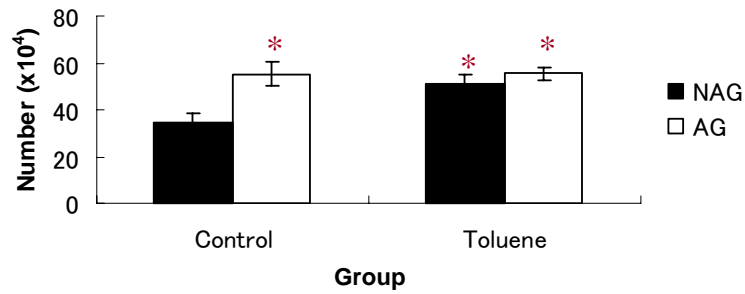
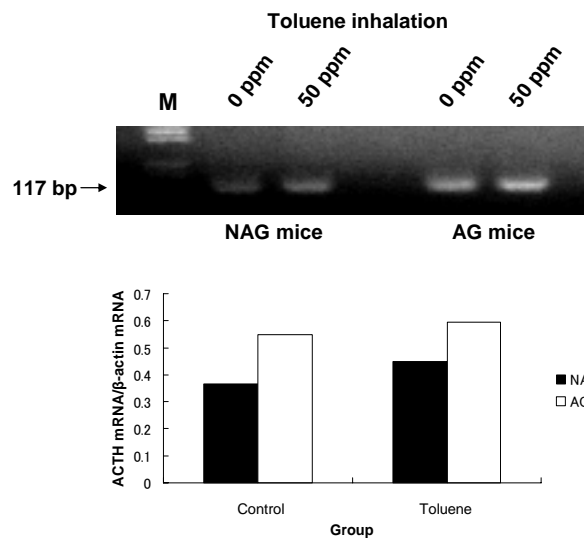


Fig. 3. The numbers of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland of NAG and AG groups mice. Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NAG-control.

Fig. 4. Quantitative RT-PCR analysis of expression of ACTH gene in the pituitary of NAG and AG groups mice



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^{注1}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^{注1}、NMDA型グルタミン酸受容体 ϵ 1及び ϵ 2サブユニット^{注2}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 ϵ 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、 ϵ 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¹⁾。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²⁾。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 μ 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- γ の顕著な低下がみられたが、TNF- α 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 α 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- γ 産生量の有意な低下がみられたが、TNF- α 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 β , 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。 ϵ 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。 ϵ 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- γ 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、 ϵ 1及び ϵ 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、 ϵ 1及び ϵ 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 ϵ 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)³⁾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, Kakeyama 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.

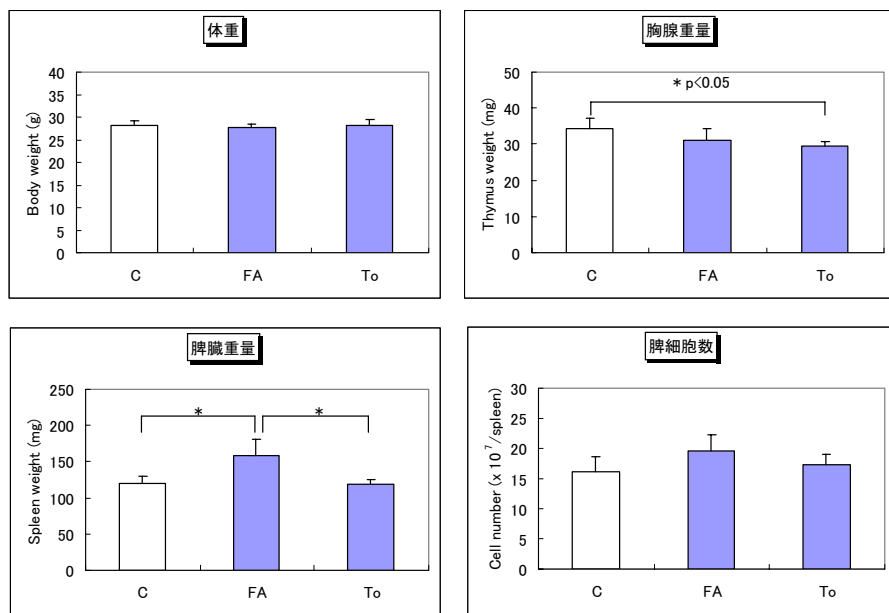


図1 ホルムアルデヒド、あるいはトルエンの6週間曝露による体重、臓器重量の変化

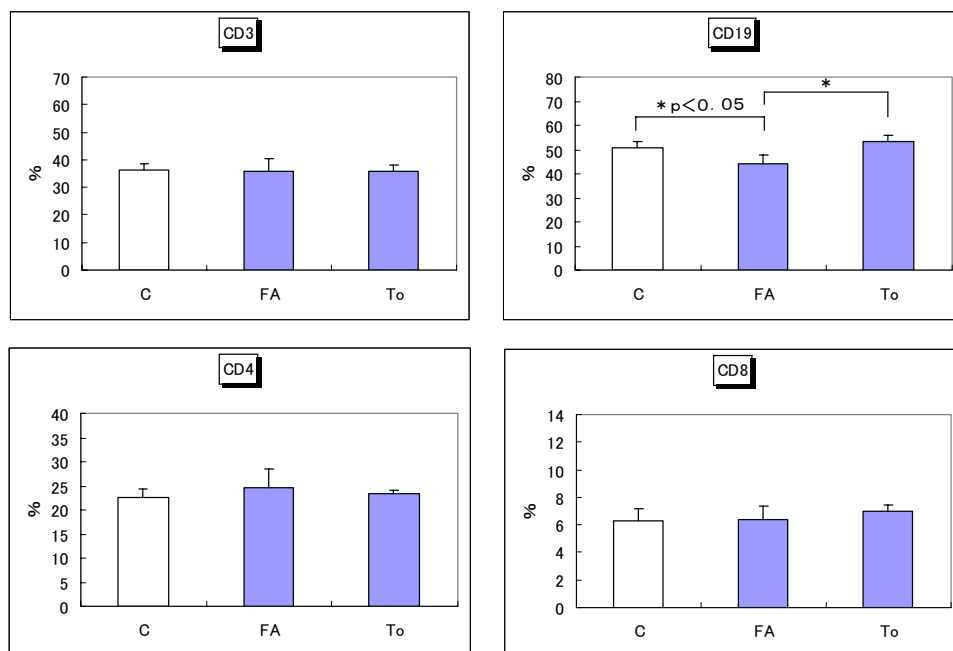


図2 ホルムアルデヒド、あるいはトルエンを6週間曝露したマウスの脾細胞 FACS 解析結果

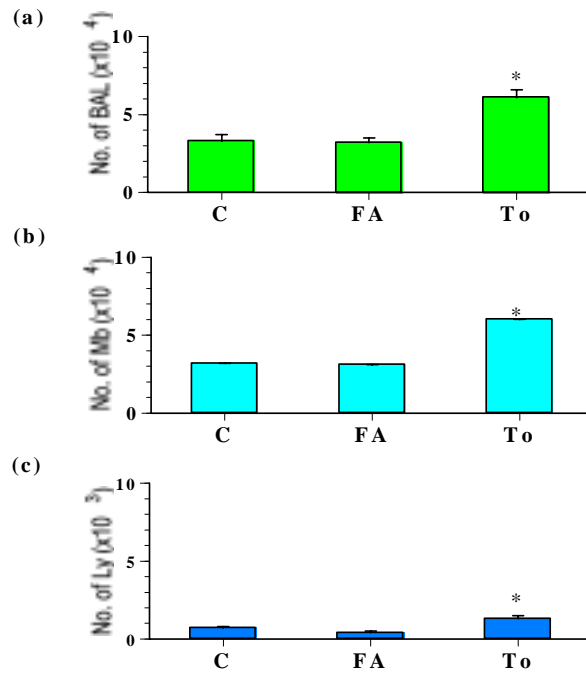


図3 ホルムアルデヒド、あるいはトルエンを6週間曝露したマウス肺胞洗浄液中の炎症性細胞数の変動 (a) No. of BAL($\times 10^4$), (b) No. of M ϕ , (c) No. of Lymph

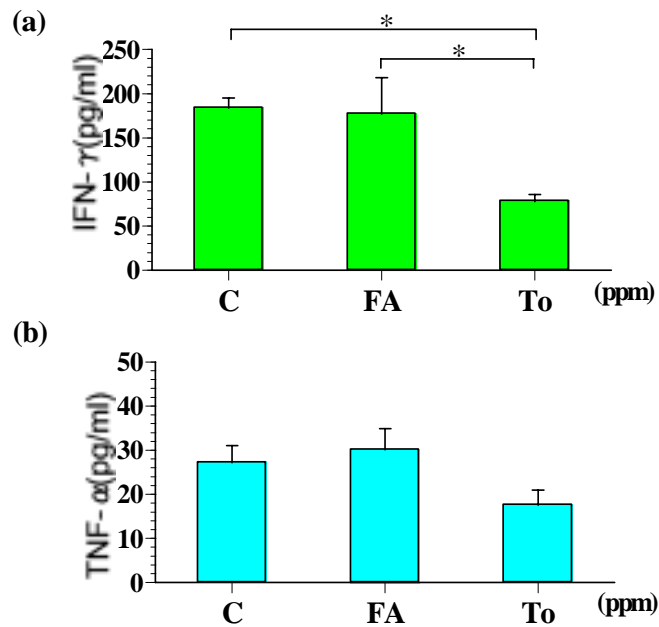


図4 ホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露したマウス肺胞洗浄液中のサイトカイン産生 (a) IFN- γ , (b) TNF- α

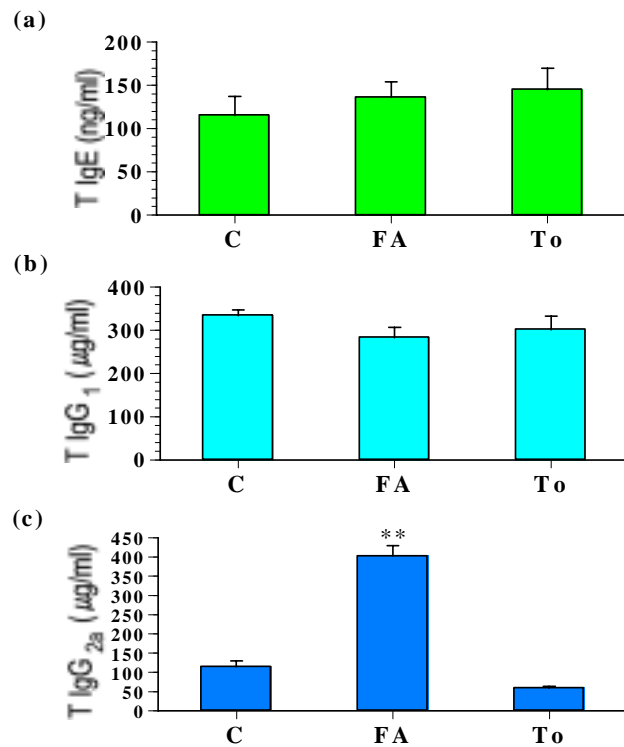


図5 ホルムアルデヒド、あるいはトルエンを6週間曝露したマウスの血漿中の抗体価
(a) Total IgE, (b) Total IgG1, (c) Total IgG2a

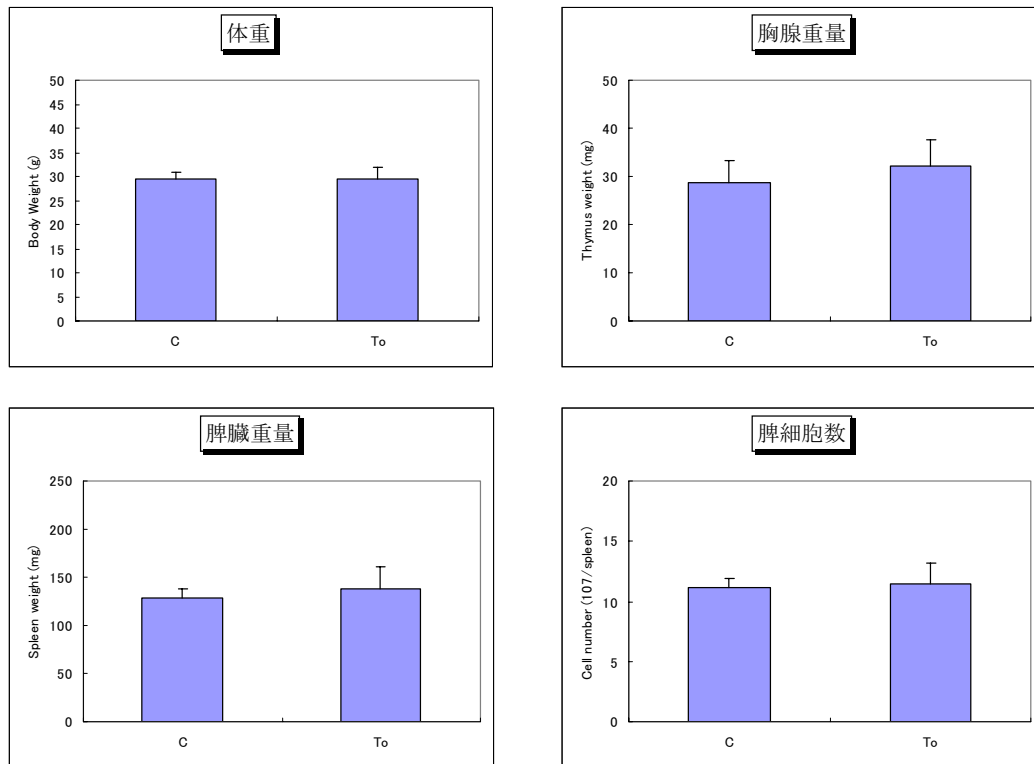


図6 12週間トルエン曝露したマウスの体重、および臓器重量の変動 (-OVA)

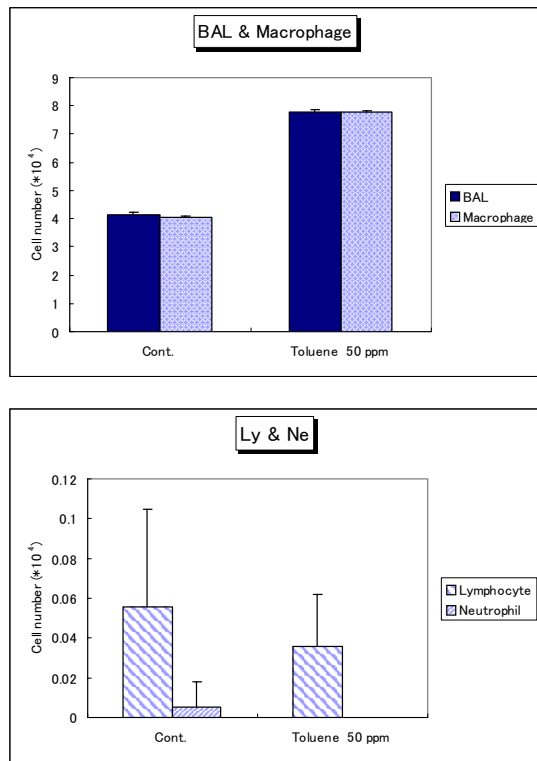


図7 12週間トルエン曝露マウスの肺胞洗浄液中の炎症性細胞の変動(-OVA)

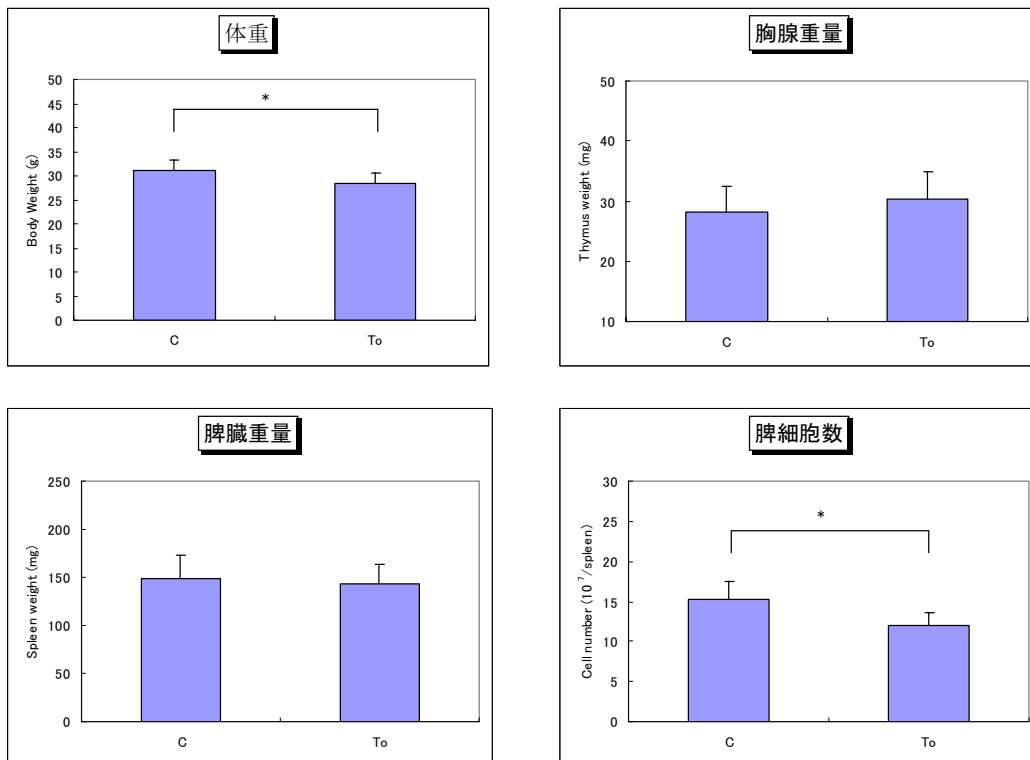


図8 12週間トルエン曝露したマウスの体重、および臓器重量の変動(+OVA)

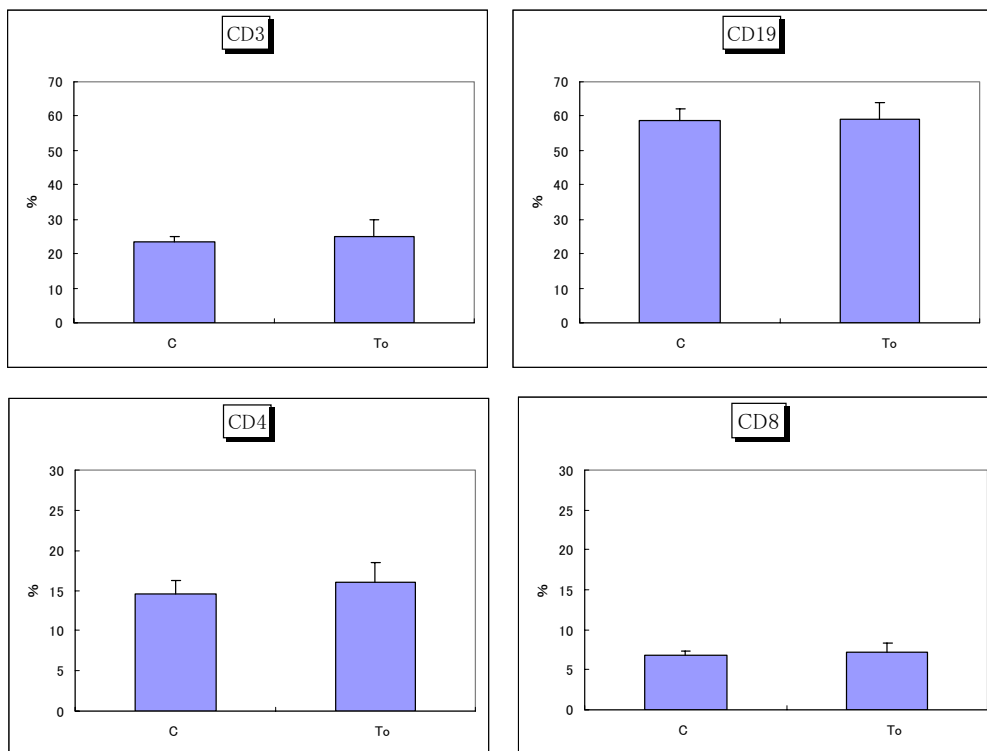


図9 トルエン曝露による脾臓でのリンパ球亜集団の変動 (+OVA)

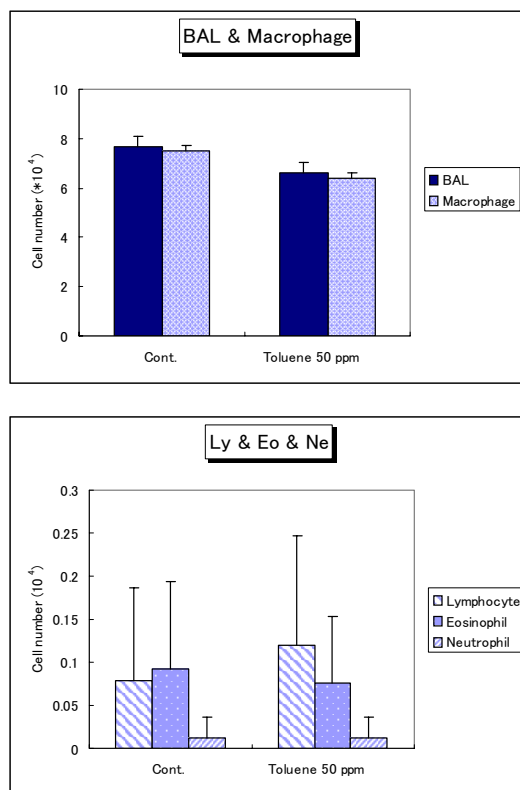


図10 12週間トルエン曝露マウスの肺胞洗浄液中の炎症性細胞の変動(+OVA)

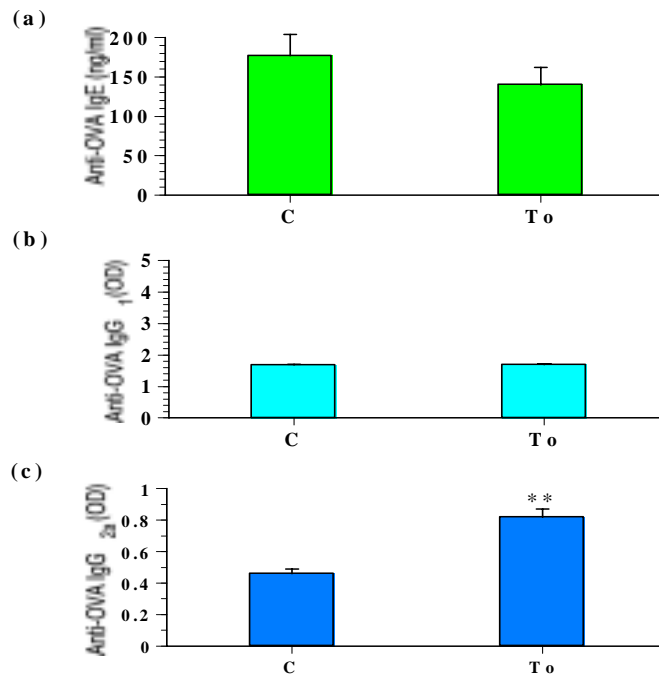


図 1.1 トルエンの 12 週間曝露による血漿中の抗原特異的抗体価の変動
 (a) anti-OVA IgE, (b) anti-OVA IgG₁, (c) anti-OVA IgG_{2a}

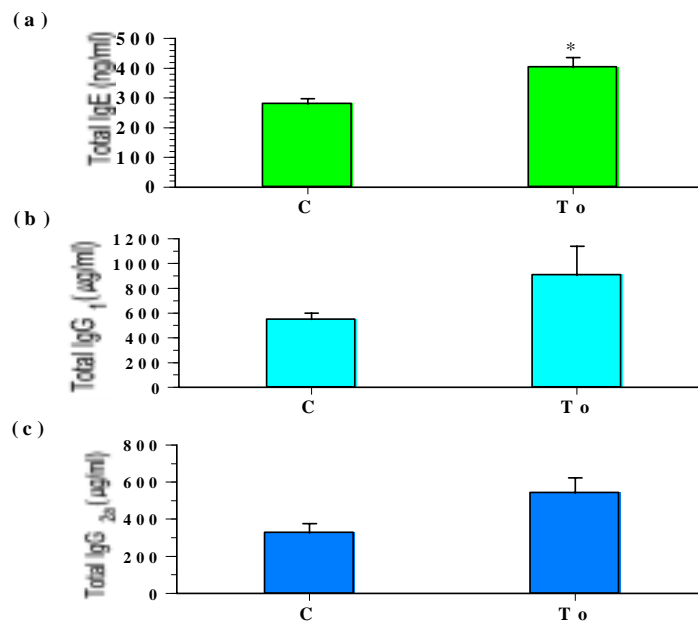


図 1.2 トルエンの 12 週間曝露による血漿中の抗体価の変動
 (a) Total IgE, (b) Total IgG₁, (c) Total IgG_{2a}

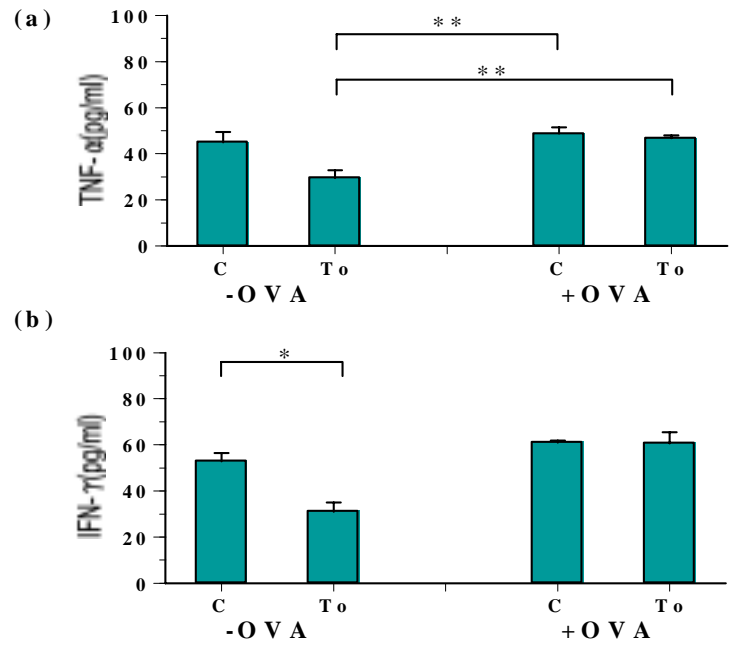


図 1 3 トルエン曝露したマウスの肺胞洗浄液中のサイトカイン産生の変化
(a) TNF- α , (b) IFN- γ

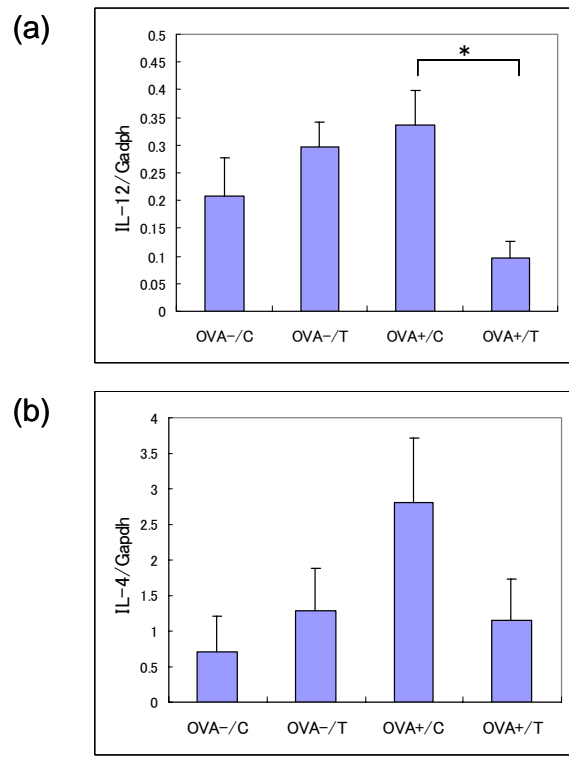


図 1 4 トルエン曝露マウスの脾臓におけるサイトカイン mRNA の発現

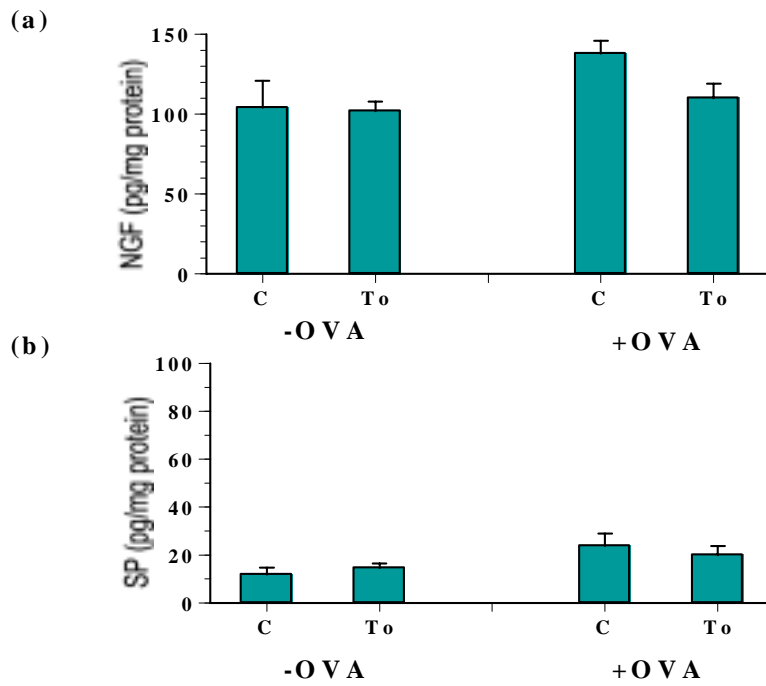


図 15 トルエン曝露したマウスの海馬における NGF (a) と substance P (b) の変動

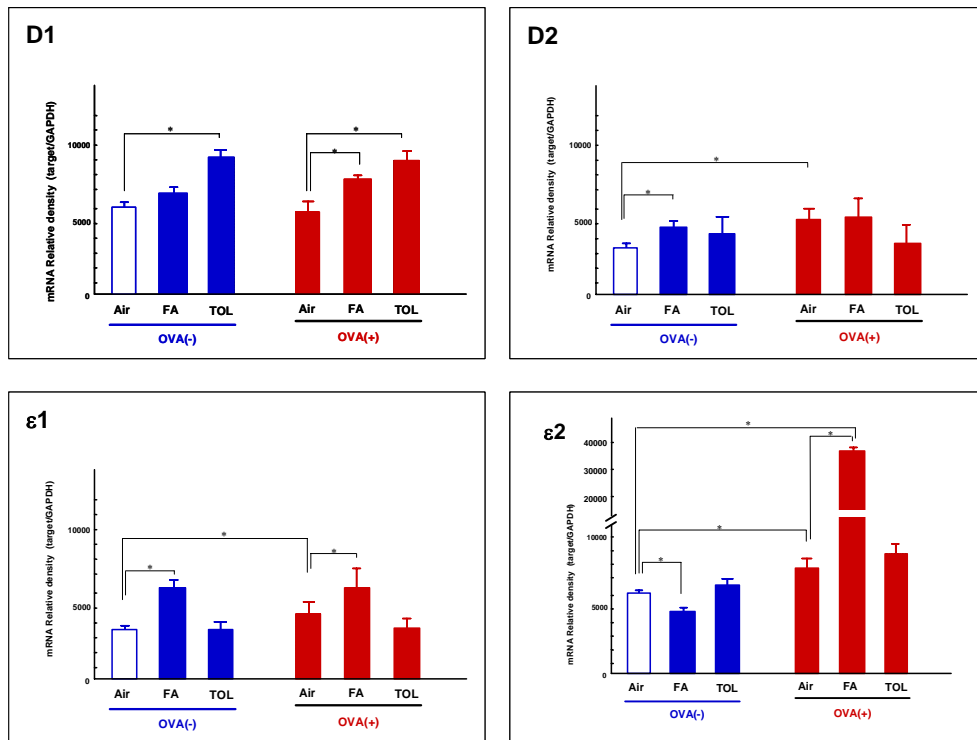


図 16 RT-PCR による神経伝達物質受容体 mRNA 発現