

II. 研究者及び研究協力者名簿

1. 低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅球系の形態学的解析
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
2. ホルムアルデヒド及びトルエンの長期曝露が視床下部—下垂体—副腎軸に及ぼす影響
佐々木文彦 大阪府立大学大学院
トウイ・ケスマ・サリ 大阪府立大学大学院
桑原 佐知 大阪府立大学大学院
3. 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
夏目季久代 九州工業大学大学院
黒河 佳香 独立行政法人国立環境研究所
福永 浩司 東北大学大学院
栗生 修司 九州工業大学大学院
福田 孝一 九州大学大学院医学研究科
吉田 安宏 産業医科大学医学部
4. 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、及び神経—免疫軸への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
黒河 佳香 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
掛山 正心 独立行政法人国立環境研究所
樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部
5. ホルムアルデヒド曝露後の自発運動量の観察、およびホルムアルデヒドあるいは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
嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部
笛田由紀子 産業医科大学産業保健学部
樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部
6. その他の影響
佐藤 房枝 産業医科大学産業保健学部
菊池 亮 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
樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

Ⅲ. 研究結果報告

1. 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、その情報は嗅球から大脳辺縁系を経由して高次脳中枢へと運ばれる。この感覚系は嗅覚系と呼ばれる。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嗅覚器、嗅球、大脳辺縁系で形態学的に解析した。嗅覚系のなかで、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。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、嗅球のドーパミンニューロンの活動が変化する。これをドーパミン合成酵素の TH（チロシン水酸化酵素、(tyrosine hydroxylase)）量あるいは TH 陽性細胞が減少することで解析可能である。この方法により、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することにした。嗅覚系の高次中枢である大脳辺縁系特に扁桃体は、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、自律機能や内分泌機能への影響も考えられる。そこで、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。この解析のために、Parvalbumin と、Calbindin の Ca 結合タンパク質免疫陽性ニューロンを用いた。大脳辺縁系におけるこれらのニューロンは、抑制性シナプス伝達物質である GABA と共存することが知られている。したがって、これら GABA ニューロンの増減活動をモニターできれば、機能的解析に大変有効であると考え Ca 結合タンパク質免疫陽性ニューロンの低濃度ホルムアルデヒドによる影響を解析した。

（2）方法

低濃度ホルムアルデヒド（0, 400, 800, 2000 ppb）を3ヶ月間曝露したマウスを、組織標本用に固定し、嗅覚系（嗅上皮、嗅球および大脳辺縁系）を形態的に電子顕微鏡および免疫細胞化学的に解析した。特に、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）および 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、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。

（3）結果

低濃度ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅上皮の解析

ヘマトキシリン-エオジンおよびニッスル染色で嗅上皮を観察した結果、細胞数の減少や上皮の厚さについて、グループ間で差は認められなかった。Olfactory marker protein（OMP）は嗅細胞に特有に存在する蛋白質で、成熟嗅細胞のマーカーとして利用されている。OMP の抗体を用いて曝露嗅粘膜を

観察した。嗅上皮下半層部に OMP 陽性細胞が観察され、粘膜固有層には OMP 陽性の嗅神経の束が走っているのが観察される。これらの染色性に関して、グループ間で染色性に特に有意な差はみとめられなかった。これは、嗅細胞は、曝露の影響で変性死滅することにより、成熟が止まったりその数を減少することなく、嗅上皮に存在することを意味する結果である。

嗅細胞の上皮表面に突出している嗅小胞や繊毛および支持細胞の微絨毛の形態異常を示すマウスは 2000ppb 曝露グループでわずかに認められた。認められた形態異常は変性像としては軽微なもので、機能障害を示すほどのものではないと思える。

嗅球ニューロンの解析

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 1 である。0 ppb 群に比べて 400, 2000 ppb 曝露群で有意に TH 陽性細胞が増加している事が明らかになった (Hayashi et al, 2004)。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。

Calbindin 陽性ニューロンは糸球体および外叢状層に存在する。それぞれを計測した結果、ホルムアルデヒド曝露による影響は認められなかった。Parvalbumin 陽性ニューロンは外叢状層に存在する。このニューロンを計測した結果、曝露群で増加する傾向が認められた。この結果、嗅球に存在する Ca 結合タンパク質含有ニューロンも、ホルムアルデヒド曝露の影響を受けている事があきらかになった。

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。

大脳辺縁系ニューロンの解析

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、梨状葉皮質、扁桃体内側核である。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した。

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 Ca 結合タンパク質含有ニューロンでは、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 (Kempainen & Pitkanen 2000)。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

一するのには有効であると考え、免疫細胞化学的に解析した。

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。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 (図2)。

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。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 (図3)。

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の結果、ホルムアルデヒド長期曝露により、Ca 結合タンパク質含有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示唆された。Ca 結合タンパク質含有ニューロンは、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。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。

(4) 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 (図4)。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。

(5) 文献

- Hayashi H, Kunugita N, Arashidani K, Fujimaki H, Ichikawa M (2004) Long-term exposure to low levels of formaldehyde increases the number of tyrosine-hydroxylase-immunopositive periglomerular cells in mouse main olfactory bulb Brain research 1007: 192-197.
- Kempainen S, Pitkanen A (2000) Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. J Comp Neurol. 426:441-67.

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

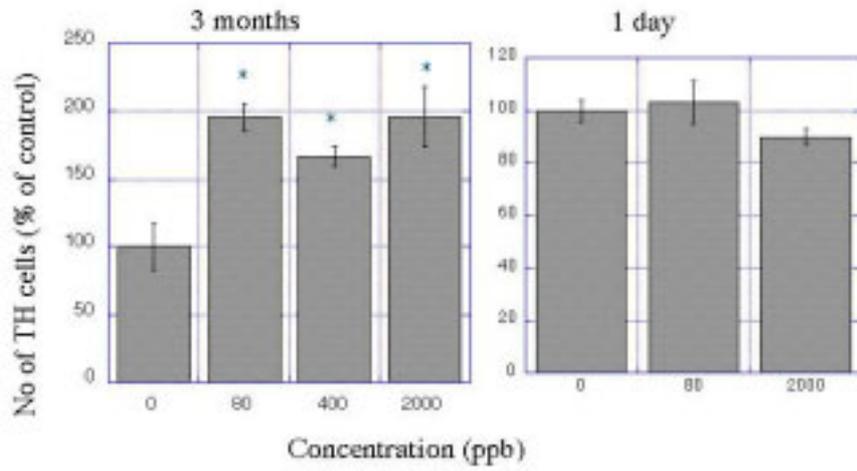


図1

ホルムアルデヒド長期曝露マウス大脳辺縁系
Parvalbumin

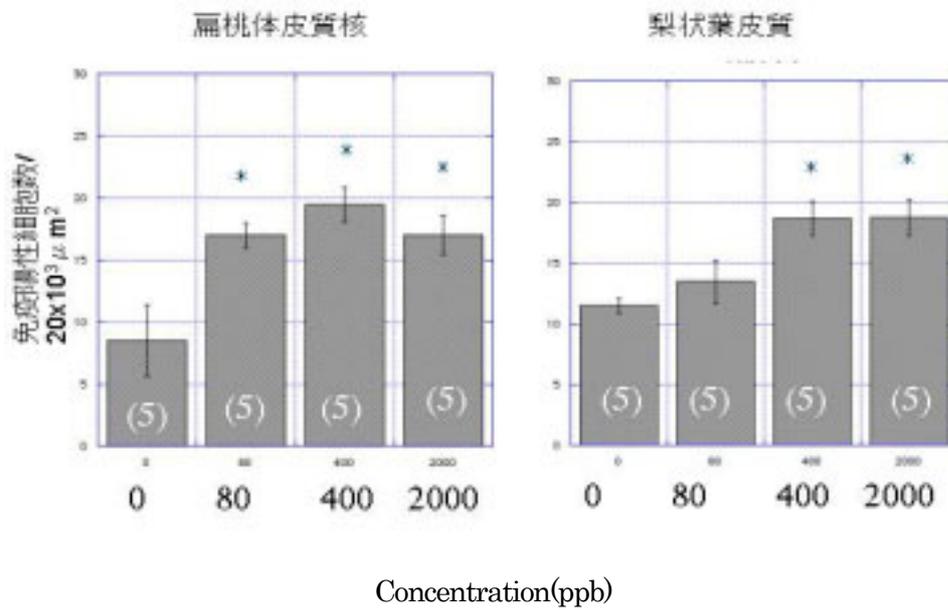


図2

ホルムアルデヒド長期曝露マウス大脳辺縁系 Calbindin

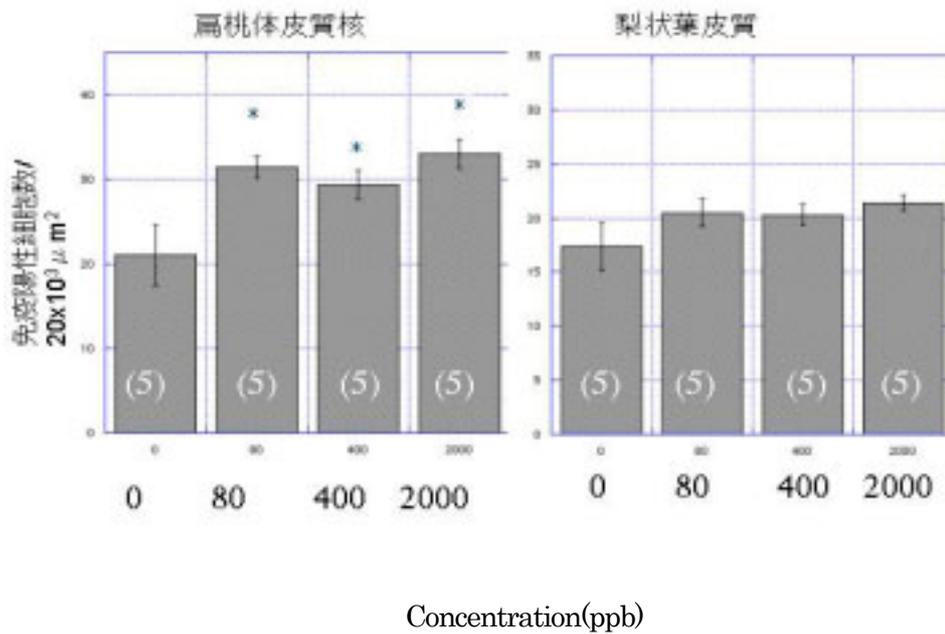


図3

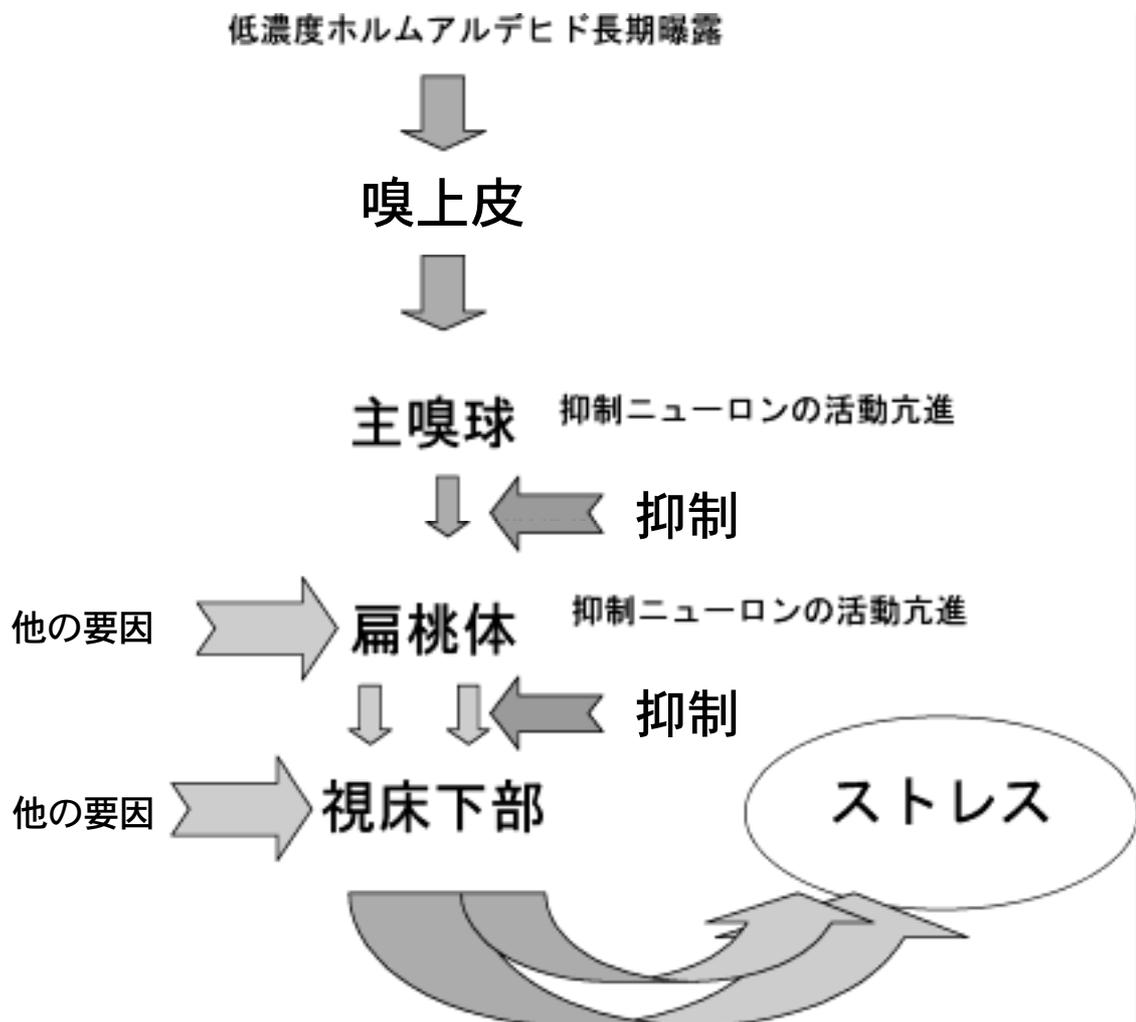


図4