

有害化学物質情報の生体内高次メモリー機能の解明と
それに基づくリスク評価手法の開発に関する研究

(特別研究)

Studies on evaluation of memory function for exposure to environmental chemicals and the development
of the tool for risk evaluation in mice

平成15～17年度

FY 2003～2005

有害化学物質情報の生体内高次メモリー機能の解明とそれに基づくリスク評価手法の開発に関する研究

平成15～17年度

有害化学物質情報の生体内高次メモリー機能の解明と
それに基づくリスク評価手法の開発に関する研究
(特別研究)

Studies on evaluation of memory function for exposure to environmental chemicals and the development
of the tool for risk evaluation in mice

平成15～17年度

FY 2003～2005

特別研究「有害化学物質情報の生体内高次メモリー機能の解明とそれに基づく
リスク評価手法の開発に関する研究」
(期間 平成15～17年度)

特別研究責任者：藤巻秀和
特別研究幹事：藤巻秀和
特別研究報告書編集担当：藤巻秀和

序

本報告書は、平成15～17年度の3年間にわたって実施した特別研究「有害化学物質情報の生体内高次メモリー機能の解明とそれに基づくリスク評価手法の開発に関する研究」の研究成果を取りまとめたものです。

近年、居住環境が原因と考えられる「シックハウス症候群」や「多種化学物質過敏状態」(いわゆる化学物質過敏症)の増加が報告され、いずれも室内に存在している比較的低濃度の化学物質が関与して健康を害していると考えられています。これまで、化学物質の健康影響については、化学物質の曝露による体内への蓄積あるいは代謝産物が、化学物質の毒性の発現をとおして健康影響を誘導すると推測されてきました。しかし、最近の居住環境中にみられる低濃度レベルの揮発性を有する化学物質で体調不良が誘導されることから、これまで明らかになっている毒性発現の機構では説明できない反応がおきている可能性が推察され、非アレルギー性の過敏症とも考えられています。

このような背景のもとに、本研究では、過敏な感覚から連想される記憶機能に焦点を絞り、揮発性の有害化学物質を低濃度で曝露したときの嗅覚から大脳辺縁系にいたる神経情報伝達系の記憶機能かく乱のメカニズムと、免疫・アレルギー系を介した情報伝達と免疫記憶かく乱のメカニズムを取り上げました。あわせて、それらの研究成果をヒトでの健康影響評価に結びつけるための新たな手法の開発も行いました。成果としては、(1)長期ホルムアルデヒド曝露により、海馬において記憶・学習にかかわるNMDA受容体発現が増強されることを明らかにしました。また、嗅球や扁桃体における情報伝達回路で、抑制系の増強が明らかとなりました。さらに、ストレス応答領域である視床下部からのホルモンの過剰産生が認められ、長期ホルムアルデヒド曝露が恒常的に記憶形成機構に変調を生じた可能性が示唆されました。(2)低濃度のトルエンの長期曝露は、マウス海馬でNMDA受容体サブユニットNR2Bの発現増強を介して、細胞内情報伝達回路のアップレギュレーションを引き起こすことを明らかにしました。(3)低濃度のホルムアルデヒドやトルエン曝露では、免疫記憶機能への顕著なかく乱は認められませんが、神経成長因子の産生を介して神経系との相互作用を修飾していることが明らかとなりました。(4)揮発性化学物質の体内動態に関して、マイクロ固相抽出法を用いて脳内での揮発性物質を、簡便に短時間で検知する手法が開発できました。

本研究の成果を大気や室内環境中の揮発性有機化合物による健康影響の解明に役立てるとともに、さらに影響評価手法の開発や高度化によって健康リスク評価の推進に貢献したいと考えています。

本研究の推進にあたり、ご協力やご助言をいただいた研究所内外の多くの方々に深く感謝する次第です。

平成 18 年12月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 大塚 柳太郎

目 次

1	研究の目的と構成	1
1.1	研究の背景と目的	1
1.2	研究の構成	2
2	研究の成果	3
2.1	有害化学物質の曝露による脳・神経系における記憶機能かく乱作用の解析	3
2.1.1	長期ホルムアルデヒド曝露による海馬での記憶機能変動解析	3
2.1.2	低濃度ホルムアルデヒド曝露による嗅球，扁桃体，視床下部での情報伝達のかく乱	5
2.1.3	長期トルエン曝露による海馬における情報伝達系のかく乱	6
2.2	有害化学物質曝露による免疫系における記憶機能かく乱作用の解析	8
2.2.1	長期VOC曝露の免疫記憶への影響	8
2.2.2	長期VOC曝露と抗原の感作による神経免疫軸のかく乱	11
2.2.3	トルエン鼻部曝露による免疫記憶機能への新たな影響解析	15
2.3	体内動態評価	18
2.3.1	脳内動態の解明	18
2.3.2	家屋内における揮発性物質の実測	19
2.3.3	嗅球・海馬における記憶機能の新たな評価手法の開発	23
2.4	まとめと今後の展開	29
[資 料]		
	研究の組織と研究課題の構成	33
1	研究の組織	33
2	研究課題と担当者	33
	研究成果発表一覧	34
1	誌上発表	34
2	口頭発表	36
3	平成15～17年度特別研究セミナー・ワークショップ	40

1 研究の目的と構成

1.1 研究の背景と目的

近年、「シックハウス症候群」や「多種化学物質過敏状態」(いわゆる化学物質過敏症)の増加が報告され、いずれも居住環境中に存在している比較的低濃度の化学物質の影響が関与して健康を害していると考えられている。我々の環境中にはダニ、カビ、花粉などの生物因子、電磁波や紫外線などの物理因子も化学因子とともに存在しているため、その真の原因については不明な点が多く特定できていないが、化学物質のなかでは揮発性有機化合物が何らかの関連を持っているといわれている。「シックハウス症候群」の主な自覚症状は、皮膚、眼、鼻、のどなどの皮膚・粘膜刺激症状、頭痛、めまい、全身倦怠感などの不定愁訴であり、「多種化学物質過敏状態」の症状としては、粘膜刺激症状以外に、消化器、循環器、中枢神経、自律神経の症状や障害など多彩であり、アレルギー疾患などとの臨床症状の類似点も見られている。

先進国の共通の悩みであるアレルギー疾患の増加と環境中の化学物質との因果関係を示唆する科学的知見も多く見られ、大気中のディーゼル排気粒子のような粒子状物質の中に増悪をうながす物質の存在することが明らかとなっている。しかしながら、化学物質を曝露されるすべての人々がアレルギー症状を示すわけではなく、アレルギー素因を持っている人か、あるいはすでになんらかの炎症の症状を示している一部の人々が影響を受けやすいことから、遺伝的因子と環境因子との相互の関連が症状悪化に重要と考えられている。

ところで、我々の体には、外界からの刺激に対して常に体内の状態を健康な状態に保つために恒常性の維持機構が備わっており、神経免疫内分泌間の連携が重要な役割を担っている。中でも、記憶機能は、神経系と免疫系に備わっている生命維持に必須の機能である。神経系における記憶機能の中核は大脳皮質と海馬であり、五感から入った情報の統合と蓄積に重要な役割を果たしている。一方、免疫系における記憶機能はリンパ球により維持されており、一度侵入した抗原情報が記憶され、2度目以降の侵入には迅速に、かつ大規模に反撃できる体制をととのえる働きをしている。神経系と免疫系は、記憶機能以外にも、産生する情報伝達因子において共通の因子がそれぞれの機能を制御していることが、近年明らかとなっている。リンパ球が、神経成長因子の受容体を

発現するとともに、神経成長因子を産生・分泌することが報告されている。逆に、脳内のグリア細胞は免疫情報伝達物質として働くサイトカインを分泌して、脳内での炎症にかかわっていることも明らかとなっている。

したがって、化学物質による情報伝達因子産生や記憶機能のかく乱は、恒常性機構の維持にも大きく影響することが考えられる。しかしながら、これまでの神経免疫内分泌系への化学物質による曝露の影響は、環境中の濃度よりはるかに高い濃度域での毒性評価が主であった。化学物質の曝露による体内への蓄積あるいは代謝産物が、化学物質の毒性の発現をとおして健康影響を誘導すると考えられてきた。だが、最近の居住環境による健康影響を評価するときに室内濃度レベルで報告されている揮発性の化学物質による健康不良の誘導には、これまで明らかになっている毒性発現の機構では説明できない反応がおきている可能性がある。低濃度域での揮発性化学物質の曝露による神経免疫軸を中心とした機能への影響については、国際的にも報告が非常に少ない。

そこで、我々は、低濃度域における化学物質の影響は、化学物質を曝露したときに刺激情報としても認識され、体内で情報として蓄積されていく過程(図1)、あるいはその情報の蓄積が神経系、免疫系で何らかの影響を誘導し、遺伝素因と関連して恒常性の維持機構の破綻、あるいはかく乱として現れることを仮定した。

記憶機能についての検索は、神経、免疫に共通で生命維持機能として重要なだけでなく、現実に問題となっている化学物質過敏症での集中力、記憶力の低下の解明にもつながる。また、アレルギー反応の増悪に重要な記憶産物であるIgE抗体の産生は抗体クラススイッチの機構

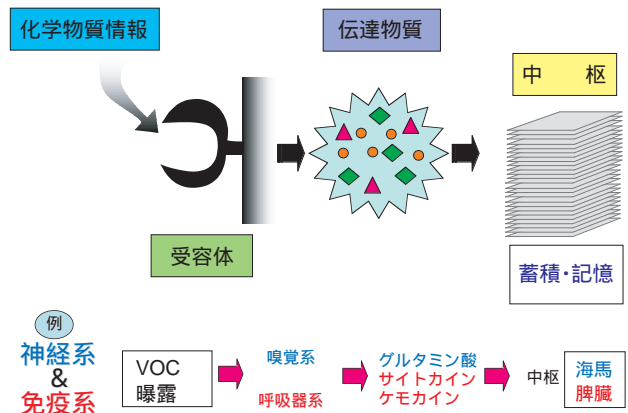


図1 化学物質情報伝達の模式図

のかく乱がかかわっていることを考えると、記憶機能についての研究は化学物質の影響が鋭敏に現れる指標の探索になりえる可能性も考えられた。

本研究では、神経免疫内分泌系の機能のなかで情報の蓄積される記憶機構に焦点をあて、比較的低濃度域での揮発性有機化合物に着目し、

- 1) 嗅覚系を介した脳・神経系における情報伝達の過程、および海馬を中心とした記憶にかかわる領域での解析、
- 2) 呼吸器系を介した免疫系リンパ性器官への情報伝達、最終的な記憶産物としての抗体産生までの情報伝達経路における解析、
- 3) 化学物質曝露後の脳内動態と環境中揮発性化学物質濃度の実態把握を加味して神経免疫系における記憶機能のかく乱作用を考察し、その健康リスク評価に役立つ指標や手法の開発を目的とした。

1.2 研究の構成

本特別研究では、居住環境における濃度が高いことが報告され「シックハウス症候群」などとの関連が指摘されているホルムアルデヒドとトルエンを主に用いて、揮発性有機化合物（VOC）の脳・神経免疫軸を中心とした情報の流れ（図2）を解明し、その影響を明らかにするために、以下の3課題をもうけて研究を構成した。

・脳・神経系における化学物質の影響解析および評価手法の開発

化学物質の曝露による情報の取得、伝達、記憶としての蓄積について、嗅覚と海馬における反応について解析する。海馬は記憶や学習の中枢であり、記憶に関

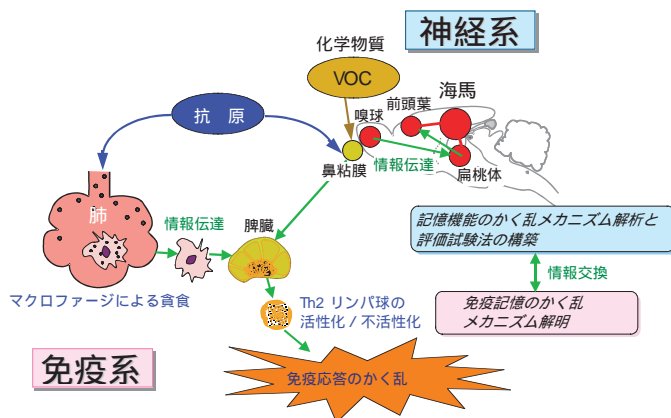


図2 神経-免疫軸のかく乱を想定した図

与する神経細胞のシナプスの可塑性が^{*1}有機溶剤曝露により影響を受けるとの報告およびシックハウス症候群や本態性の化学物質過敏症の症状として集中力、記憶力の低下がみられるという報告から標的の器官として海馬を選択した。この海馬における神経細胞の生理的機能変化、グルタミン酸作動性興奮性ニューロンの量的変化および嗅球、扁桃体など脳の他の部位とのネットワークの構造的変化、量的変化を明らかにする。また、化学物質曝露による海馬等での変動がいかに記憶・学習機能に反映するかを調べるための学習行動のマウスモデルの構築を行う。

・免疫系における化学物質の影響解析

異物としての抗原情報の伝達、情報の蓄積産物としての抗体産生について化学物質の曝露による影響を解析する。

具体的には、免疫系における化学物質に対する特異的記憶機能はリンパ球が重要な機能を担っているためリンパ球を中心として検索する。化学物質の曝露後に化学物質をハプテンとして認識した結果の特異抗体の産生の有無、Bリンパ球、Tリンパ球亜集団の変動、および細菌感染や抗原物質の投与に対する増強反応を検索する。また、脳神経免疫相互間での作用機構を解析するため、化学物質を曝露したマウスの大脳辺縁系や免疫臓器でのサイトカイン・ケモカイン類や神経成長因子、神経ペプチドなどの動態を検索する。さらに、リンパ球欠損動物への化学物質の曝露による神経伝達物質の動きを検索する。

・体内動態の測定および曝露評価

揮発性化学物質の曝露による吸収、体内動態、蓄積に関する新たな情報を得るための手法の開発と検証を行う。

体内動態評価研究では動物実験と平行して、まず、神経系などに影響を与える化学物質の動態に関する文献調査および過敏症患者の居住環境等の基礎調査を行い、被検化学物質の絞込みを行う。また、投与された化学物質がどのように脳神経系、免疫系に作用するのか明らかにするために、血液中や脳内での動態について曝露動物を用いて高感度化学分析法により解析する。

^{*1}シナプスの伝達効率の変化が長期間持続する性質。

2 研究の成果

2.1 有害化学物質の曝露による脳・神経系における記憶機能かく乱作用の解析

揮発性有機化合物などの化学物質の曝露による鼻粘膜の刺激は、感覚細胞（嗅細胞）で受けとられ、その情報は嗅球から大脳辺縁系を經由して高次の脳中枢へと運ばれる。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り、海馬、梨状葉、扁桃体などが含まれている。このうち、嗅球からの情報は、扁桃体、梨状葉をへて大脳皮質嗅内野に届けられる。ここはさまざまな感覚の情報が統合される領域であり、その統合された神経情報は海馬へと入り、海馬から視床その他へと情報が伝達される（図3）。化学物質曝露によるかく乱情報が海馬内に入って増幅され、視床下部の神経活動をストレス対応へと増強させる可能性がある。記憶・学習の中核である海馬において明らかになったかく乱作用を中心に成果をのべる。

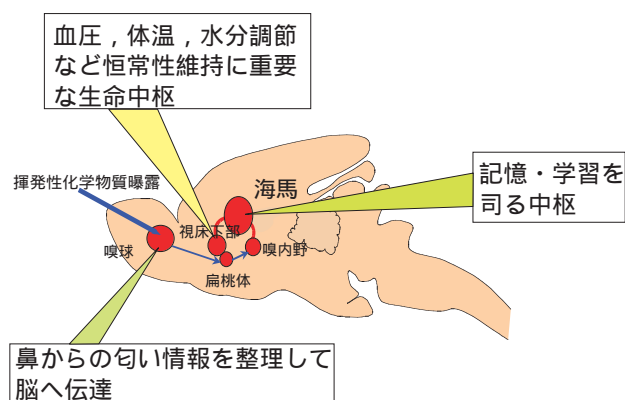


図3 化学物質吸入による情報かく乱

2.1.1 長期ホルムアルデヒド曝露による海馬での記憶機能変動解析

脳・神経系は化学物質の曝露に対して感受性が高い可能性があり、低濃度のホルムアルデヒド曝露を行うことにより神経細胞に毒性を示すか否かを検討した。

低濃度の長期ホルムアルデヒド曝露による海馬での神経細胞への影響を解析するために、雌のC3H/HeNマウスを用いて0, 80, 400, 2000ppbの濃度で6週間と12週間の全身曝露を行った。嗅上皮、海馬、呼吸器での組織学的変化を病理組織学的手法で調べたが、0ppbの対照群と比べいずれの曝露群においても有意な変化はみられなかった。次に、海馬における神経細胞の増殖や分化にかか

わる神経栄養因子の産生について各曝露群で検討した。ELISA法により神経成長因子（NGF）と脳由来成長因子（BDNF）の産生量を測定した結果、NGFとBDNFともに変動はみられなかった。したがって、今回のホルムアルデヒド曝露の条件は、脳内の領域の神経細胞に強い毒性を示す濃度ではないと考えられた。

海馬は記憶・学習を司る中枢であり、記憶の成立のために働く脳・神経系の最小ユニットはシナプスと考えられ、シナプス同士の結合の強度（すなわち、シナプスでの興奮伝達の効率）のなかに、記憶すべきパターンが刻印されることになる。あるシナプスで興奮伝達の効率が高いことは、そのシナプスに入力した刺激に対して特異的に興奮しやすい神経回路が作りあげられていることに等しい。興奮性ニューロンが形成するいくつかのシナプスにおいては、シナプスでの興奮伝達の効率が、刺激の受け取りのくりかえしによって長期にわたり増大するという現象（長期増強，LTP）が観察される。この現象は海馬において特に著しく、LTPこそがシナプスにおける記憶成立の基本となる電気生理学的な事象であると現在では考えられている。このLTPは海馬から作製したスライス標本においても観察が可能であり、特定パターンの人工的な電気刺激をシナプスに集中的に負荷すると、それ以降のシナプス伝達の効率が30分～数時間にわたって高いレベルを維持しつづける。本研究のように揮発性有機化合物の吸入を嗅覚刺激ととらえて、その嗅覚情報がどのように脳神経系に記憶されるかを調べる場合、揮発性有機化合物の吸入を気道粘膜経由での生体への負荷ととらえて、吸収された揮発性有機化合物が直接に記憶機能に働きかけて影響を及ぼす可能性を最初に調べておく必要があると考えた。そこで、400ppbホルムアルデヒドの曝露による海馬全汎のシナプス伝達効率に変化する可能性について電気生理学的手法を用いて検討した。

シナプス伝達効率を評価するために、2種類の項目を調べた。まず、シナプスの伝達効率の基底レベルを評価するため、シナプスにおける入力/出力関係を評価した。ホルムアルデヒド曝露実験での2群における入力/出力関係のグラフの解析では、対照群と曝露群間に有意な差異は観察されなかった（図4）。つづいて、シナプスにLTPを導入し、その増強の程度を評価した。400ppbホルムアルデヒド曝露と対照群とにおけるLTP増大のグラフ

および解析結果において、2群間に有意な差異は観察されなかった(図5)。2000ppbでも同様の結果であった。

以上の結果より、低濃度のホルムアルデヒドの長期曝露によって、海馬の全汎的なシナプス伝達効率に影響はあらわれないことが示された。言いかえるならば、低濃度のホルムアルデヒドの吸入にともなう海馬の情報処理をモニターする際には、海馬におけるシナプス伝達(すなわち海馬の記憶機能)に対して化学物質が全汎的な影響を与える可能性については、重要視する必要がないと考えられた。

長期的なホルムアルデヒド曝露により海馬の情報伝達回路が恒常的な変化をおこした場合に、神経伝達物質の受容体の遺伝子発現になんらかの変化があらわれると仮定した。シナプス伝達において、グルタミン酸は重要な働きをしている神経伝達物質であり、その受容体はN-methyl-D-aspartate (NMDA)型、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)型、カニン

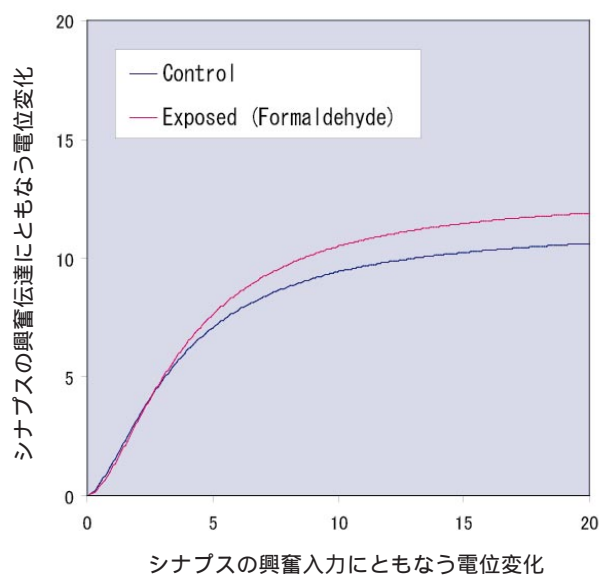


図4 ホルムアルデヒドを曝露したマウスにおける海馬シナプスの入出力関係

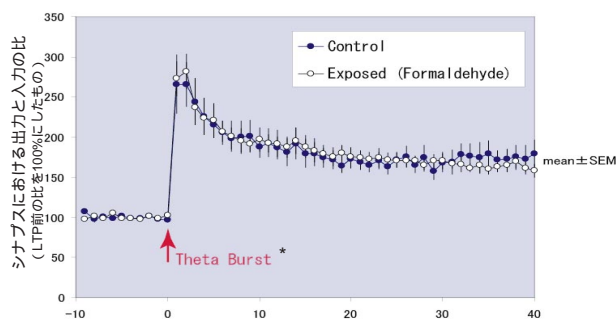


図5 ホルムアルデヒドを曝露したマウスにおける海馬シナプスのLTP * 5回/秒のバースト電気刺激

酸型に分類される。特に、NMDA型グルタミン酸受容体を介した海馬における興奮性アミノ酸の神経伝達回路は、シナプスの可塑性、記憶・学習機能、細胞生存などに重要な役割を果たしている。中でもNMDA受容体サブユニットであるNR2AとNR2Bは海馬に多く発現しており、これらのサブユニットの機能は学習行動やシナプスの長期増強に密接に関連している。

我々はこのNMDA型グルタミン酸受容体の動きに着目し、12週間の400ppbホルムアルデヒド曝露による海馬でのNMDA受容体サブユニットNR2AとNR2B mRNAsの発現をリアルタイムPCR法で検討した。その結果、ホルムアルデヒド曝露群のNR2A mRNAの発現において有意な増加を認めた(図6)。卵白アルブミン(OVA)を生物因子の刺激として用いたモデルマウスにホルムアルデヒド曝露を行い、神経情報伝達系のかく乱について検索した。その結果、OVAの刺激は、NR2A mRNAの発現を増強し、ホルムアルデヒド曝露もまたNR2A mRNAの発現増強に働くことが明らかとなった。しかし、OVAとホルムアルデヒドとの相加作用はみられなかった。また、ドーパミンの受容体であるD1とD2 mRNAsの発現では、ともに曝露による有意な増加が認められた。なお、6週間曝露ではNR2A,D1,D2 mRNAsの発現に影響はみられていない。これまでに、海馬におけるNMDA受容体サブユニットNR2AはNR1とともにD1受容体との直接の相互作用が見られるという報告があり、ホルムアルデヒドがま

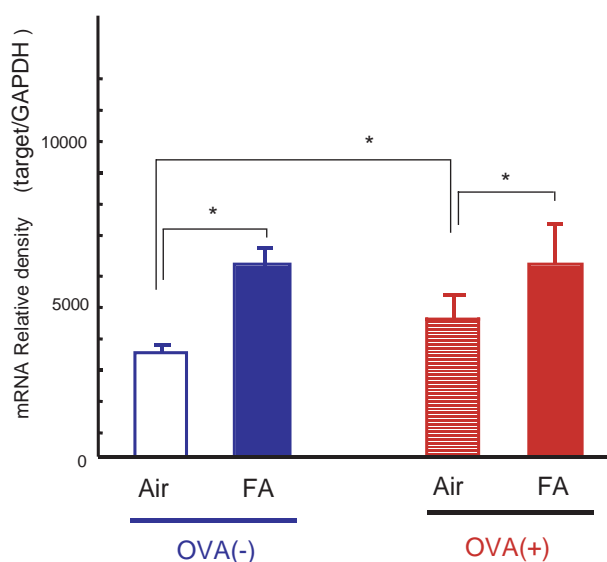


図6 ホルムアルデヒドを曝露したマウスにおける海馬におけるNMDA型グルタミン酸受容体遺伝子NR2Aの発現増強 Air: 清浄空気, FA: ホルムアルデヒド, OVA: 卵白アルブミン * $P < 0.05$

さにこの相互作用をかく乱する可能性が示唆された。NR2AのNMDA受容体サブユニットの欠如している変異体マウスでは、海馬LTPと空間学習の減少が報告されている。したがって、海馬におけるNR2A, D1とD2 mRNAの発現に変化がみられたことは、低濃度のホルムアルデヒド曝露による記憶形成機構に変化が生じた可能性を示唆している。

2.1.2 低濃度ホルムアルデヒド曝露による嗅球，扁桃体，視床下部での情報伝達のかく乱

記憶形成の場であり、情報蓄積の領域である海馬においてホルムアルデヒド曝露によりその機能かく乱が明らかになったので、情報の受け取りから海馬にいたる神経情報伝達回路での変動を探った。以降は、主に12週間曝露における結果について紹介する。

低濃度長期ホルムアルデヒド曝露は嗅覚系において、組織学的には顕著な影響はみられなかった。嗅上皮は、直接外界からの化学物質と接触し、その情報の受け取りに関与する領域である。嗅上皮の破壊や鼻腔の閉鎖は、嗅覚系におけるドーパミン系を活発にすることが知られている。

そこで、低濃度ホルムアルデヒド曝露によるドーパミン合成系の変化について嗅球の糸球体で検討した。ドーパミン合成にかかわるチロシン水酸化酵素（TH）陽性神経細胞の数を免疫細胞化学的に検索すると、いずれのホルムアルデヒド曝露でも対照群の神経細胞数に比べ有意な増加がみられた（図7）。TH陽性神経細胞の増加は情報伝達系の抑制機構への影響を示唆している。というのは、嗅覚系では、ドーパミン系は抑制機構に関与して

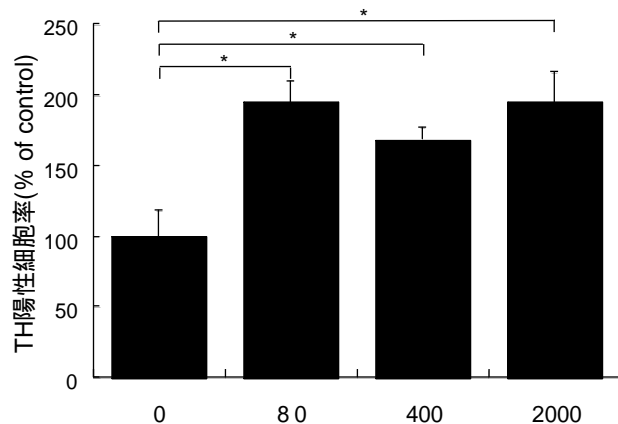


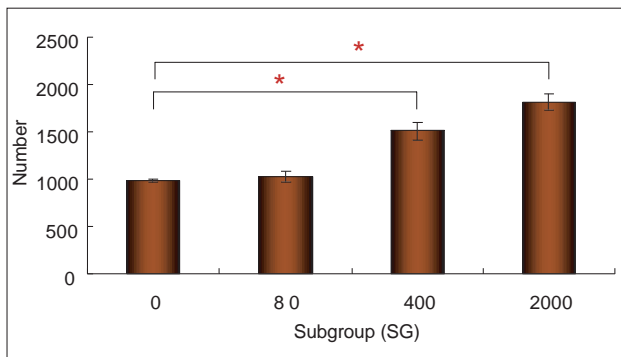
図7 ホルムアルデヒドを曝露したマウスの嗅球におけるTH陽性ニューロンの増加 *P<0.05

いる報告がみられるからである。そこで、匂い情報伝達に重要な扁桃体とストレス応答に敏感な視床下部における神経細胞の動きについて免疫細胞化学的に検討した。神経伝達の抑制に働く大脳辺縁系においてはカルシウム結合タンパク質を含有しているGABAニューロンに注目した。その結果、扁桃体においてはカルシウム結合タンパクであるParvalbumin陽性ニューロンやCalbindin陽性ニューロンの数の増加が低濃度のホルムアルデヒド曝露でみられ、情報伝達の抑制系が活性化されていることが明らかとなった。さらに、ストレスに対応する視床下部における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）産生について、長期ホルムアルデヒド曝露を行い検討したところ、視床下部でのCRH陽性神経細胞数が有意に増加する結果を得た（図8a）。この結果は、ホルムアルデヒド曝露がストレス応答系を亢進することを示しており、OVAを生物因子の刺激として用いたアレルギーモデルマウスにホルムアルデヒド曝露を行い、CRH分泌系の相加効果について検索した。CRH陽性神経細胞数は濃度依存的な増加ではなく、80ppbホルムアルデヒド曝露群をピークとしたベル型の反応を示した（図8b）。このことは、低濃度ホルムアルデヒド曝露がストレス応答の増加につながり、しかも生物学的刺激によりもたらされた情報との併用によりかく乱作用が修飾されることを示唆している。なお、血漿中のコルチコステロン濃度は、ホルムアルデヒド濃度に依存して増加傾向を示し、2000ppbで有意な増加がみられた。

次に、400ppbホルムアルデヒド曝露したマウスの扁桃体和視床下部での神経伝達物質受容体への影響についてRT-PCR法で検討した。NMDA受容体、ドーパミン受容体、セロトニン受容体について測定した結果、扁桃体においてはNMDA受容体のNR2A, NR2B mRNAsとドーパミン受容体D1とD2 mRNAの発現増強、視床下部においてはセロトニン受容体5-HT1A mRNAの発現の増加が明らかとなった。扁桃体におけるドーパミン受容体D1とD2 mRNAの発現増強は、嗅球、扁桃体での免疫細胞化学的手法での結果、つまり情報抑制系の活動を示唆した結果と合致するものである。

さらに、海馬から扁桃体、視床下部への情報伝達回路を探るために、海馬を高周波電気処理して破壊したマウスに低濃度ホルムアルデヒドを12週間曝露して海馬を介した影響を検索した。その結果、扁桃体においては、海馬破壊によりホルムアルデヒドによるNR2B, D1と

a.



b.

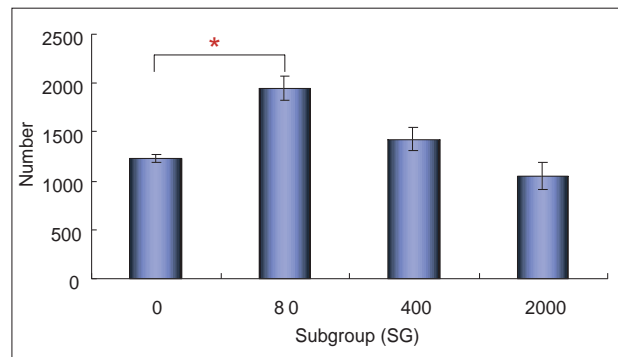


図8 ホルムアルデヒド曝露による無感作マウス(a)とアレルギーモデルマウス(b)の視床下部CRH陽性神経細胞の増加 *P<0.05

D2 mRNAの発現がより亢進する結果が得られた。視床下部では、5-HT_{1A} mRNAの発現はより増強し、一方ドーパミン受容体D₂ mRNAの発現が抑制から増加へと変化した。

これらの結果は、嗅覚からの化学物質曝露による刺激反応が、神経伝達物質を介した情報伝達系を修飾して扁桃体、海馬、視床下部などの大脳辺縁系に影響を及ぼし、また、海馬からの扁桃体と視床下部への情報伝達が修飾され、記憶情報回路にかく乱作用を生じている可能性を示唆している。

2.1.3 長期トルエン曝露による海馬における情報伝達系のかく乱

ホルムアルデヒド曝露による海馬での情報伝達系の変化が、化学物質に特異的か、それとも他の化学物質に対しても同様の作用を示すかどうかを検証するために、低濃度50ppmトルエンを雌のC3H/HeNマウスに12週間曝露して海馬におけるNMDA受容体発現系に及ぼす影響について検討した。50ppmのトルエン濃度は、日本産業衛生学会での職業曝露の規制勧告値である。

一般に広く使われているトルエンは、神経毒を有する化学物質としての特性を持ち、中枢神経系はトルエン毒性の急性および慢性曝露の主要な標的器官と考えられている。トルエンは、ヒトでは、睡眠、頻繁な頭痛、目苛立ちと記憶障害の増加を引き起こす。

トルエンは吸入の後ですぐに脳血管門を通過することが証明されており、ニューロン活動と行動に関する影響評価の報告では、NMDA受容体を介してシナプス伝達を抑制する可能性を示唆した。

トルエンの動物曝露については、有機溶媒ガスジェネレータを使用することによってトルエン蒸気を発生させて、ステンレスとガラスのチャンパーに導入するのに必要なガス濃度を達成するために、フィルターろ過した空気でガスを薄めた。全体の実験の間、定期的にチャンパー内のサンプルを集め、ガス・クロマトグラフによってトルエン濃度をモニターした。マウスへの曝露は、1日6時間(10時~16時)、1週間に5日間連続で、6週間あるいは12週間行った。実験群は、フィルターろ過した清浄空気(0ppm)と50ppmトルエンで全身曝露した群を設定した。

NMDA型のグルタミン酸受容体NR₁、NR_{2A}、NR_{2B} mRNAの発現において、敏感なNR₂サブユニットがNMDA受容体におけるアゴニスト活性を決定しているので、マウスの海馬組織で、NR_{2A}とNR_{2B} mRNAsの発現を検討した。その結果、50ppmのトルエンに12週間曝露したマウス海馬では、清浄空気曝露と比較してNMDA受容体サブユニットNR_{2B} mRNAの発現が増加した(図9)。6週間トルエンに曝露されたマウスでのNR_{2B} mRNA発現よりも12週間トルエンに曝露されたマウスの発現が著しく増加した。しかし、6週間でのトルエンと清浄空気に曝露されたマウス間では、NR_{2B} mRNA発現の顕著な変化は観察されなかった。一方、NR_{2A} mRNA発現では、6週間ないし12週間トルエン曝露された群で対照群と比べて差はみられなかった。

ニューロンのシナプス活動はいくつかの異なる細胞内シグナル伝達経路を通してサイクリックAMP反応性結合タンパク質(CREB)のリン酸化と遺伝子の起動につながる。そして、主としてCREBのリン酸化に寄与する

のが、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIV (CaMKIV) である。CREBは目標遺伝子のcis-CREと結合して、神経伝達物質の放出を増強し、シナプス同士の接続を拡大・増強する遺伝子の転写を引き起こす。選択的スプライシングを介してfosBの遺伝子から得られる fosBは、転写制御因子ロイシンジッパー (bZIP) ファミリーに属し、神経伝達物質によるシグナル伝達を活性化したり、不活性化したりして働いている。

次に、我々は転写因子CREB-1の発現を調べた。海馬におけるCREB-1発現は、低レベルのトルエンの慢性曝露では、これまでのところ研究報告がない。我々は、慢性的に50ppmに曝露されたマウスで海馬のCREB-1 mRNAの発現が増加しているかどうかを検討した。その結果、CREB-1 mRNAの発現は12週間清浄空気にさらされたマウスと比べて、12週間慢性的に低レベルのトルエンに曝露されたマウスの海馬でかなり増加したことが明らかとなった。清浄空気曝露群と比べて、6週間トルエン曝露したマウスの海馬CREB-1 mRNA発現においては、高い傾向を示した。

そこで、我々はCREB-1とは反対に転写を抑制する機能を有するCREB-2の発現を調べた。12週間 (0.3293 ± 0.0443) トルエンに曝露されたマウスのCREB-2 mRNAの発現が12週間清浄空気にさらされたマウスのものと比べて2倍以上 (0.1635 ± 0.0263) 増加していることを見つけた。しかしながら、6週間曝露したマウスではCREB-2発現の増加は観察されなかった。

FosBは長期のニューロンの、また、行動の可塑性の分子仲介として機能している。FosB/DFosB mRNAの発現は、12週間慢性的に50ppmに曝露されたマウス海馬で有意な増加がみられた。

CaMKIVは、生体内で最も重要なCa²⁺依存のCREBキナーゼであるが、CaMKIVの海馬での発現におけるトルエ

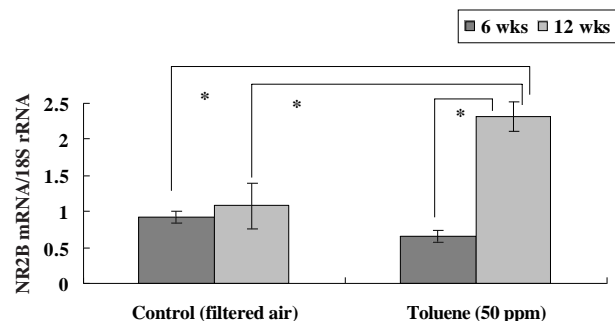


図9 トルエンの長期曝露によるマウス海馬におけるNR2B遺伝子の発現増強 *P<0.05

ンの影響はほとんど研究されていない。したがって、我々はトルエンがCaMKIVのmRNA発現に影響する否かを調べた。清浄空気コントロール群と比べて、CaMKIV mRNAの発現は50 ppmのトルエンに曝露されたマウスの海馬で顕著に増加した (図10)。これらの結果は、50 ppmのトルエンの長期曝露は、マウス海馬でNMDA受容体サブユニットNR2Bのアップレギュレーションを引き起こすことを示している (図11)。NR2B受容体サブユニットを過剰発現するトランスジェニックマウスでは学習と記憶機能が向上することが知られ、NMDA受容体機能でNR2Bサブユニットは不可欠な役割を果たしている。一方、トルエンによる組み換え型NMDA受容体の機能の抑制は、NR1/NR2Aレセプターよりトルエンに敏感なNR1/NR2Bレセプター依存で起こるとい報告がある。50ppmのトルエンの慢性曝露でNR2B mRNA発現だけがなぜマウスの海馬で増加したかについて原因は不明である。しかしながら、NMDA NR2B mRNA発現の上昇を示す我々のデータは、トルエ

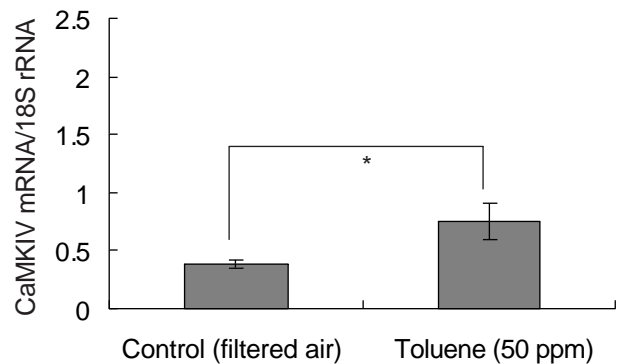


図10 トルエンの長期曝露によるマウス海馬でのCaMKIV遺伝子の発現増強 *P<0.05

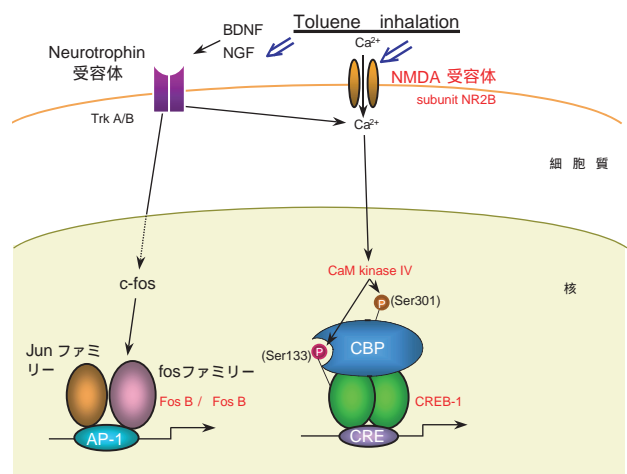


図11 トルエン曝露による細胞内メカニズム

ン曝露がNR1/NR2B NMDA受容体によって媒介される流れをより敏感にブロックしてシナプス活性の減少したことの修復作用に起因する可能性が考えられる。このように、我々の実験的システムでのNR2B mRNA発現のアップレギュレーションはNMDA受容体複合体の活動に依存して行われており、トルエンによるNR1/NR2B受容体を介した興奮性シグナルの減少が起きたときに早急にNR2B受容体を補うべく働く機構を示している。

CREB-1の変異や減少で長期記憶は、低下する。マウス海馬でCREB-1 mRNA発現のトルエンによる増加は、NMDA NR2Bを含む標的遺伝子のCRE-依存的な転写のアップレギュレーションとのかかわりを示唆している。FosB/ FosBは、慢性の薬剤投与に対する脳の適応で重要な役割を演ずると考えられており、我々のデータは、FosB/ FosB mRNAの発現レベルが繰り返し50ppmのトルエンに曝露されたマウスの海馬でup-regulatedされたことを示す。

職業曝露における許容濃度の勧告値の50ppmのトルエンを実験に使用したが、この低レベルの曝露さえ非常に小さな体のマウスでは薬物乱用状態に類似する。CaMKIVの変異体を表しているマウスは、CREBリン酸化と海馬の長期増強機能に障害を示した。我々のデータは低用量トルエンに慢性的にさらされているマウスの海馬でCaMKIV mRNAの発現増加を示したが、このことは特定のキナーゼ活性の要求を示している。

以上、低濃度のホルムアルデヒド曝露とトルエン曝露による海馬における記憶情報伝達回路において、シナプスの可塑性に関与するNMDA受容体遺伝子の発現増強がともに認められた。しかしながら、そのサブユニットの発現増強は、化学物質の違いによって異なることが明らかとなった。

2.2 有害化学物質曝露による免疫系における記憶機能かく乱作用の解析

免疫系は、特異性と記憶という重要な機能を有して、生体内に侵入した異物を認識、識別し貪食によって排出するか、軽い炎症を誘導して排除する。それで除去できないものは、抗体産生系を活性化して、分化・増殖した活性化リンパ球や特異抗体の働きにより排除する。異物が侵入したという免疫記憶があるおかげで、例えば、感染については一度かかると二度とはかからない、あるいは二度目の感染に対しては症状が軽くなるのである。こ

の記憶機構が化学物質に対して誘導されるか否か、あるいは、化学物質が記憶機構のかく乱を生じるか否かに着目した。以下に、免疫記憶情報の蓄積について、リンパ球の分化・増殖反応、抗体産生を中心に研究した結果を述べる。

2.2.1 長期VOC曝露の免疫記憶への影響

(1) VOCと感作性

免疫系において低分子の抗原性を有する物質は、ハプテンと呼ばれている。それは、単独では異物として認識され抗体産生を誘導する経路の活性化につながらないが、分子量の大きな体内のタンパク質に結合して異物としてマクロファージに認識され、特異的な抗体産生を誘導し、その抗体に結合が可能なものである。揮発性有機化合物がハプテンとしての作用を有している場合には、免疫系で認識され、その情報が伝達されることでリンパ球の活性化や特異抗体の産生が誘導されると考えられる。

ホルムアルデヒドの場合、透析患者において透析チューブの滅菌に使用されたホルムアルデヒドに対する特異抗体の検出が報告されているが、検出されないとの報告もありハプテンとしての作用は不明である。

そこで、ハプテンとしての感作性について、室内での濃度の高いホルムアルデヒド、トルエン、スチレンについてそれぞれ10%溶液でLocal lymph node assay (LLNA) を用いて比較検討した。なお、陽性対照としてヒトでの感作性が報告されているイソオイゲノール (IE) を用いた。LLNAは、マウスでの局所リンパ節でのリンパ球増殖反応を検出する方法で、皮膚感作性の化学物質の反応を評価する方法として開発された。一方、呼吸器性の化学アレルギーについては血清中の総IgEの増加から評価されている。Trimellitic anhydride (TMA) が後者の代表である。

図12に示したようなスケジュールで感作実験を行い、耳介の厚さ、リンパ節の重さ、増殖細胞を標識する

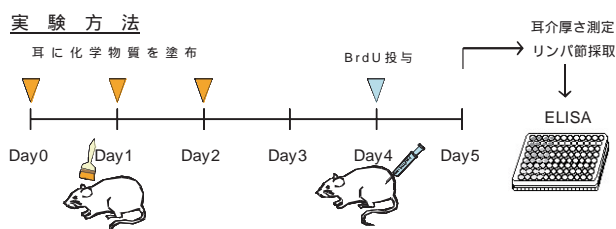


図12 マウスの皮膚を用いた感作性評価の実験系

BrdU投与によるリンパ球増殖反応の指標について測定した。

その結果、耳介の厚さは対象としての溶媒（アセトン+オリーブオイル）のみの群と比べてホルムアルデヒドの投与により有意に増加した（図13a）。リンパ節の重さは、IEの群のみで有意な増加がみられた（図13b）。BrdUの投与によるリンパ球増殖反応では、IEが最も高い値を示したが、他の投与群では溶媒の群と比べ差はみられなかった（図13c）。これらの結果から、皮膚の感

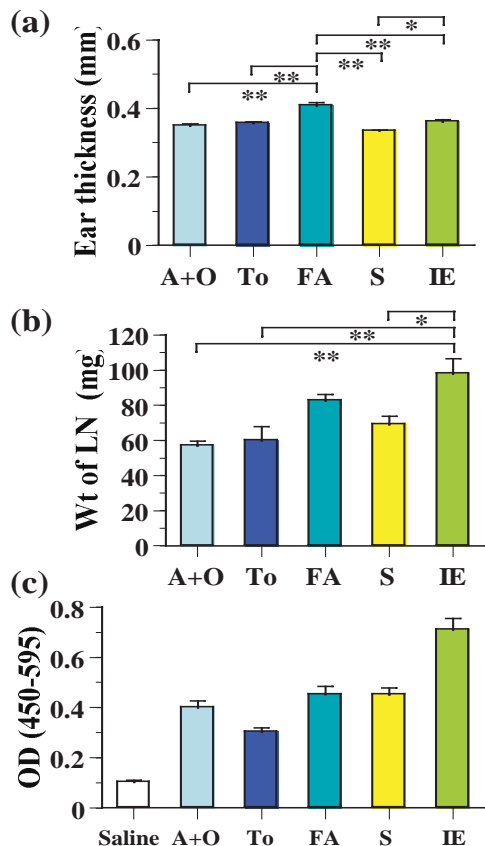


図13 化学物質を塗布したマウスでの耳介の厚さ、リンパ節重量、増殖反応による感受性評価

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ A+O: アセトン+オリーブオイル, To: トルエン, FA:ホルムアルデヒド, S: スチレン, IE:イソオイゲノール

作性においては、ホルムアルデヒド、トルエン、スチレンは、強い反応は見られないことが明らかとなった。

なお、血漿中のIgE抗体価においても差はみられなかった。

(2) 低濃度ホルムアルデヒド曝露と免疫記憶

低濃度ホルムアルデヒド (0, 80, 400, 2000 ppb) の長期曝露による免疫系における記憶機能の変化についてマウスで検討した。免疫情報を受けたリンパ球は、細胞増殖と分化を行い記憶リンパ球を産生すると同時に情報の蓄積である抗体産生へと情報を伝達していく。ホルムアルデヒドを長期曝露したマウスの脾臓細胞を用いたリンパ球の増殖反応 (Celltiter 96[®] Aqueous One solution cell proliferation assay, Promega) を調べた結果では、メディウム添加の状態で培養すると80ppb曝露でのみ有意な増加がみられた (図14a)。ホルムアルデヒドを加えての *ex vivo* での刺激に対して特異的な増殖反応は観察されなかった (図14b)。LPSの刺激によるリンパ球での増殖反応でも、曝露による増殖反応に有意な差はみられず (図14c)、ホルムアルデヒド曝露によるリンパ球増殖活性には顕著な違いは観察されなかった。

異なる機能を持つリンパ球は表面抗原の発現が異なっており、CD3分子はT細胞だけに見られ、そのT細胞の中でもCD4分子をもっているものは抗体を作るための補助的な働きをしているためにヘルパーT細胞といわれている。また、CD8分子をもっているT細胞はウイルス感染細胞を破壊したり免疫応答を抑制する働きを持っている。抗原情報を受け取って抗体産生細胞に分化するB細胞はCD19分子を表面に発現しています。表面抗原の発現量の違いを指標にしてリンパ球の亜集団の分化への影響についてホルムアルデヒド曝露後フローサイトメトリ^{*2}によって検討した。その結果、今回の濃度でのホル

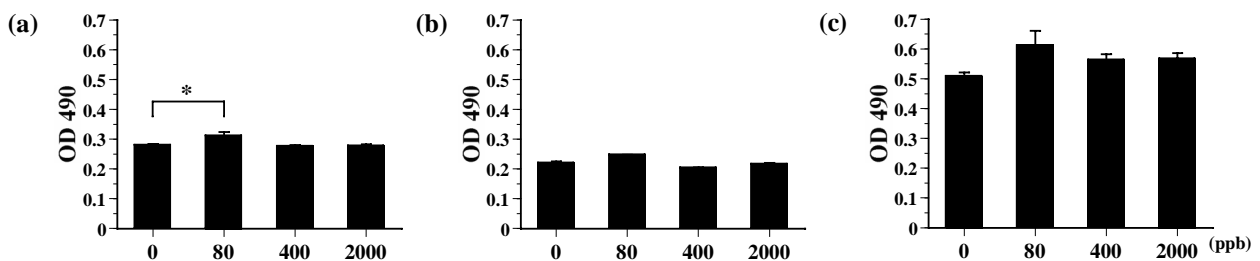


図14 低濃度ホルムアルデヒド曝露の脾臓リンパ球増殖反応への影響 * $P < 0.05$

*² 蛍光抗体で染色した細胞の流れにレーザー光をあて、蛍光を測定することにより細胞表面の抗原量を測定し、細胞の解析や分離する手法。

ホルムアルデヒド曝露では、脾臓リンパ球の分化に変化はみられなかった。

次に、抗原が侵入すると最終の記憶の産物として特異抗体が産生され、その抗体の産生にかかわる細胞は記憶細胞として長期にわたり保持される。身近な例としては、スギ花粉を吸入して、その花粉に対するIgE抗体が産生される状態になると、スギ花粉を認識する記憶細胞も免疫臓器で待機している状態になる。そこで、毎年スギ花粉に曝される時期になると記憶細胞が活性化して特異IgE抗体を産生し、花粉症状を引き起こすのである。

低濃度ホルムアルデヒド曝露後に、マウス血漿中の総IgEおよびIgG抗体価をELISA法で測定すると、ホルムアルデヒド曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。卵白アルブミン(OVA)を抗原として用いたアレルギーモデルマウスにホルムアルデヒド曝露を行い、抗原情報伝達系のかく乱について検索した。CD4分子を有しているT細胞は、その産生するサイトカインの働きや種類からTh1とTh2に分けられており、Th1細胞は感染抵抗や炎症にかかわる働きを有しており、Th2細胞は抗体産生を促進し、アレルギーの反応を増悪させると考えられている。その結果、脾臓におけるアレルギー反応の強弱を制御するTリンパ球のTh1/Th2バランスにかかわるサイトカイン産生や抗原特異的IgE、IgG1産生においてホルムアルデヒド曝露群と対照群との間で顕著な差はみられなかった。ただし、肺胞洗浄液中のIL-1の低下、血漿中ケモカインのCCL2産生の低下、脾臓細胞からのCCL2産生の亢進がホルムアルデヒド曝露により認められた。これらの結果から、低濃度ホルムアルデヒド曝露は、免疫記憶の情報伝達経路、少なくともリンパ球の活性化、抗体産生の増強などを積極的に促進し、Th1/Th2バランスをかく乱する作用は認めなかった。

(3) 低濃度トルエン曝露と免疫記憶

低濃度トルエンの長期曝露による免疫メモリー機能への影響を探るために、C3H/HeNマウスに50ppm濃度のトルエンで6週間、12週間の全身曝露を行った。6週間曝露では、脾臓細胞を用いたリンパ球増殖反応、およびフローサイトメトリーを用いたリンパ球亜集団の解析で有意な差はみられなかった。また、血漿中の抗体価では、曝露群と対照群との比較でIgE、IgGともに差はみられなかった。

12週間曝露では、呼吸器における変化として、肺を洗

浄して得られた液中の炎症性細胞の数に変化がみられた。マクロファージ数に有意な増加がみられたが、リンパ球の数の増加はみられなかった(図15)。脾臓中のリンパ球亜集団の変化についてフローサイトメトリーで解析した。脾臓細胞中の活性化集団であるCD4⁺CD44⁺CD25⁺とCD8⁺CD44⁺CD25⁺Tリンパ球の割合では有意な低下が認められた(図16)。しかしながら、メモリー細胞としてのCD4⁺CD44⁺CD25⁻とCD8⁺CD44⁺CD25⁻Tリンパ球には変化がみられなかった。

血漿中の抗体価では、トルエン曝露群で総IgEの有意な上昇が観察された(図17)。他の総IgG1とIgG2aレベルでも増加傾向が認められた。そこで、全身影響に重要な脾臓でのサイトカイン・ケモカイン産生を網羅的に調べるためにcytokine antibody arrayを用いて検索した。その結果、曝露群で対照群に比べIL-13、IL-17、I-TACの産生が顕著に増加していた。IL-13は、Th2タイプのTリンパ球から産生され、IL-4非依存的にIgE産生を亢進させる働きを有している。IL-17は、CD4⁺Tリンパ球から産

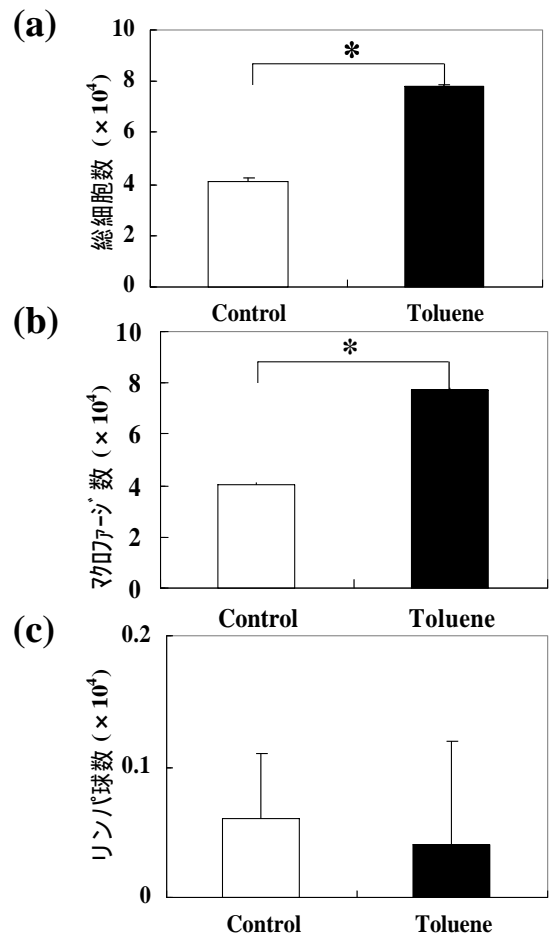


図15 長期トルエン曝露したマウスの肺胞洗浄液中の炎症性細胞数の増加 *P<0.05

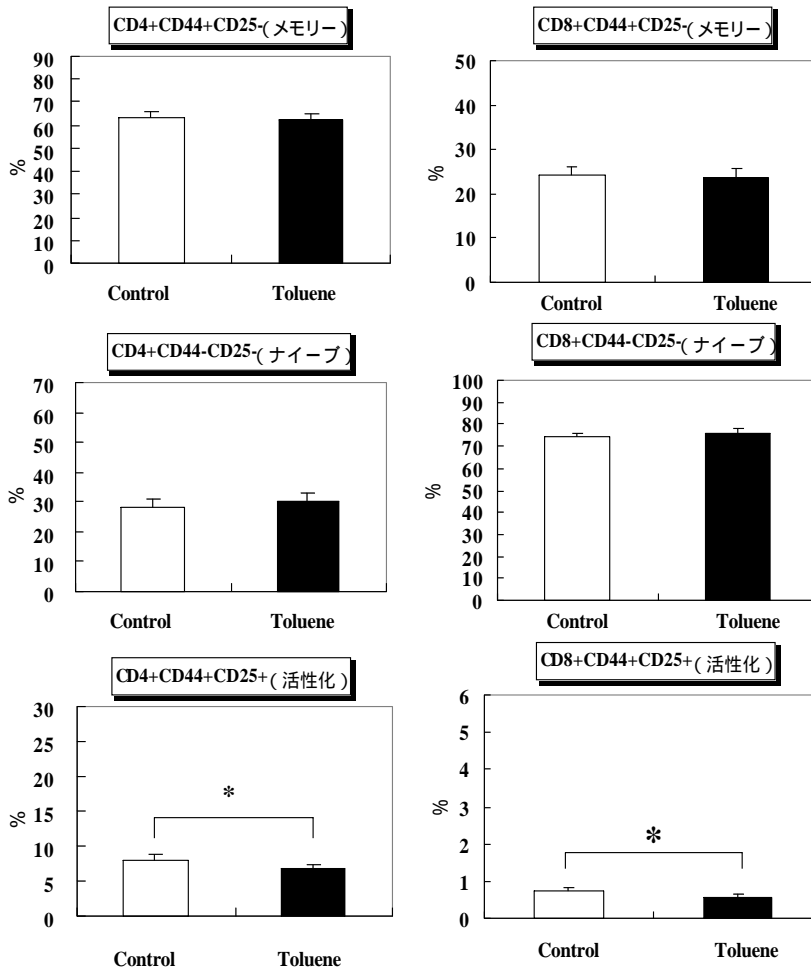


図16 低濃度トルエン曝露によるマウス脾臓Tリンパ球亜集団の変動 *P<0.05

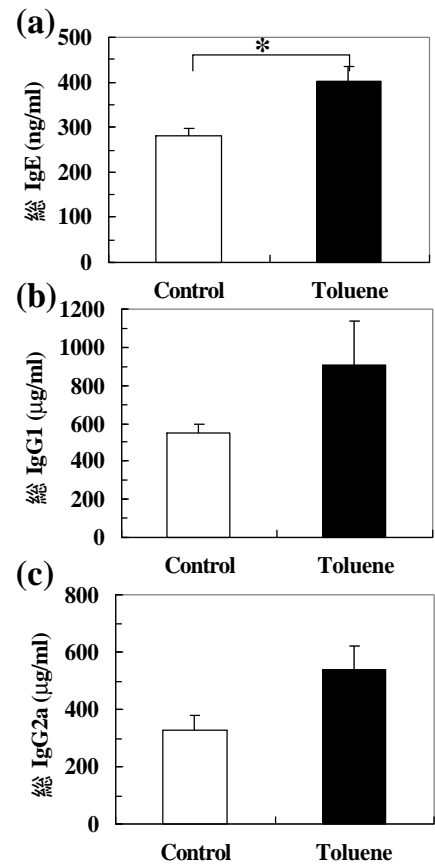


図17 長期トルエン曝露したマウスの血清中抗体価の変動 *P<0.05

生まれ、上皮細胞、血管内皮細胞や線維芽細胞からIL-6やIL-8の分泌を促すことが報告されている。さらに、I-TACは、インターフェロンの制御に関与しているだけでなく、Tリンパ球の走化性にもかかわっている。これらの結果、脾臓におけるTリンパ球の機能やIgE産生にかかわる情報因子のかく乱がトルエン曝露により誘導されている可能性が考えられる。以上、低濃度長期のホルムアルデヒド、あるいはトルエンの曝露は、免疫記憶系の情報伝達や抗体産生機能に軽度な影響は認められたものの、顕著なかく乱作用を示さなかった。

2.2.2 長期VOC曝露と抗原の感作による神経免疫軸のかく乱

神経免疫間での相互作用は、神経細胞からのサイトカインやケモカインの産生、あるいは、免疫細胞からの神経栄養因子、神経伝達物質などの産生が報告されてきたことから生体の恒常性維持のために重要な働きを担っていると考えられている。また、化学物質過敏症やシッ

クハウス症候群では、神経系の疾患やアレルギー性の疾患に類似している症状も報告され、揮発性化学物質による神経免疫軸でのかく乱機構を解明することが重要な課題になってきた。そこでさきに報告した低濃度ホルムアルデヒド曝露による海馬でのNR2A mRNA発現の増強が抗原感作という免疫記憶系の活性化との併用でどのように変化するかを調べた。また、NMDA受容体の拮抗薬MK-801を投与することによりホルムアルデヒド曝露の影響がどのように修飾されるかを解析した。

その結果、抗原感作を併用して対照群と曝露群とを比較するとホルムアルデヒド曝露群でNR2A mRNA発現の増強が認められた(図18a)。拮抗薬MK-801投与は、ホルムアルデヒド曝露によるNMDA受容体のNR2A mRNA発現の増強を抑制する効果が見られた。NR2BmRNA発現では大きな変化はみられなかった(図18b)。さらに、ホルムアルデヒド曝露によるドーパミンD1とD2 mRNAsの発現の増強は、MK-801投与により見られなくなった。このことは、NMDA受容体の作用が、ドーパミン受容体

の発現にも関連を持つことを意味している。さらに、転写因子であるCREB1 mRNAの発現はホルムアルデヒド曝露と抗原感作の併用で有意に増強したが、拮抗薬MK-801投与はそれを抑制した。海馬においてはNR2AとD1は直接の相互作用が報告されており、我々の結果はホルムアルデヒド曝露によるNMDA受容体への影響が抗原感作により変化しD1の発現状態やシナプス内での転写因子の働きに及ぶ可能性を示唆している。

NGFは、脳内ではアストロサイトなどから分泌され、神経細胞の生存や分化に重要なタンパク質である。また、アレルギー性炎症反応においても肥満細胞の活性化や炎症細胞の遊走などにかかわっている。そこで、抗原感作したマウスに低濃度のホルムアルデヒドを曝露して海馬におけるNGFの産生をELISA法で測定した。ホルムアルデヒドの曝露のみでは変化がみられなかったが、抗原感

作が加わると400ppbの濃度をピークとしたNGF産生の増加が認められた。OVA抗原感作したマウス海馬の免疫染色でも同様な結果が得られた(図19)。しかしながら血中や肺胞洗浄液中のNGF産生は低下していた。脳内でNGF同様に神経栄養因子として機能しているBDNFの産生においては増強はみられなかった。NGF mRNAの遺伝子発現では、80と400 ppbホルムアルデヒド曝露で有意な増加が認められた。NGFの受容体であるTrk-AとBDNFの受容体であるTrk-BのmRNA発現を400ppbホルムアルデヒド曝露した海馬で調べると、Trk-A mRNAの発現は顕著に増強したもののTrk-B mRNAの発現には有意な差はみられなかった(図20)。

次に、NGFは神経系の発達や神経細胞の生存維持に関与しており、アポトーシス^{*3}細胞死の制御に関連する分子に影響を及ぼしている可能性が考えられた。アポトー

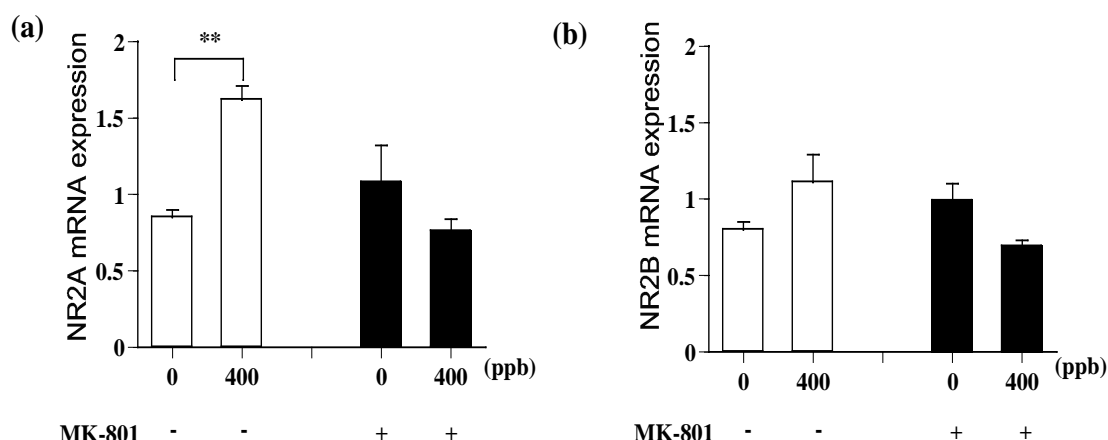
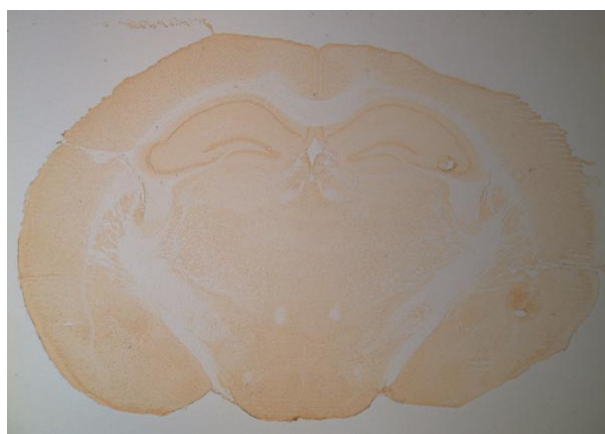


図18 低濃度ホルムアルデヒド曝露と抗原感作したマウス海馬でのNR2A とNR2B遺伝子の発現変動とMK-801の効果 **P<0.01



0 ppb-OVA(+)



400 ppb-OVA(+)

図19 400ppbホルムアルデヒド曝露したマウス海馬における神経成長因子の免疫染色 OVA:卵白アルブミン

*³細胞死の現象の一つ。遺伝子の働きによって、細胞質と核が凝縮・断片化して細胞が死滅する。

シスに關与するBcl-2ファミリー分子は、ミトコンドリアからのシトクロムC放出を制御することにより、アポトーシスの実行分子であるカスパーゼ3の活性を調節する。Bcl-2はシトクロムC放出を抑えてアポトーシスを抑制する。反対に、BaxはシトクロムC放出を促してアポトーシスを促進する。培養神経細胞へのNGF添加はBcl-2発現を増加させてアポトーシス細胞死を抑える一方、NGFの枯渇はBaxの働きを増強してアポトーシス細胞死を誘導することが知られている(図21)。

そこで、海馬におけるアポトーシス細胞死と海馬機能に及ぼす400 ppbホルムアルデヒド曝露の影響をタンパクレベルで明らかにすることを目的として、OVA抗原感作マウスおよび非感作マウスの海馬におけるBcl-2、Bax、NR2AおよびNR2Bの発現に及ぼす低濃度ホルムアルデヒド曝露の影響をウェスタンブロット解析により検討した。加えて、ホルムアルデヒド曝露とOVA感作による海馬のアポトーシス細胞死への影響を検討するため、アポトーシス実行分子である活性化カスパーゼ3発

現細胞の定量免疫組織学解析を行った。

その結果、400 ppbホルムアルデヒド曝露とOVA感作群のBcl-2/Baxタンパク発現量比は、OVA感作対照群(0 ppbホルムアルデヒド曝露)およびホルムアルデヒド曝露非感作群の値よりも有意に高かった(図22)。一方、ホルムアルデヒド曝露とOVA非感作群のBcl-2/Baxタンパク発現量比の値は非感作対照群との間に有意な違いはみられなかった。海馬の活性化カスパーゼ3免疫陽性細胞は散在しており、その数は極めて少なかった。そして、活性化カスパーゼ3免疫陽性細胞数へのホルムアルデヒド曝露および卵白アルブミン感作の影響はみられなかった。NR2AとNR2B発現に関するウェスタンブロット解析の結果、海馬のNR2AおよびNR2B発現に及ぼすホルムアルデヒド曝露とOVA感作の影響は認められなかった。以上のように、卵白アルブミンによる免疫感作の有無にかかわらず、マウス海馬のアポトーシス細胞死およびNMDA受容体タンパク発現に及ぼす400 ppbホルムアルデヒド曝露の影響はみられなかった。このことは、

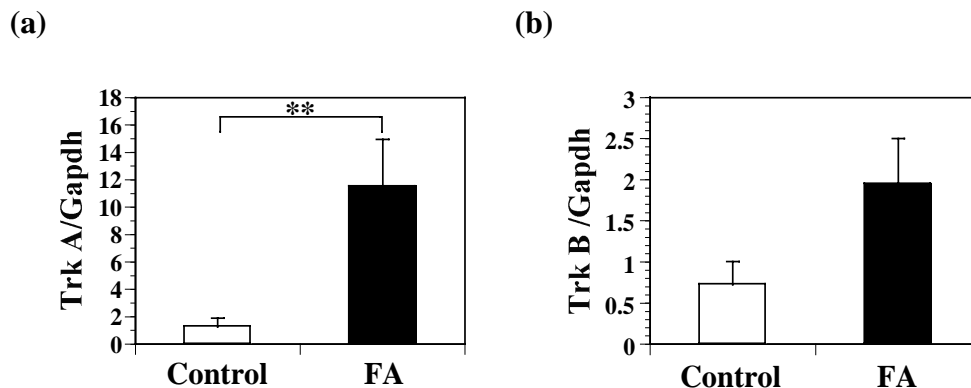


図20 低濃度ホルムアルデヒド曝露したマウス海馬におけるTrk AとTrk B 遺伝子の発現の増加 **P<0.01

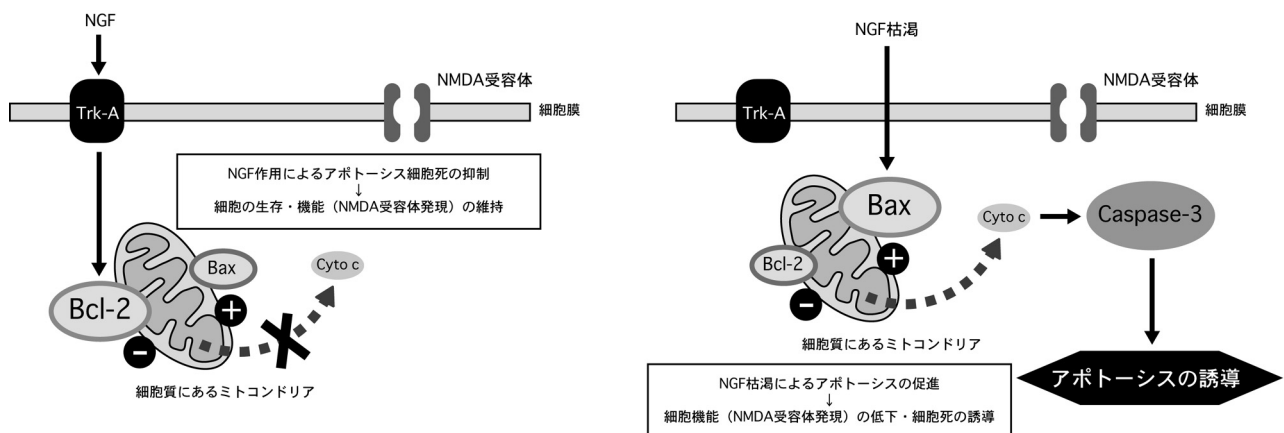


図21 NGFとアポトーシスの関連

400 ppb ホルムアルデヒド曝露では細胞毒性はみられず、海馬機能が維持されることを示唆している。前述のように、400 ppb曝露はNR2AmRNAレベルを増加させる(図6)。このmRNAの増加が、ホルムアルデヒド曝露下でのタンパク発現レベルの維持に重要であると考えられる。卵白アルブミン感作マウスの海馬ではホルムアルデヒド曝露によりBcl-2/Bax発現量比が増加した。Bcl-2はアポトーシスを抑制し、反対にBaxはアポトーシスを促進することから、低濃度ホルムアルデヒドによる細胞死に対する海馬の防御機構が存在すると考えられた。

次に、本態性多種化学物質過敏状態と診断された患者にアレルギー疾患の既往や合併が多いことがいくつか報告されているので、揮発性有機化合物に対する過敏状態の誘導に、免疫学的な過敏症としてのアレルギー反応と共通性の高い生理学的メカニズムがかかわっている可能

性は無視できない。もし揮発性有機化合物に対する過敏症の本態を神経系の記憶機能に由来する過敏反応ととらえるならば、その病態生理学的な背景を調べるうえで、免疫学的な記憶機能と神経学的な記憶機能との相互干渉性についてあらかじめ検証しておく必要がある。この場合の相互干渉性とは、免疫系、神経系の各記憶システムが、たがいのシステムの機能に影響をあたえあう可能性を意味している。

そこで、実験動物にアレルギーの状態を誘発して、それが海馬の記憶機能にどのような影響をあたえるかを電気生理学的手法で調べた。アレルギー誘発モデルとして、OVA感作モデルマウスを用いた。マウスは8~12週齢の雌C3H/HeNマウスを用いた。OVA感作群、対照群それぞれ10匹を用いた。海馬の記憶機能の評価は、電気生理学的手法で行った。その結果、OVA感作によって、海

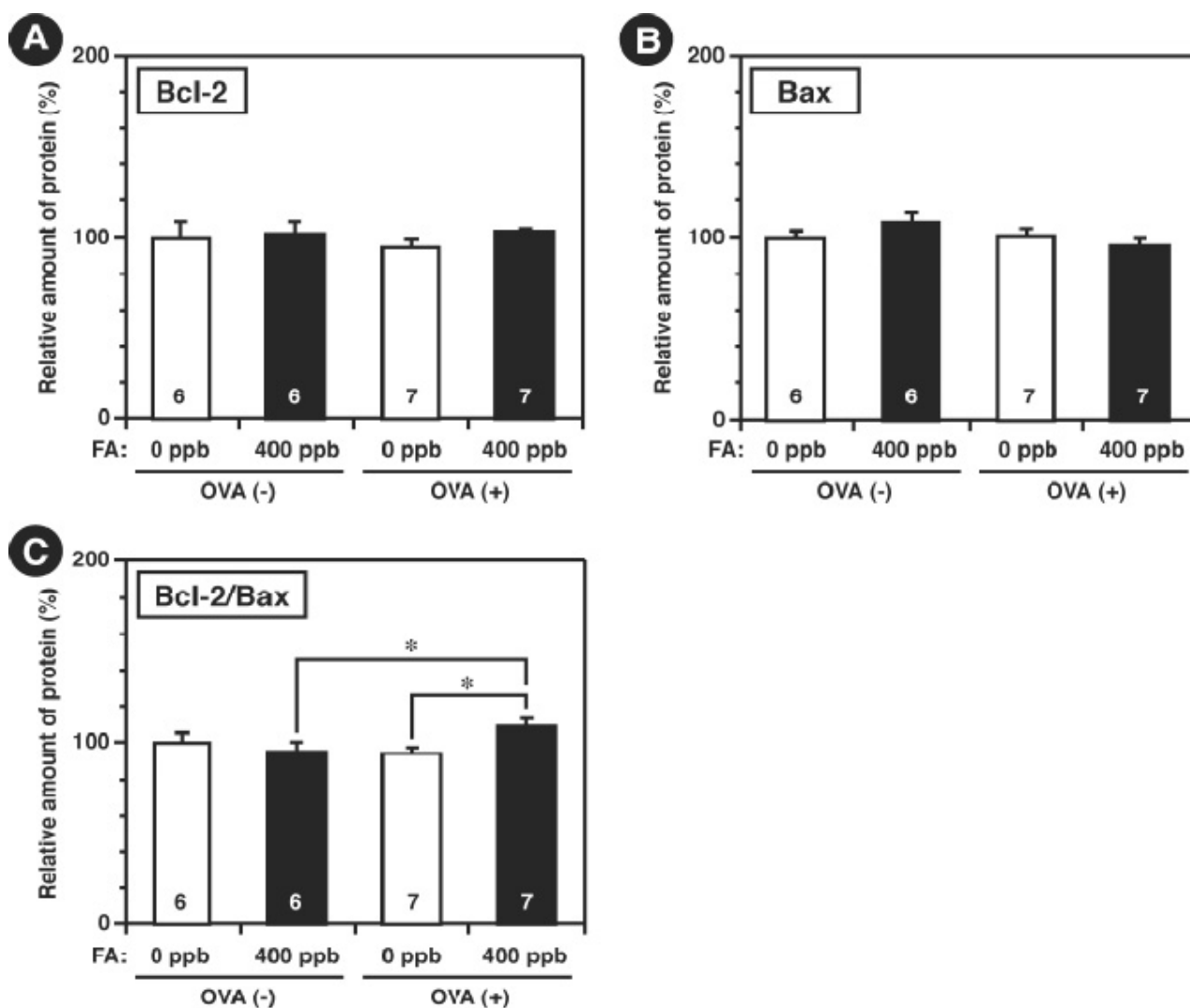


図22 ホルムアルデヒド曝露マウスの海馬のBcl-2タンパク発現(A)、Baxタンパク発現(B)及びBcl-2/Baxタンパク発現量比(C)
*P<0.05

馬CA1領域のシナプス伝達効率の基底状態，およびLTPの増大度に有意な変化は観察されなかった。400 ppbホルムアルデヒド曝露を併用しても有意な差はみられなかった。本研究より，免疫学的な記憶機能を活発に働かせて免疫学的な過敏状態へと生体を誘導した場合に，電気生理学的にはその生体の神経学的な記憶機能は免疫学的な変化の影響を受けにくく，免疫系の記憶機構は神経系の記憶機構に対しての干渉性を持たないと考えられた。

以上，低濃度ホルムアルデヒド曝露による神経，免疫系における記憶情報の蓄積について明らかになったことを図23にまとめた。なお，曝露期間中，くしゃみ様症状が観察され，アレルギーモデルではより回数が増加した。海馬においては，シナプスの可塑性に重要なグルタミン酸受容体NR2A遺伝子の発現は，低濃度ホルムアルデヒド曝露で有意に増加しており，さらにドーパミン受容体の発現増強も明らかとなった。また，低濃度ホルムアルデヒド単独では免疫系の大きな情報伝達のかく乱は認めなかったが，抗原刺激の付加による神経成長因子の産生において増加や抑制が異なる組織で認められ，神経免疫ネットワークのかく乱作用が示唆された。しかし

ながら，タンパクレベルでの測定やLTPに関するCA1領域での電気生理学的手法では変化はつかみきれていない。曝露終了からの時間差，あるいは抗原感作後の時間，測定感度などまだつめなければならない問題はたくさん残されているが，低濃度ホルムアルデヒド曝露が記憶形成の機構に何らかのかく乱を生じた可能性が考えられる。

2.2.3 トルエン鼻部曝露による免疫記憶機能への新たな影響解析

これまででは，低濃度化学物質の曝露による記憶機能への影響評価ということで比較的長期間の曝露により研究を行ってきた。しかしながら，より短期に，簡便な方法で評価する必要性も高く，短時間の繰り返し曝露で，より短期に神経記憶系と免疫記憶系での情報伝達を評価する方法の開発も重要と考えた。

そこで，鼻部曝露装置を用いより短期での記憶機能かく乱のための研究を行った。従来の感作性機能試験の曝露条件を参考に，C3H/HeNマウスへトルエンの0，9，90 ppm曝露を1日30分で3日連続行い，翌週から毎週1回の割合で曝露を4回，7回，11回行い記憶機能のかく

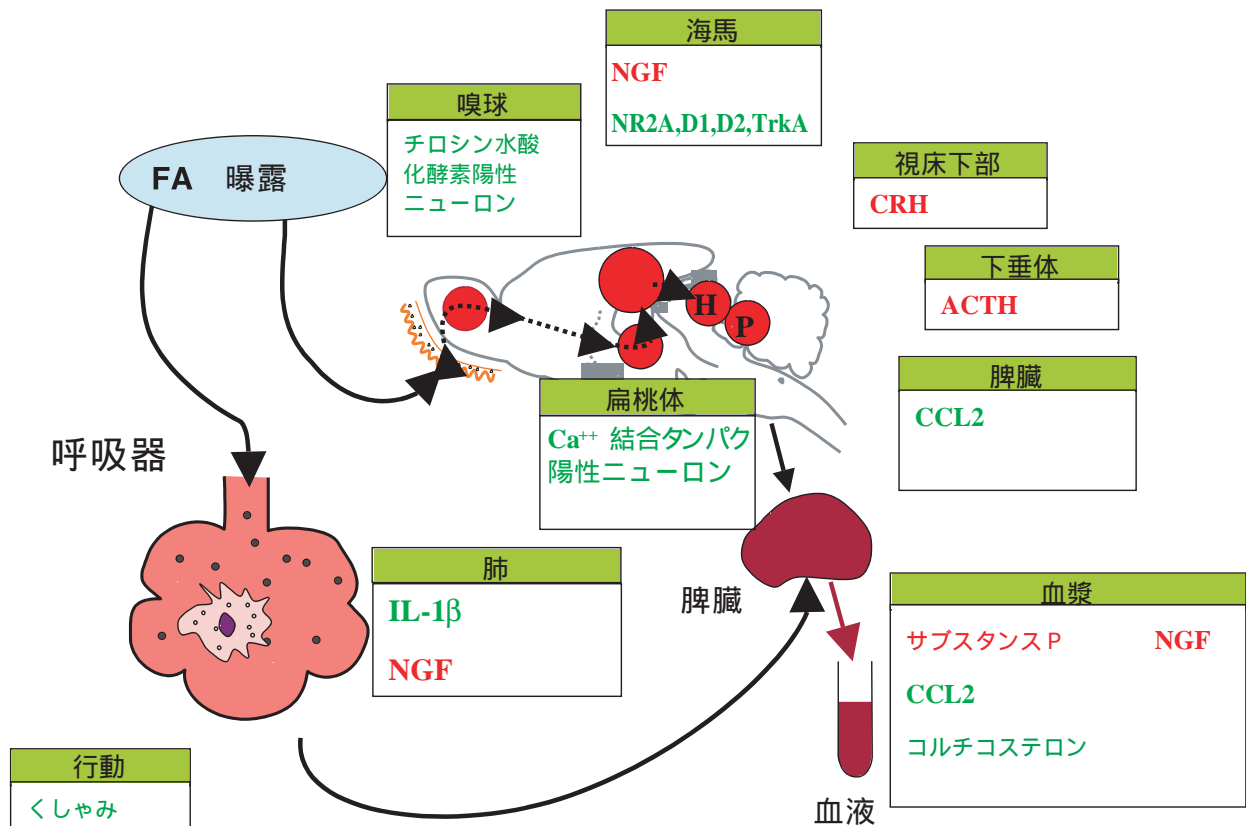


図23 ホルムアルデヒド曝露のまとめ

：増加， ：低下（緑矢印：ホルムアルデヒドのみによる変化，赤矢印：ホルムアルデヒド+抗原感作による変化）

乱について解析した。また、獲得免疫系での記憶機能への影響を検索した群では、曝露初日のOVA抗原とアラム（アジュバンド）の投与、その後2週間おきにOVAエアロゾル感作を行った。最終曝露の翌日に、ネプタール麻酔下で採血、肺胞洗浄、脾臓、嗅球、鼻組織の採取を行った。肺胞洗浄液中のサイトカイン量はELISAキットを用いて測定し、脾臓と嗅球でのサイトカインmRNAの発現はリアルタイムPCR法にて測定した。血漿中の抗原特異的抗体価と総抗体価はELISA法により測定した。

その結果、免疫系での情報の入り口である肺における炎症性細胞の数について、肺胞洗浄液を集めて測定した。総細胞数では変化はみられなかった（図24a）が、マクロファージの数では9 ppmトルエン曝露群で有意な増加が認められた（図24b）。マクロファージは異物情報を最初につかんで、その情報をリンパ球に伝達し、抗体産生系が始動する。記憶の最終産物としての血漿中の抗体価においては、4回のトルエン鼻部曝露では血漿中の総

IgE, IgG1, IgG2aにおいて曝露による差はみられなかった。7回の鼻部曝露では、総IgE抗体価は、トルエン曝露群では濃度依存的に低下傾向がみられたが、OVA抗原刺激を併用したトルエン曝露群では、濃度依存的に亢進する結果を得た。抗原特異的IgEとIgG1産生においては、9 ppmトルエン曝露で有意な増加がみられたが、90 ppmでは対照群と同じレベルであった（図25）。抗原特異的IgG2a、および総IgG2a抗体価では、変化がみられなかった。11回曝露では、総IgE, IgG1抗体価とも差はみられなかったが、抗原特異的抗体価は上昇の傾向で、抗原特異的IgG1抗体価は有意に増加したままであった。

神経栄養因子であるNGF量を血漿中で測定すると、トルエンのみの曝露刺激では群間に差はみられなかったが、OVA抗原刺激との併用では9 ppmのトルエン曝露群において有意な増加を認めた。脾臓における情報伝達にかかわるサイトカイン遺伝子の発現では、OVA刺激とトルエン曝露の併用でIL-4とIFN- γ mRNAの発現増強がみられた。また、神経細胞や免疫細胞の成熟や増殖に

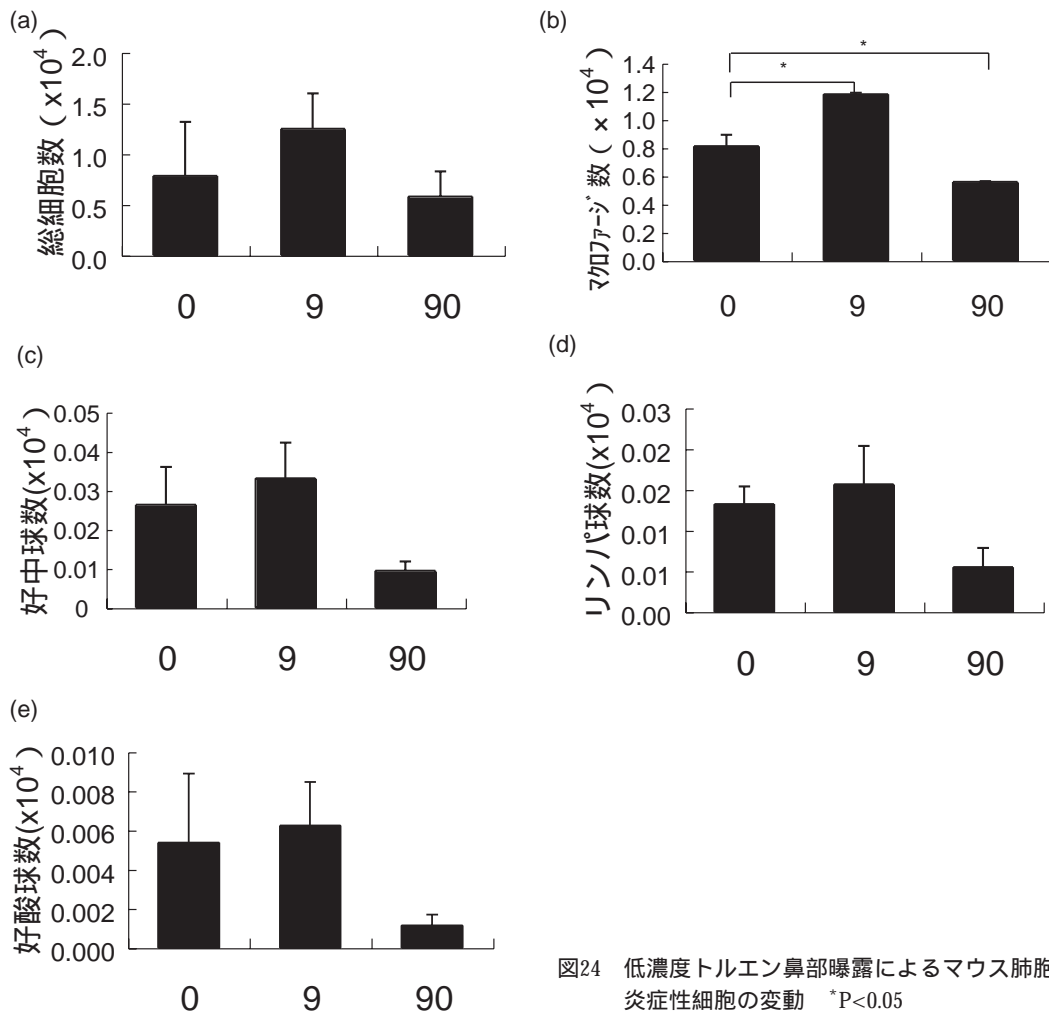


図24 低濃度トルエン鼻部曝露によるマウス肺胞洗浄液中の炎症性細胞の変動 *P<0.05

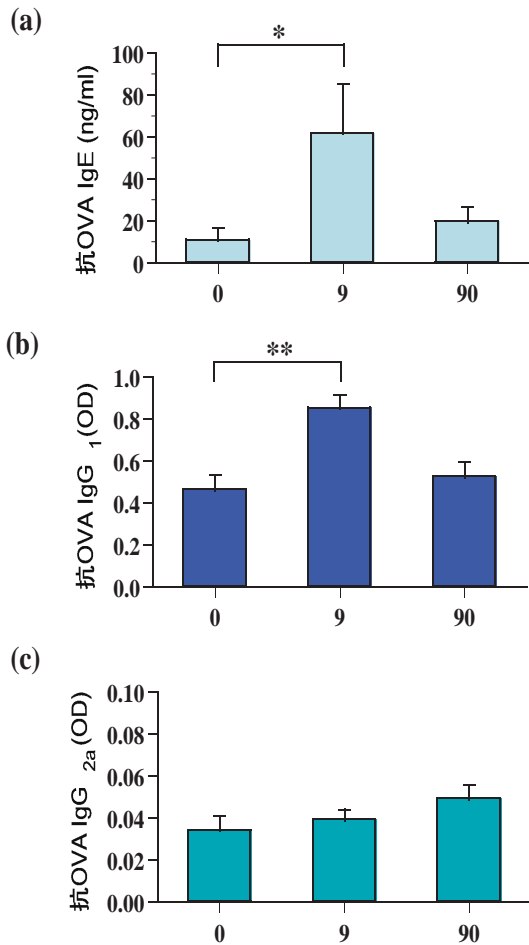


図25 トルエン鼻部曝露したマウス血漿中OVA特異的抗体産生の変動 *P<0.05, **P<0.01

かかわるケモカインであるCXCL12産生は、トルエン曝露刺激では低下がみられたが、OVA抗原刺激が加わるとトルエン濃度依存的に増加することが明らかとなった。さらに、鼻部からのトルエン刺激情報が集まる嗅球においては、トルエン曝露によりケモカインCCL2とCCL3 mRNAsの発現が上昇し、特に抗原刺激が加わることで前者の発現は有意に増加した(図26)。

以上、低濃度のトルエン鼻部曝露は、単独では免疫系における情報の伝達には抑制的に作用する傾向であった。しかしながら、抗原刺激との併用ではその情報の伝達を増強する方向に作用し、神経系に関連する情報伝達分子の動きも同様な傾向を示した。また、9 ppmのトルエン濃度をピークとした反応が観察された。

神経-免疫軸での情報交換におけるかく乱作用を調べるために、マウスを抗CD4抗体処理してTリンパ球の一時的な欠損を誘導し免疫記憶の成立しない状態を作成した。トルエン曝露して神経成長因子や海馬でのサイトカインの産生について比較した。血漿中の神経成長因子NGF産生はトルエン曝露で増加したが、リンパ球欠損マウスでは増加がみられなかった。また、海馬におけるIFN- γ の産生はトルエン曝露による増加が見られたが、トルエン曝露したリンパ球欠損マウスでは増加しなかつ

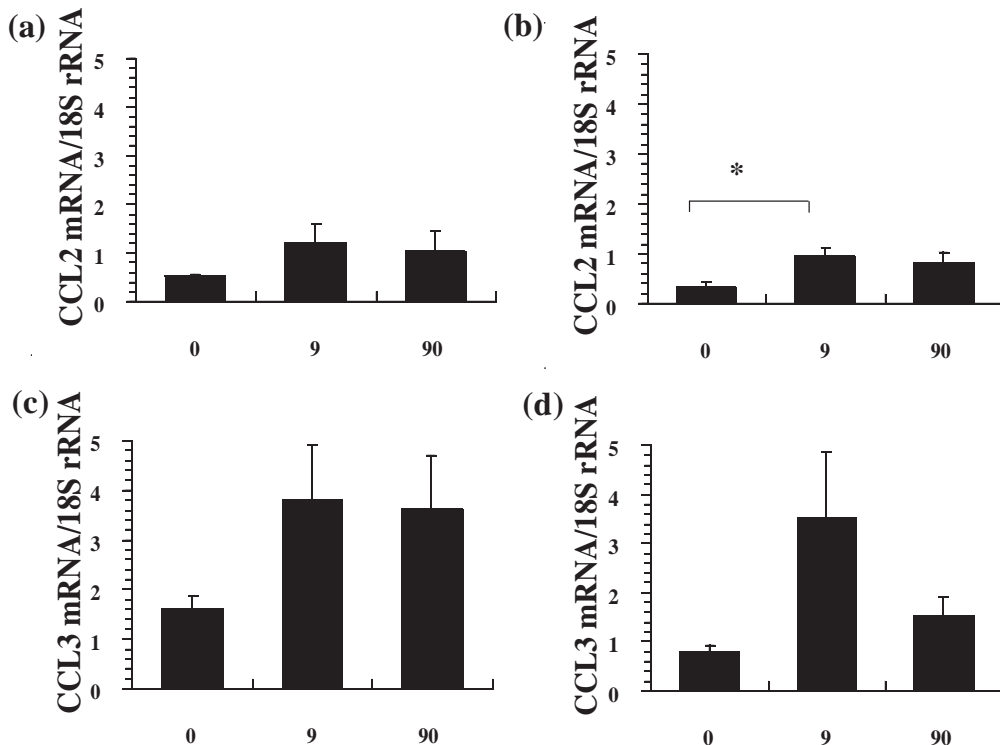


図26 トルエン曝露したマウスの嗅球におけるケモカイン遺伝子発現 *P<0.05 a,c:免疫しないマウス, b,d: 免疫したマウス

た。ところが、海馬でのTNF 産生はリンパ球の欠損の有無にかかわらず、トルエン曝露による増加が認められた。

以上の結果から、免疫記憶はトルエン曝露による神経記憶の場での炎症反応の誘導においても関与していることが示唆された。

2.3 体内動態評価

2.3.1 脳内動態の解明

実験動物にトルエンを曝露した場合の脳内トルエン濃度の測定については、トルエンを曝露した後、解剖して脳を速やかに取り出し、ホモジナイズして有機溶媒で抽出後、測定するという方法が報告されているが、この方法では、同一個体を繰り返し測定することは不可能である。また、トルエンが揮発性物質であるため、操作中のトルエンの揮散は避け難く、MCSに関連するような数ppmレベルの低濃度曝露の場合、解剖中の揮散などの誤差は無視できない状況にある。一方、近年マイクロ固相抽出法が開発され、その利用が広がっている。この方法は、シリンジの先に担持された吸着剤に有機化合物を吸着させ、熱脱着等の方法によりガスクロマトグラフで分析するという迅速かつ簡易な手法である。

そこで我々は、脳を摘出することなく、Solid Phase Microextraction (SPME) ファイバーを直接脳内へ挿入することで脳内トルエンを吸着捕集する方法を開発した。すなわち、カニューラをマウス脳内に挿入したまま頭蓋に固定し、測定時にSPMEを挿入して覚醒下の動物の脳内トルエンを非解剖的に直接検出する方法を開発した。

(1) トルエンの検出

試験に使用したSPMEファイバーは、StableFlex fiber (10mm of length, 85 μm polydimethylsiloxane (PDMS) / divinylbenzene (DVB) -coated, Supelco, Bellefonte, USA) を使用した。SPMEは仕様書に従い、GCのインジェクションポートにキャリアーガスを流しながら250 $^{\circ}\text{C}$ で30分以上加熱処理してから使用した。SPMEの前処理は各実験の6時間前以内に行い、試験に使用するまでの間は加熱処理したセプタムにファイバーの先端を刺し、活性炭を入れたネジ口試験管内に保管した。実験ごとに同様に処理したトラベルブランクSPMEを用意した。その値は検出限界以下 $\sim 0.025\text{ng}$ の範囲内であった。SPMEに捕集したトルエンはGC/MSを用いて測定した。

(2) SPMEファイバーの選択

まず最初に、SPMEファイバーの選択を行った。予備的に行った実験では、75 μm Carboxen/PDMSファイバー(ファイバーコアはフューズドシリカ)を用いたが、マウス脳内にファイバーを挿入中にマウスが動き、ファイバーが簡単に折損してしまった。今回の手法は無麻酔の動物脳内から直接トルエンを吸着捕集する方法であるため、吸着剤部分のファイバーコアには曲げても折れにくいStableFlexを使用する必要があった。StableFlexのファイバーは数種類市販されているが、前処理の温度が比較的低くて済み、低分子の捕集に優れたPDMS/ DVBを選択した。

(3) 鼻部曝露濃度と海馬近傍トルエン量の関係

実験に供したマウスは、全ての実験終了後、脳を摘出し、海馬CA1領域の20 μm 厚の切片を作製し、顕微鏡でカニューラの位置を確認した。図27にはその写真を示す。ここに示したように、カニューラは海馬に挿入されており、SPMEはCA1近傍のトルエンを吸着していることが確認された。

鼻部曝露条件(トルエン濃度)と曝露終了直後におけるSPMEトルエン測定値の関係を図28に示す。曝露前のSPMEトルエン測定値は $0.07 \pm 0.05\text{ng}$ ($n=7$)であった。0.9 ppmトルエン曝露直後に検出されたSPMEトルエン測定値は $0.04 \pm 0.02\text{ng}$ ($n=6$)となり、9 ppm曝露の場合には $0.37 \pm 0.14\text{ng}$ ($n=6$)、50 ppm曝露の場合に 0.89 ± 0.34 ($n=6$)、90 ppm曝露の場合に 1.39 ± 0.50 ($n=6$)であった。0.9 ppm曝露の場合には、曝露前後における検出トルエン量に差は確認されなかったが、9 ppm、50 ppmおよび90 ppmのトルエンを鼻部曝露した場合には、曝露前後で有意な差が認められ ($p<0.05$)、曝露濃度の増加に応じ



図27 カニューラ跡の先端が海馬に位置している写真

て海馬近傍からSPMEに吸着されたトルエン量は増大していることが確認された。なお、得られたSPME測定値が呼吸器経由であることを確認するため、人為的に呼吸停止したマウスをコントロールとして同様に9 ppmの鼻部曝露に供したが、海馬近傍トルエン量は曝露前後において差が認められず、トルエン吸着量の上昇は認められなかった。以上のことから、海馬近傍から当該手法で検出されたトルエンは、鼻部曝露で呼吸によって吸入されたものが脳内に運ばれたものであるものと考えられた。

(4) 曝露後の時間経過と海馬近傍トルエン量の関係

次に50 ppmのトルエンを鼻部曝露した場合におけるトルエン量の経時的変化について、SPMEによる吸着時刻を独立して変えた実験を行った。得られた結果を図29に示す。曝露直後にSPMEで採取測定した場合に 0.89 ± 0.34 ng (n=6)であったのに対し、10分後に採取測定したマウスでは 0.43 ± 0.5 ng (n=5)、60分後に採取測定した場合には 0.10 ± 0.12 ng (n=6)となることが認められた。60分後の採取測定では、SPME測定値は大幅に減少し、非曝露群の場合 (0.07 ± 0.05 ng) と同程度まで減衰していることが確認された。1700~5100 ppmのトルエンをラットに鼻部曝露した場合の脳中トルエンの経時変化から求めた半減期は56.2~69.9 minであると報告されている。また、ラットに125から4000 ppmのトルエンを4時間吸気曝露した場合の血中および脳内トルエン濃度の消長に

ついて、低濃度曝露の場合の方が半減期は短いことが示されている。今回我々が行った50 ppmの曝露結果は、上記のラットでの125ppmの曝露結果と近いものであった。以上のように、本法は生きたままのマウス脳内トルエンをSPMEを用いて検出した初めての報告である。

脳内の化学物質を非解剖的に検出する手法としては、マイクロダイアリシスを用いた報告がある。このマイクロダイアリシスを用いてラットにトルエンを腹腔内投与した場合の、脳内アセチルコリン濃度の変化を測定した報告がある。この手法は、透析チューブへの吸着が少なく、不揮発性である物質、すなわち極性化合物の測定には適しているが、トルエンのような揮発性の有機化合物の測定には適さないものと考えられた。なお、今回開発した手法の欠点としては、脳を摘出しないため、従来のような脳重量あたりのトルエン濃度を算出することには不向きな点である。しかし、脳内での化学物質の消長、すなわち半減期の算出などには有効な手法と考えられる。また、無麻酔で測定可能であるため、麻酔による影響を除外した結果が得られやすいことや、トルエン吸着時の僅かな時間(今回は2分間)以外の動物の拘束の必要がなく、自由行動状態での飼育が可能であるなどの利点もあり、脳内化学物質の消長と行動などの研究にも応用可能であると思われる。

2.3.2 家屋内における揮発性物質の実測

近年、化学工業等の発展はめざましいものがあり、各

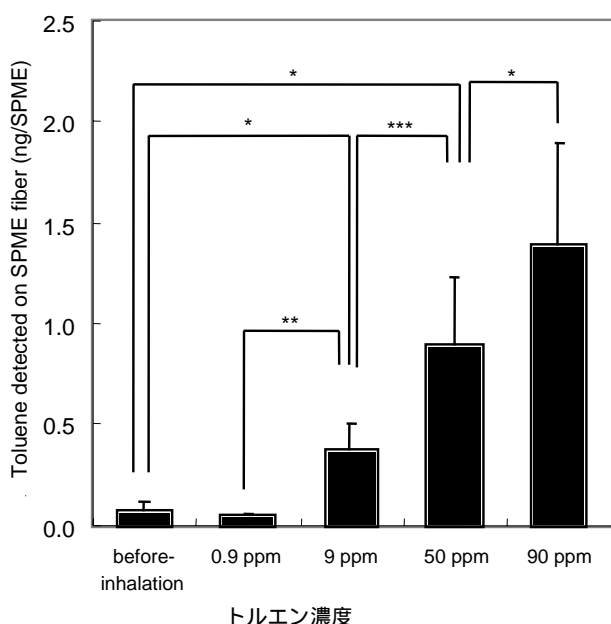


図28 トルエン曝露濃度とSPME測定値(トルエン量)との関係 (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005)

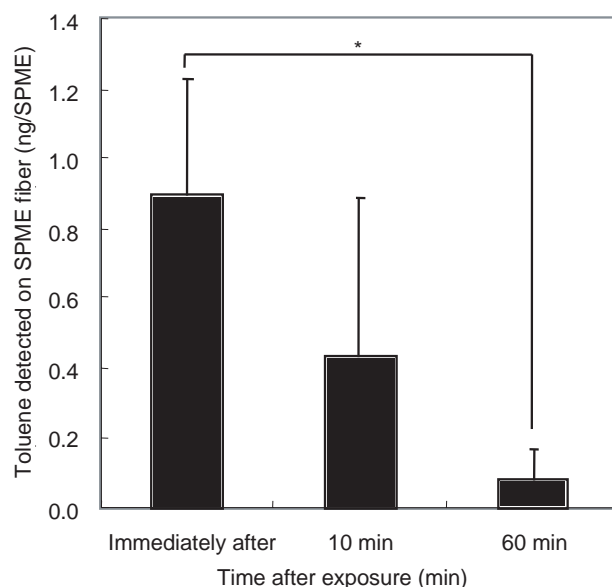


図29 トルエン鼻部曝露後の海馬近傍トルエン量とその時間経過との関係 (* p<0.05)

種目的に応じた化学製品が生産され大量に使用されている。これらの化学物質の種類も莫大な数にのぼっており、住宅においても、様々な建築材料や家庭用品などが使われている。建築材料から発散して室内空気に含まれる化学物質も多種類にのぼっている。また、省エネルギー化に伴って、気密性の高い住宅が増加してきているため、それらの室内空気中濃度が高くなる場合がある。さらに、我々の生活のほとんどはこのような空間内で営まれているため曝露時間も長くなっているものと考えられる。このような状況下で、室内におけるある種の化学物質の曝露が原因と思われるシックハウス症候群が健康影響問題として現れてきている。

したがって、室内空気中の揮発性有機化合物の種類や濃度およびそれらの曝露実態の把握や発生源の追及は、当該疾病やその他の健康影響対策上極めて重要である。一方、これまでに室内空気中の揮発性有機化合物の捕集法としてはキャニスターによる捕集、吸着剤による捕集

などが主に行われているが、これらは採取容器が比較的大型であったり、吸着剤のバックグラウンド揮発性有機化合物量が高かったりするなどの難点が見受けられた。そのため我々は、バックグラウンドの低い活性炭系の吸着剤を入れたパッシブサンプラーを個人に携帯してもらい個人曝露揮発性有機化合物濃度の測定に適用するなどの検討を加えてきた。

今回は、最近の新築住宅の室内揮発性有機化合物の特徴を調べるため、昨年新築された一戸建ておよび集合住宅（マンション）の室内を対象に入居後から1ヵ月ごとに1年間を通して、揮発性有機化合物を捕集しその挙動を調べた。

(1) Uptake Rate および定量下限値

測定対象とした揮発性有機化合物33種に対するUptake Rate (ng/ppb/hr)と、捕集時間を24時間と仮定した場合の定量下限値(ppb)を表1に示してある。24時間捕

表1 測定対象の32種のVOCと今回の検出下限値

化学物質名		定量用 イオン	確認用 イオン	Uptake Rate (ng/ppb/hr)	定量下限値* (ppb)	
脂肪族系化合物	ヘキサン	57	56	9.56	0.13	
	2,4-ジメチルペンタン	43	57	8.97	0.10	
	ヘプタン	43	41	9.79	0.22	
	オクタン	43	57	9.89	0.18	
	ノナン	43	57	10.07	0.14	
	デカン	43	57	8.70	2.52	
	ウンデカン	43	57	4.49	2.84	
	芳香族系化合物	ベンゼン	78	77	7.10	0.48
		トルエン	91	92	10.77	0.15
		エチルベンゼン	91	106	10.03	0.46
m,p-キシレン		91	106	9.80	0.25	
o-キシレン		91	106	9.39	0.17	
スチレン		104	103	5.39	0.48	
1,3,5-トリメチルベンゼン		105	120	9.40	0.18	
1,2,4-トリメチルベンゼン		105	120	8.52	0.18	
1,2,3-トリメチルベンゼン		105	120	8.57	0.20	
有機塩素系化合物		クロロホルム	83	85	13.51	0.19
	1,2-ジクロロエタン	62	64	11.43	0.09	
	1,1,1-トリクロロエタン	97	99	13.88	0.06	
	四塩化炭素	117	119	15.08	0.13	
	1,2-ジクロロプロパン	63	62	11.71	0.08	
	トリクロロエチレン	130	132	14.19	0.04	
	テトラクロロエチレン	166	164	15.87	0.08	
	クロロジブロメタン	127	129	19.65	0.06	
	p-ジクロロベンゼン	146	148	9.00	0.18	
	エステル類	酢酸エチル	61	43	9.82	0.73
酢酸ブチル		43	56	7.31	0.30	
ケトン類	メチルイソブチルケトン	43	58	9.17	0.11	
アルコール類	1-ブタノール	56	43	9.18	0.31	
テルペン類	リモネン	93	69	11.13	0.14	
	リネン	68	67	8.59	0.11	

* 24 時間捕集の場合

集の場合、ほとんどの物質は1 ppb以下の濃度の測定が可能であったが、デカンとウンデカンについては未使用サンプラーのブランク値が高く、定量下限値は2 ppb以上と高かった。

(2) 入居時の室内濃度

2003年1月に木造一戸建住宅(那珂郡)の最初のパッシブサンプリングを行った。測定結果を表2に示してある。表2から、ヘキサン、ウンデカン、ベンゼン、トルエン、*p*-ジクロロベンゼン、酢酸エチル、メチルエチルケトン、ピネンおよびリモネンの9種は10 ppb以上の値を示し、比較的高濃度であることが認められた。また、これらの揮発性有機化合物のうちトルエンおよび

ピネンは100 ppbを越える場合があること、換気の吹き出し孔の近辺にあるキッチンではリビングやベッドルームでの測定値に比べて、幾分低い値を示すことなどが明らかとなった。

今回測定した揮発性有機化合物32種のうち厚生労働省が室内濃度指針値を定めている揮発性有機化合物は5種

類(キシレンは*o*-、*m*-、*p*-の合計を1種類とする)であったが、指針値を越えていた揮発性有機化合物は、トルエン(指針値70 ppb)および*p*-ジクロロベンゼン(指針値40 ppb)であった。また、これらの室内揮発性有機化合物濃度に比べて屋外の揮発性有機化合物濃度は極めて低く、ほとんどの測定物質が定量下限値以下であった。屋外空気から検出された物質は数種(*p*-ジクロロベンゼン、酢酸ブチル、ピネンおよびリモネン)認められたが、これらの濃度は室内でも比較的高い濃度を示しており、室内揮発性有機化合物の一部が室内の換気により軒下に設置したパッシブサンプラーに影響を与えたものと思われた。

(3) 一戸建住宅における室内揮発性有機化合物濃度の月別変化

一戸建住宅の揮発性有機化合物濃度測定において、入居時に室内濃度指針値よりも高い濃度を示すものが認められたことから、同じ捕集地点で定期的(1回/月)に揮発性有機化合物を吸着採取し、それらの経時変化を調

表2 2003年1月の那珂郡の木造一戸建て住宅内およびその屋外での測定結果の例(単位: ppb)

化合物	リビング	キッチン	ベッドルーム(2F)	室内平均値	屋外1	屋外2	屋外平均値
ヘキサン	12.0	N.D.	1.24	6.60	N.D.	N.D.	N.D.
2,4-ジメチルペンタン	0.67	N.D.	0.78	0.73	N.D.	N.D.	N.D.
ヘプタン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
オクタン	2.95	0.42	3.55	2.31	N.D.	N.D.	N.D.
ノン	2.67	N.D.	N.D.	2.67	N.D.	N.D.	N.D.
デカン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ウンデカン	90.0	14.3	87.7	64.0	N.D.	N.D.	N.D.
ベンゼン	8.12	N.D.	10.4	9.26	N.D.	N.D.	N.D.
トルエン	158	23.2	188	123	N.D.	N.D.	N.D.
エチルベンゼン	2.54	N.D.	2.58	2.56	N.D.	N.D.	N.D.
<i>m</i> 、 <i>p</i> -キシレン	4.05	0.77	4.38	3.07	N.D.	N.D.	N.D.
<i>o</i> -キシレン	2.10	0.40	2.34	1.61	N.D.	N.D.	N.D.
スチレン	1.41	N.D.	N.D.	1.41	N.D.	N.D.	N.D.
1,3,5-トリメチルベンゼン	1.44	0.38	1.59	1.14	N.D.	N.D.	N.D.
1,2,4-トリメチルベンゼン	2.3	0.5	2.3	1.73	N.D.	N.D.	N.D.
1,2,3-トリメチルベンゼン	0.90	N.D.	0.97	0.93	N.D.	N.D.	N.D.
クロホルム	1.34	N.D.	N.D.	1.34	N.D.	N.D.	N.D.
1,2-ジクロロエタン	0.17	N.D.	0.24	0.21	N.D.	N.D.	N.D.
1,1,1-トリクロロエタン	0.15	N.D.	0.18	0.17	N.D.	N.D.	N.D.
四塩化炭素	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1,2-ジクロロプロパン	N.D.	N.D.	0.22	0.22	N.D.	N.D.	N.D.
トリクロロエチレン	0.19	N.D.	0.21	0.20	N.D.	N.D.	N.D.
テトラクロロエチレン	N.D.	N.D.	0.16	0.16	N.D.	N.D.	N.D.
クロロジフルオロメタン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>p</i> -ジクロロベンゼン	80.8	11.6	57.5	49.9	N.D.	0.33	-
酢酸エチル	16.3	N.D.	3.72	10.02	N.D.	6.24	-
酢酸ブチル	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メチルエチルケトン	16	2.8	16	11.59	N.D.	N.D.	N.D.
メチルイソブチルケトン	7.47	1.11	7.19	5.26	N.D.	N.D.	N.D.
1-ブタノール	3.22	1.21	2.49	2.31	N.D.	N.D.	N.D.
ピネン	115	18.6	123	85.27	0.25	N.D.	-
リモネン	35.5	6.59	26.6	22.87	ND	0.42	-

べることとした。

得られた結果を図30 (a,b,c,およびd) に示した。なお、この図には1階のリビングおよびキッチンと2階のベッドルームでの測定結果の平均値を測定物質群に分けて示してある。図30から脂肪族系化合物7種のうちワックスなどに含まれているウンデカンが入居初期に64 ppbの高い濃度を与えたが、経時的に減少する傾向にあった。また、図30bの芳香族系化合物9種のうち、トルエンは入居時に高い濃度 (123 ppb) を示したが、5月に若干高

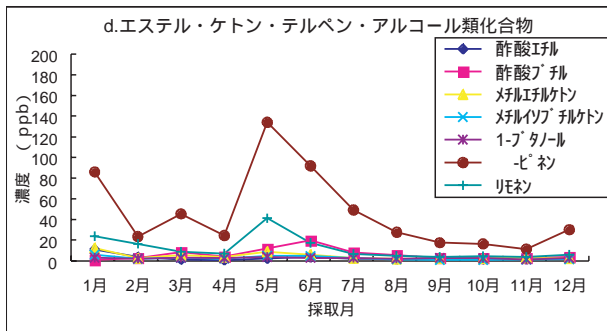
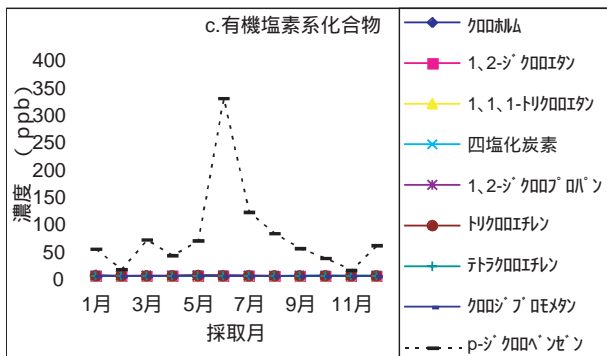
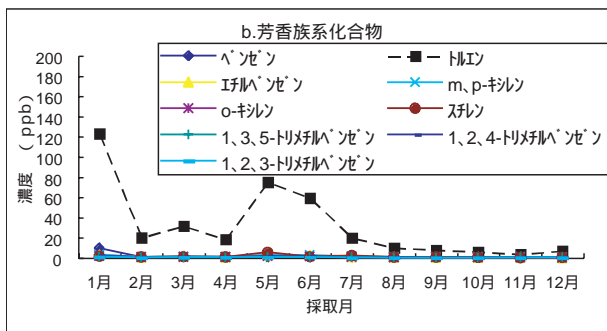
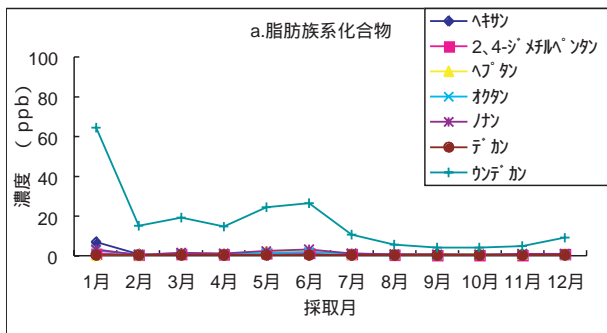


図30 一戸建住宅におけるVOC濃度の経時的変化 (平均値)

い値 (75 ppb) を与えたものの月ごとに減少する傾向が認められた。

図30cに示す有機塩素系化合物では、測定した9種のうち *p*-ジクロロベンゼンは極めて高い濃度 (約320 ppb) を6月に与え、それ以降は月ごとに急な減少傾向を示した。この原因として6月の衣替え時期に *p*-ジクロロベンゼンを含んだ防虫剤が使用された可能性が高い。図30dには、エステル、ケトン、テルペン、アルコール類など7種類の測定結果を示してある。これらの化合物のうち、木材に含まれる α -ピネンが高い値を示した。輸入パイン材を多く使用した住宅であったため、入居時 (1月) には高い値を示したが、その後、低下し、常時換気設備をOFFとしていた5月に幾分高い値を示したが、それ以降は月ごとに減少する傾向が認められた。

(4) 集合住宅における室内揮発性有機化合物濃度の月別変化

集合住宅においても月ごとの定期的な測定を行った。得られた結果を図31 (a,b,c,およびd) に示してある。図31aから、脂肪族系化合物7種のうち比較的高い濃度を示したものは、ワックスなどに使用されるノナン、デカンおよびウンデカンであった。一戸建住宅のウンデカンは入居初期に高い濃度を示し、その後低下する傾向を示したが、集合住宅の今回の場合は当該成分以外にノナンやデカンも加わり、測定月後半からの濃度が少しずつ上昇する傾向を示した。

図31bの芳香族系化合物9種のうち高い濃度を示したのはトルエン、1,2,4-トリメチルベンゼン、*m,p*-キシレン、およびエチルベンゼンであった。このうちトルエンおよび1,2,4-トリメチルベンゼンは入居時 (4月) に高い値を示し、それ以降低下する傾向にあった。トルエンについては1月、2月および3月期に若干高くなる傾向も認められた。この2種の揮発性有機化合物の挙動に比べて、*m,p*-キシレンの場合は入居時には低い濃度を示していたにもかかわらず、12月、1月、2月とその濃度が上昇し、トルエンの初期濃度を上回る濃度を示すようになった。一方、図31cの有機塩素系化合物の9種はいずれも低い濃度で推移することが認められた。特に、一戸建ての測定で高い濃度を示した *p*-ジクロロベンゼンは、ほかの有機塩素系化合物の濃度とほとんど変化せず当該化合物を含む防虫剤等は使用されていないものと考えられた。

図31dには、7種のエステル、ケトン、テルペン・アルコール類の濃度を示してある。これらの化合物のうち高い濃度を与えた物質は2種あり、有機溶剤として用いられるメチルエチルケトンと木材成分である - ピネンであった。これら2種は入居時（4月）には高い値を示したものの経時的に大きく減少する傾向があることなどを認めた。

今回の新築住宅室内の揮発性有機化合物の濃度測定結果から、完成時において高い濃度を示した物質が月ごと

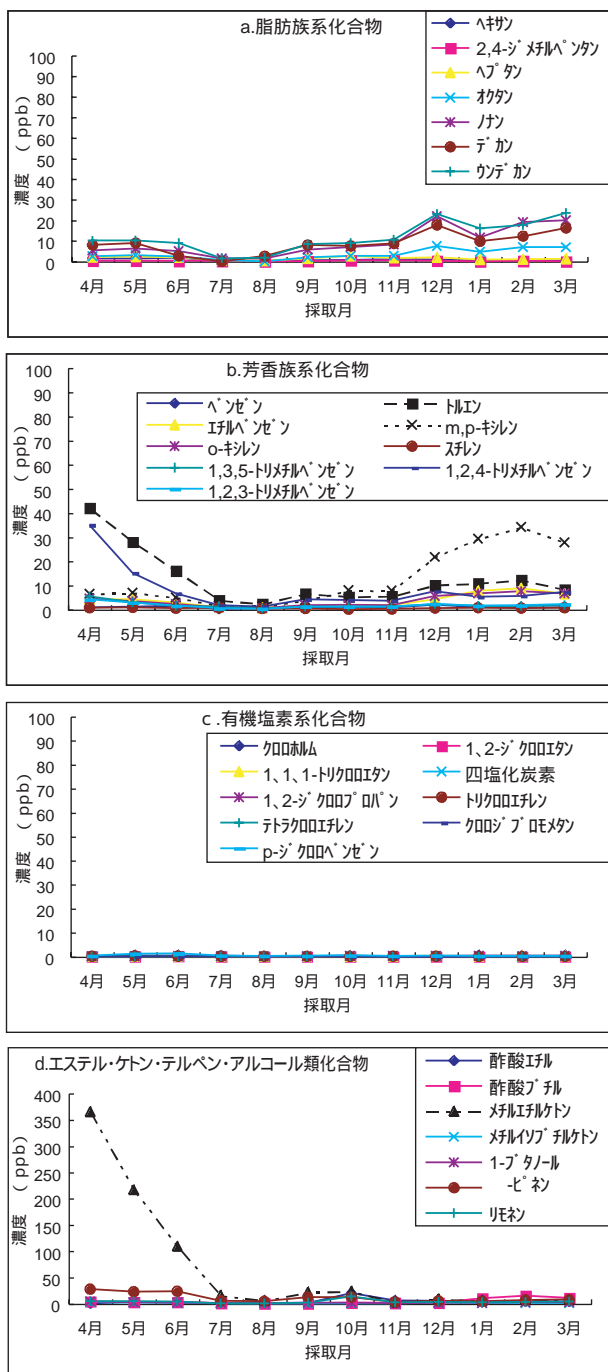


図31 集合住宅におけるVOC濃度の経時変化（平均値）

に減少する場合や別の要因、例えば防虫剤の使用などによりその濃度が高くなる場合があることなどが認められた。また、同時期の新築住宅であっても、その汚染揮発性有機化合物の種類や濃度変化が大きく異なることが明らかとなった。さらに、これらの住宅を利用する時間などは個人のライフスタイルによっても大きく異なることが考えられる。

したがって、揮発性有機化合物の挙動とそれらへの曝露状況とシックハウス症候群発症の問題性などを視野に入れた調査を進めると共に、当該疾病の原因物質が明らかになるまでは揮発性有機化合物種の検索幅をさらに広くしたような検討を進めていく必要がある。

2.3.3 嗅球・海馬における記憶機能の新たな評価手法の開発

(1) 光学的イメージングによる神経活動モニター手法
 低濃度の揮発性有機化合物を吸入する時の嗅覚系での脳神経の神経活動をリアルタイムにモニターする手法の開発を試みた。一般に神経活動のモニター手法としては、神経活動由来の電気信号を直接に検出する方法と、神経活動に由来する細胞レベルの変化を光学信号に変換して間接的に記録する方法に大別されるが、本研究では、後者の光学的イメージングを実施した。光学的イメージングでは*in vitro*（脳スライス、摘出脳）計測と*in vivo*計測のいずれにおいても適用されるが、本研究では揮発性有機化合物の曝露を計測系にくみこむ必要があるために、*in vivo*計測を選択した。

本研究では、神経活動をモニターするうえで二種類の蛍光色素（膜電位感受性色素；Voltage-sensitive dye (VSD)、およびカルシウム・プローブ）を用いた。VSDは、神経細胞の細胞膜に取りこまれて、膜電位に応じて蛍光を出す特性を変化させるので、神経細胞の電気的活動（おもには樹状突起由来の集合電位の変化）をモニターできると考えられている。

カルシウム・プローブは細胞内Caイオンの濃度を反映して蛍光強度を変化させるので、おもに神経の軸索終末からの神経伝達物質の放出に先立つCaイオン流入をモニターできると考えられている。

VSDイメージングに関しては、VSDの蛍光強度の変化がきわめて小さいという難点があるが、近年のイメージング素子（CCD, CMOS）の機能の向上により、膜電位のミリ秒単位の変化を高い空間分解能でモニターする手

法として、脳神経科学の分野でしばしば実施されるようになってきている。Caイメージングに関しては、Caプローブの蛍光変化が神経の電氣的活動よりも時間的に遅れるという欠点を持つが、VSDと比べて感度がきわめて高いという利点がある。

1) 実験手技

8~12週齢のC3H雄マウスを用いた。

各種麻酔薬(ネンプタール、ウレタン、ケタミン+キシラジン)の腹腔内投与による麻酔をマウスにほどこしたうえで、マウスの頭蓋を傾斜式脳定位固定装置(Narishige, SR-50)に固定した。海馬イメージングの場合は、まず片側の大脳皮質を露出させ、海馬の背側に位置する大脳皮質(頭頂葉、および側頭葉と後頭葉の一部)を剥離して海馬背側面を露出させた。この露出面を蛍光プローブ溶液で浸し、45分~1時間の染色を行った。

人工脳脊髄液での洗浄後、イメージング・システム(後述)を用いて、ハロゲン光照射による蛍光の変化を1~6秒間計測した。VSDにはDi-4-ANNEPS,またはRH-795を用いた。CaプローブにはRhod-2を用いた。

本計測では、脳に負荷する刺激として電気刺激とトルエン吸入刺激を用いた。電気刺激の場合、電極はステンレス製の同心双極電極(直径120 μ m)(FHC社, CB-APC75)を用い、持続200 μ s/振幅100 μ Aの矩形波電流を1パルス与えることで行った。電気刺激の場合は刺激のタイミングを厳密に制御できるので、原則として電気刺激時の計測では、データ収集を数回~数十回くりかえして加算平均をとる方法を採用した。さらにVSDイメージングの場合には、マウスの胸部より誘導した心電図でR波を検出し、それを計測開始のトリガーとして1回の計測のタイミングをあわせ、刺激ありの画像から刺激なしの画像を差しひいたものを1回の計測として、それを加算平均した。この方法により、拍動にともなう脳の機械的振動に由来する光学的ノイズを低減させた。

一方、トルエン刺激の場合は、定位脳固定装置に固定されたマウスの鼻先に鼻アダプターを装着し、その側面に簡易式鼻部ガス曝露装置(後述)を接続させて、ガスを吸入曝露させた。トルエン曝露時の計測では、胸郭の呼吸運動をひずみゲージでモニターしながら、蛍光変化を1回ごとに計測した。

2) 簡易式鼻部ガス曝露装置

2個の小型電磁弁ではさまれた部分に空気とトルエ

ン・ガスとの2流路を設置し、デッド・ボリウムを極力小さくした2ガス切り替え式の噴き出し口を作製した。トルエン・ガスは、流路の小型チャンバ内にトルエンを染ませた綿球を入れた状態で自然拡散により作製した。通気は電磁弁の上流でペリスタ・ポンプを用いて行い、3ml/秒の流速を維持してマウスの鼻先のアダプター内にガスを流入させた。電磁弁の開閉はイメージング用ハードウェアからのデジタル信号で制御し、計測中の任意のタイミングでガスの切り替えができるようにした。

3) 結果: VSD イメージング-電気刺激時の海馬イメージング

先に述べた通り、各計測は心拍に同期させてスタートし、刺激ありの計測(計測A)と刺激なしの計測(計測B)を交互にくりかえし、1サイクルごとに{画像A-画像B}を計算し、計10~20回のサイクルの加算平均により、最終的な画像を作成した。

その結果、海馬と同側の嗅球への刺激、および海馬台の深層(海馬の歯状回への入力繊維が走る部分)への刺激によっては、海馬の興奮を可視化することはできなかった。

一方、海馬の歯状回への刺激後のCA3領域の興奮(図32)、ならびに、CA1領域への刺激後の海馬台領域の興奮(図33)を可視化することには成功した。

しかしながら、トルエン吸入時の海馬画像を観察したが、吸入のタイミングに一致した海馬背側面における電位振動は観察されなかった。また、トルエン吸入の初体験マウスと訓練マウスとで結果を比較したが、差異は認められなかった。

4) カルシウムイメージング

海馬台への電気刺激によるCA3領域の興奮を可視化することができた(図34)。VSDによる蛍光像は予想していた以上にその変化の幅がせまく、十分に感度の高い画像を得ることはできなかった。今回の計測では、トルエンの吸入を刺激とした場合には単一計測モードを選択する以外に、神経興奮を画像としてとらえることはできなかった。一方、電気刺激による海馬の興奮の可視化には一部成功した。ただし、その成功例のいずれの場合も、基本的な海馬内神経回路(すなわち海馬の長軸に対する横断面方向での回路)の下流の部分において、VSDイメージングでは1個のシナプス、Caイメージングでは1~2個のシナプスを介した興奮伝播がとらえられた

にとどまった。

(2) オペラント学習法による匂い弁別能評価手法

においが記憶と結びつきが深いことは、経験的には誰

もが知っていることである。嗅覚系の特徴として、対象物を認知するという神経の情報処理機構とともに、対象物と情動を結びつける神経機構と強く結びつくことが挙げられる。嗅覚は、体調の悪いときに一度だけ嗅いだに

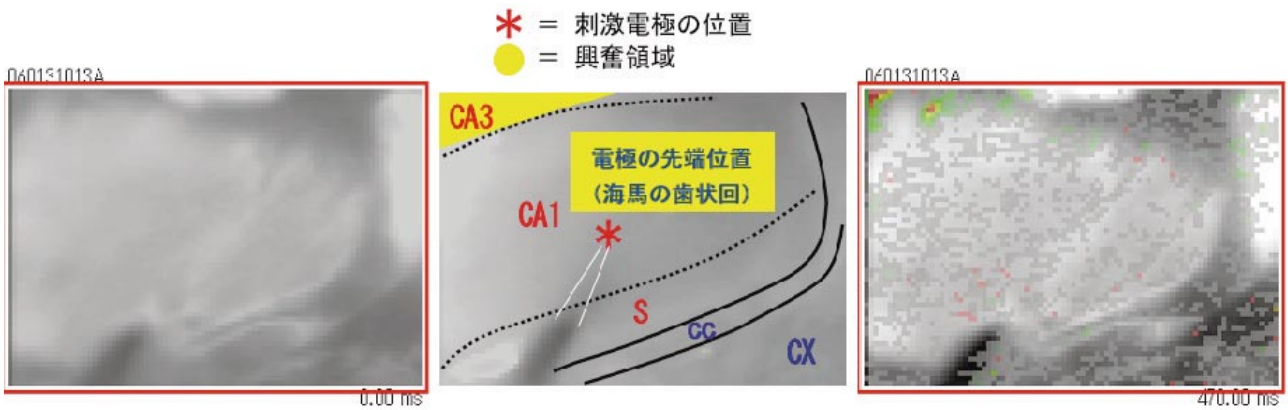


図32 海馬の歯状回領域刺激後のVSDイメージング像 1
左より、刺激前の蛍光像、模式図、刺激後の蛍光像

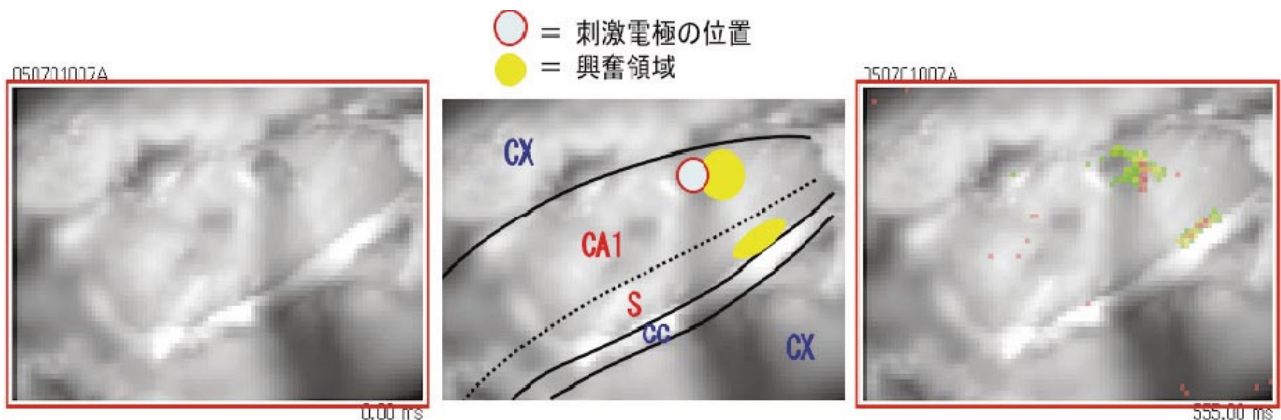


図33 海馬のCA1領域刺激後のVSDイメージング像 2
左より、刺激前の蛍光像、模式図、刺激後の蛍光像

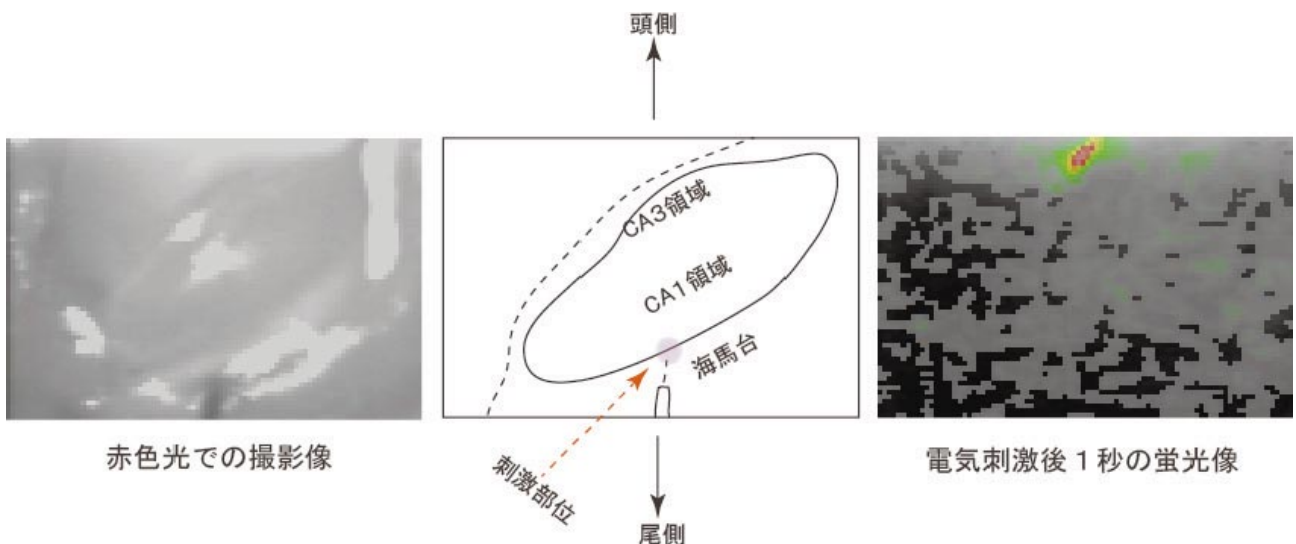


図34 海馬のカルシウムイメージング像

おいを、後日再び嗅ぐと体調が悪かったときの嫌悪的な感情が喚起される、といった強い結合を示す。これらの情動は、まさににおいと記憶によるものといえるが、ヒトの情動あるいはにおいと記憶との関係に関する神経機構は、ほとんど解明されていない。

本実験では、オペラント学習試験法^{*4}を用いてマウスに行わせ、“においなし”に対しても“においあり”と同様にレバーを押す反応を学習させた。はじめに、左右二カ所にレバーが付いたオペラント実験箱(図35)の中にマウスを入れ、あるにおいを刺激として提示し、“においあり”と“においなし”を弁別する訓練を行った。マウスには、“においあり”の場合はどちらか一方のレバーを、“においなし”の場合は反対側のレバーを押すことを要求した。“においあり”および“においなし”に対するレバー押しが正解であれば報酬としてエサを与えた。弁別訓練が終了したあと、(a)新たなにおい刺激を加え、“においあり”刺激を2種類に増やした。弁別訓練で学んだにおい刺激と新奇のにおい物質両方に対して、マウスが“においあり”のレバー反応を示すかどうか(カテゴリー化できるか)を検討した。さらに、(b)カテゴリーが構成されたあとに、第3のにおい物質を加えてテストを行った。カテゴリー化が生じていれば、第3のにおい刺激に対しても迅速に“においあり”

との判断が生じることが予想される。カテゴリー学習した動物を有害化学物質のにおい判定に使用することを想定し、第3のにおいには有害化学物質の一つとされるリモネンを使用した。

1) 方法

10週齢のオスのマウス(C3H)5匹を使用した。におい刺激として、コーヒー(インスタントコーヒー5gを100mlに溶解したもの、通常飲料として摂取する適度な濃度である)、ペースト状チーズ(スプレー缶に入ったチェダーチーズ、市販品)、リモネン(10mlの蒸留水にスポイトで5滴たらしたものを)を使用した。1.5mlのサンプルチューブの底部におい物質をスポイトで1~2滴たらしうえから綿花でふさぎ、視覚が手がかりにならないようにチューブ全体を紙で覆った。においなしのチューブ(綿花のみ)も作成した。左右に二つのレバーがついているオペラント実験箱を使用し、マウスににおいの有無によりレバーを区別して押すことを学習させた。はじめに、インスタントコーヒーを提示し、においのない状態との弁別訓練を行った。マウスをオペラント実験箱に入れ、訓練試行開始の合図(箱内のランプ点灯)後に所定の位置にチューブを置いた。マウスに対しチューブのにおいを嗅ぎ、においがある場合(正刺激)は“においあり”レバーを、においがない場合(負刺激)はも

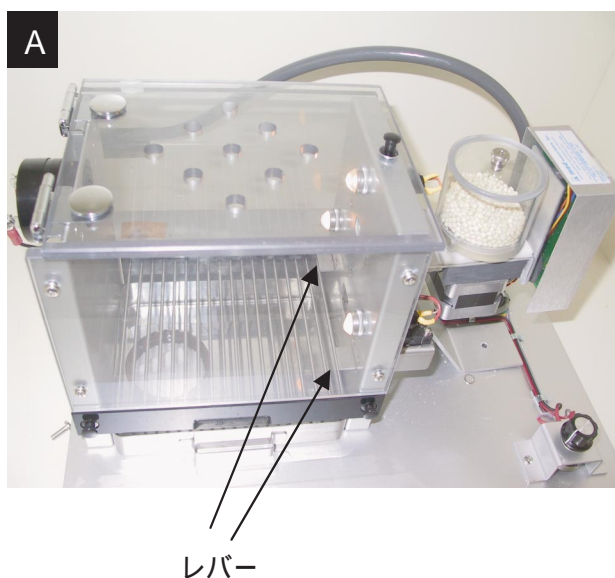


図35 オペラント実験箱
(A 側面より B 真上より)

^{*4}動物が自発的に環境に働きかけた結果、好ましい結果が得られた場合はその行動は強められ、逆に好ましくない結果であった場合にはその行動は弱められるという性質を利用し、行動の変化をさぐる試験法。

う一方のレバーを押す訓練を行った。においの有無をレバー押しで正しく判断した場合は報酬として14mgのエサ粒を与えた。不正解の場合は報酬なしで合図ランプが消えて試行終了とした。2秒後再び試行開始のランプを点灯し、次の試行を開始した。弁別訓練はコーヒーを正刺激とし、正刺激と負刺激を各50試行ずつランダムに提示した。弁別訓練は1日100試行を週5日間行った。次に、正と負の刺激に加えてチーズを導入した。コーヒーとチーズは各15試行、負刺激は30試行ランダムに提示した。最終の弁別テストとしてさらにリモネンを加え、コーヒー、チーズ、リモネンを各10試行、負刺激を30試行ランダムに提示し、実験を終了した。正答率が連続して2日間75%になった時点を実験終了の基準とした。

2) 結果

図36に、弁別訓練 (A)、カテゴリー学習訓練 (B) および弁別テスト (C) の結果を示した。左からコーヒーとにおいなしの弁別訓練、次の19日間でコーヒーおよびチーズのカテゴリー学習訓練、最終の9日間でリモネンの弁別テストにおける正答率を示している。弁別訓練では基準 (2日連続で75%以上の正答率) を満たすまで

に8日間を要した。訓練の初日と最終日 ($p=0.026$) および2日目と最終日 ($p=0.041$) 正答率に有意差が認められた。弁別訓練の2日までの正答率は50%であり、弁別が成立していないため正と負刺激に対応するレバーを区別せずに押している。その後、4日目には正答率が75%に達し、急激に弁別が成立しつつあることが示唆される。ラットを使ったGo-NoGo法⁵によるにおいの弁別実験においても、1日80試行を行った4日目から正答率が上昇している。

においに対する弁別学習の成立には、一定の試行数を必要とし、その後急速に弁別学習が成立する経過が考えられる。次に新奇な刺激としてチーズを提示したところ、正答率が減少し、再び基準に達するまでに19日間を要した。この結果は、単純な2種類の弁別とカテゴリー学習の成立過程が異なり、カテゴリー学習においては徐々に新奇刺激を“においあり”としてカテゴリー化していく経過が予想される。しかしながら、最終的にはチーズに対しても“においあり”レバーを押すようになり、においを刺激とするマウスのカテゴリー学習が成立したといえる。次のリモネンの弁別テストは、9日間で弁別学習が成立し、この結果は、カテゴリー学習がいったん成立

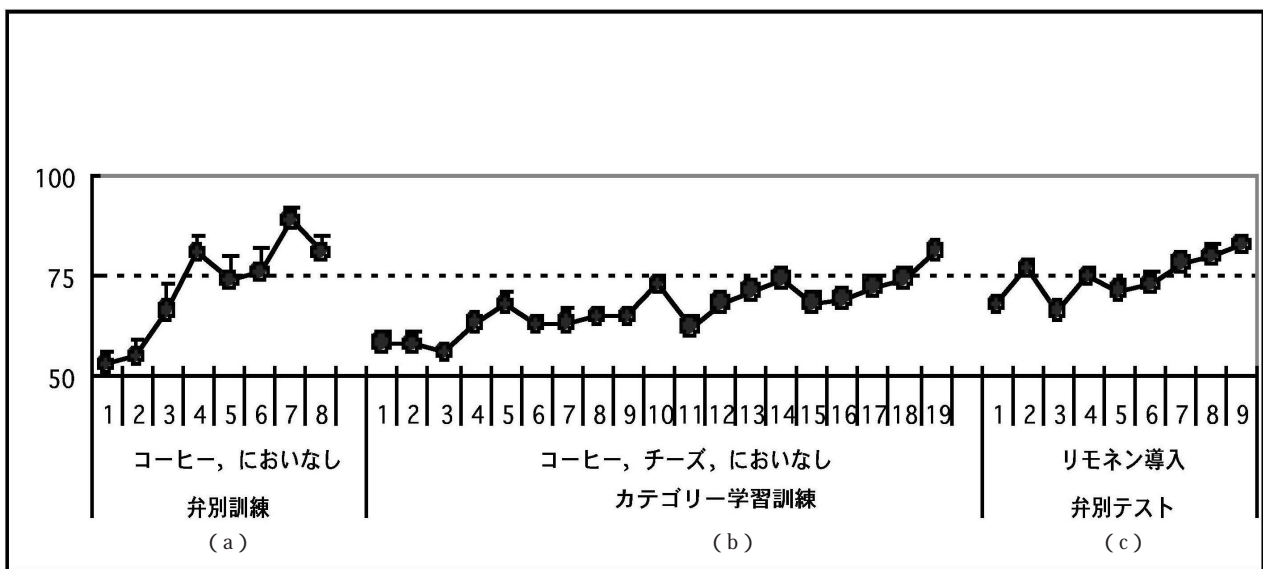


図36 コーヒー、チーズを用いた弁別・カテゴリー訓練およびリモネン弁別テストにおける正答率
 コーヒーとにおいなし弁別訓練 (a)、コーヒーおよびチーズのカテゴリー学習訓練 (b) およ
 びリモネンを導入したコーヒー、チーズ、リモネンの弁別テスト (c) の正答率。1セッションの
 値は、各動物の正答率の平均 ± 標準誤差を示す。

⁵ 2種類の刺激を提示し、ある刺激のときにはレバーやボタンに対して反応する (Go反応) ことを要求し、正解すれば報酬としてエサを与える。もう一方の刺激を提示したときには、反応をしない (NoGo反応) ことを要求する。通常NoGo反応に対しては正解であっても報酬は与えない。刺激によって動物が反応する (Go) か反応しない (NoGo) かで、行動を評価する手法。

すればたとえ新奇な刺激が加えられても単純な弁別学習とほぼ同じ長さで弁別が可能になることを示唆するものである。

図37は、弁別テストに使用されたにおい刺激（コーヒー、チーズ、リモネン、においなし）の個別の正答率を示している。個別の正答率は、弁別テストのもとの（個別のにおい刺激に対する正答数）÷（そのにおい刺激の提示回数）×100で算出した。チーズは、弁別テストの9日間全てにおいて、また、コーヒーも初日を除く全てにおいて75%の正答率を示した。一方、リモネンは単純な弁別訓練と同じ日数で弁別が成立しているものの、テスト3、5、6日目の正答率はコーヒーおよびチーズよりも有意に低く（ $p < 0.05$ ）、ゆっくりとした学習過程を示した。“においなし”刺激は弁別テストの4、5日目の正答率がコーヒーおよびチーズの正答率よりも有意に低くなった（ $p < 0.05$ ）。「弁別する刺激がない」ときに反応を喚起させることは動物実験では非常に難しいこととされており、今回負刺激に対する正答率がほかの刺激と比べて低いことも同様の状況であると思われる。弁別テストにおいては、新奇刺激であるリモネンに対し“においなし”という誤反応が生じるだけでなく、“においなし”についても“においあり”のレバーを押す間違いが生じていた。また、いったんリモネンを“においあり”とカテゴリー化すると“においなし”の反応も続いて安定する現象が認められた。以上の結果から、一般的なにおい混合物で弁別訓練を行ったマウスは、単一のにおい物質に対しても比較的短時間で弁別できるようになることがわかった。

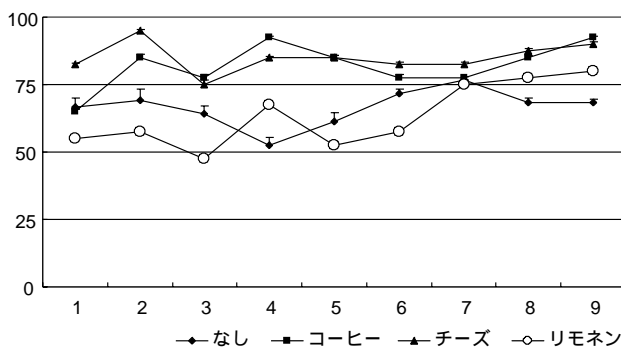


図37 弁別テストにおける各刺激の正答率
4種類のにおい刺激（コーヒー、チーズ、リモネン、においなし）の弁別テストでの正答率。それぞれのにおい刺激の1セッションの値は、各動物の正答率の平均±標準誤差を示す。

(3) *In vivo* マイクロダイアリス（微量透析）法を用いた神経伝達物質評価手法

トルエンは記憶機能に影響する神経毒性を生じる化学物質の1つである。学習行動は非常に面白い高次脳機能で、海馬は学習と記憶に重要な脳の領域の1つであり、神経伝達物質のグルタミン酸塩は、学習と記憶には不可欠である。そこで、本研究の目的は、海馬における神経伝達物質であるグルタミン酸を測定するため *in vivo* マイクロダイアリス法をマウスモデルで確立することである。

8週齢のBALB/c雄マウスに、麻酔下で、海馬にガイドカニューレを植え込み、ダイアリスするまでに、stylet（ダミープローブ）を入れておいた。測定日には、styletをマイクロダイアリスプローブに交換し、ポンプからartificial cerebrospinal fluid（人工脳脊髄液）を流した。3時間の安定後還流液を30分ごとに採集した。そして、正常マウスにトルエン（150, 300 mg/kg）を腹腔内投与し、海馬内灌流液を採集し、グルタミン酸産生についてHPLC法で測定した。

その結果、トルエンの腹腔内投与30分後にマウスの海馬におけるグルタミン酸のレベルの急速な増加が認められた（図38）。また、他のアミノ酸神経伝達物質の測定で、GABAとグリシンでは変動がみられなかったが、タウリンのレベルの増加が認められた。

鼻部曝露、あるいは全身曝露装置と *in vivo* マイクロダイアリス法を組み合わせることにより、リアルタイム

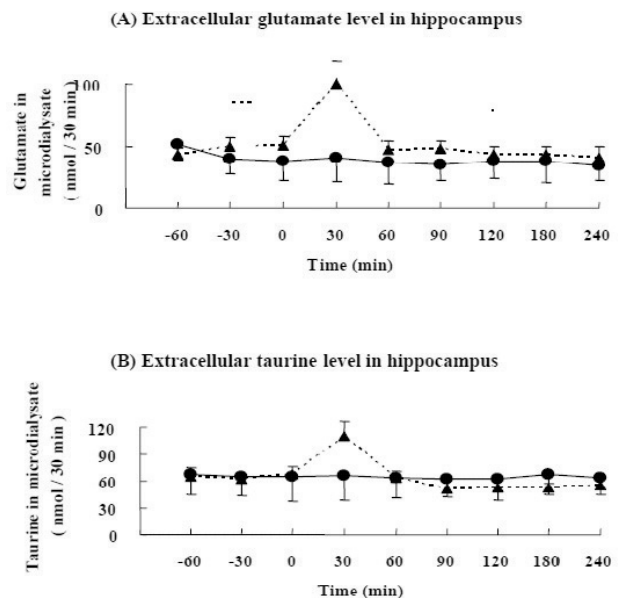


図38 トルエン投与による海馬内のグルタミン酸(A)とタウリン(B)の増加

で海馬における神経伝達物質の動きと化学物質の曝露による体内動態との関連、繰り返し曝露や連続曝露での神経伝達物質の動き、あるいは、情報伝達回路との関連について新たな知見を提供できると考える。

In vivo マイクロダイアリシス法は、先のSPMEと組み合わせると生きたままリアルタイムの神経伝達物質の動きと化学物質の体内の濃度とを測定でき、化学物質の濃度と神経伝達の情報の動きとの関連を解析する上で新たな手法として展開できる。

2.4 まとめと今後の展開

本特別研究により以下のことが明らかとなった。

- ・海馬における興奮性アミノ酸の神経伝達回路は、シナプスの可塑性、記憶・学習機能、細胞生存などに重要な役割を果たしており、中でもNMDA受容体サブユニットであるNR2AとNR2Bの機能は学習行動やシナプスの長期増強に密接に関連している。低濃度ホルムアルデヒド曝露の結果、海馬におけるNMDA受容体サブユニットの発現が有意に増加することを明らかにした。さらに、アレルギーモデルマウスにホルムアルデヒド曝露を行った結果、OVAの刺激単独でも、NR2A mRNAの発現増強に働くことが明らかとなった。一方、ドーパミンの受容体であるD1とD2 mRNAの発現では、ともに曝露による有意な増加を明らかにした。したがって、ホルムアルデヒド曝露により海馬におけるNR2A、D1とD2 mRNAの発現に変化がみられたことは、低濃度、長期のホルムアルデヒド曝露が恒常的な記憶形成機構に変調を生じた可能性を示唆している。
- ・低濃度ホルムアルデヒド曝露による嗅細胞からの情報伝達系である嗅球、扁桃体でのGABAニューロンの活性化、ドーパミンニューロン系への作用を明らかにした。また、海馬からの情報交換の場でもありストレス応答領域である視床下部において、ホルムアルデヒド曝露がそのホルモン情報伝達にもかく乱を生じることを明らかにした。これらの結果は、嗅覚からの化学物質曝露による刺激反応が、神経伝達物質を介した情報伝達系を修飾して扁桃体、海馬、視床下部などの大脳辺縁系に影響を及ぼし、また、海馬からの扁桃体と視床下部への情報伝達が修飾され、記憶情報回路にかく乱作用を生じている可能性を示唆している。

- ・低濃度のトルエンの長期曝露は、マウス海馬でNMDA受容体サブユニットNR2Bの発現増強を介して細胞内情報伝達網のアップレギュレーションを引き起こすことを明らかにした。
- ・低濃度長期のホルムアルデヒド、あるいはトルエンの曝露は、そのみで免疫記憶系の情報伝達や抗体産生機能には顕著なかく乱作用を示さなかったが、抗原刺激の付加による神経成長因子の産生においては異なる組織で変動を認め、神経免疫ネットワークのかく乱作用を誘導していることが明らかとなった。さらに、低濃度のトルエン鼻部曝露は、抗原刺激が加わると免疫記憶の産物であるTh2タイプ優位の抗体産生を増強することを明らかにした。
- ・揮発性化学物質の体内動態に関して、SPMEを用いて脳内での揮発性物質を簡便に、短時間で検知する手法を開発できた。同時に、生存している個体の脳内での神経伝達物質の変動の検知にも成功した。また、揮発性化学物質のにおいを弁別するマウス行動モデルが作成できた。

以上の成果から、低濃度におけるホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露は曝露期間の長期化により嗅覚からの情報伝達回路を介して海馬の記憶にかかわる機能分子の活性化をみちびき、ストレス反応系としての視床下部、下垂体でのホルモン分泌系のかく乱を生じると考えられ、動物の学習・行動にもなんらかの変化がもたらされている可能性が考えられる。

本研究で、これまで報告の見られていない低濃度のホルムアルデヒド、あるいはトルエンの曝露によりその情報伝達の経路、および情報の蓄積について解析した結果、神経免疫軸で記憶機能のかく乱作用が認められたので、このメカニズムの解明や明らかになった影響指標を用いたヒトでの健康リスク評価に結びつけるための感受性要因についての研究が今後は重要と考える。さらに、免疫系の刺激が神経系の海馬や視床下部での機能に影響する情報を伝えることが明らかになったことから、環境中の生物因子と化学物質とがストレスとして増悪影響を及ぼす研究を進展させる必要性が考えられる。

においに関する動物行動モデル作成に時間がかかり、モデルでのにおい閾値の検証はできなかったが、低濃度曝露の学習行動への影響の検証は今後必要と考える。脳内での化学物質による情報伝達のかく乱が、どのように

学習・行動に結びつくかヒトへの影響を評価する上でも貴重な知見が得られる可能性があり興味ある研究課題である。

化学物質の体内動態，とくに吸入曝露による動態を調べる上で，これまで困難であった揮発性の化学物質を簡便にとらえる方法が開発できたことから，ヒトへの応用についてもさらにこの分野の研究を展開すべきと考えている。

謝辞

本特別研究の実施は，研究の全般でご指導いただきま

した客員研究員の先生方，全身曝露実験でお世話になりました産業医科大学産業保健学部の先生方，動物実験でご協力いただきました動物棟運営担当幹事，アニマルケア（株）など多くの方々のご協力とご支援により遂行できました。また，実際の実験補助やデータのまとめでは清水幸代氏，大西薫氏，村上幸世氏，横田暁美氏にご協力いただきました。ここに，心より感謝の意を表します。

[資 料]

研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織（当時）

[A 研究担当者]

環境健康研究領域

生体防御研究室

藤巻秀和

山元昭二

黒河佳香

塚原伸治

掛山正心（平成15，16年度）

NIESポスドクフェロー

北條理恵子

Tin-Tin-Win-Shwe

NIES アシスタントフェロー

Ahmed Sohel（平成17年度）

循環型社会形成推進・廃棄物研究センター

循環技術システム研究開発室

後藤純雄

中島大介

NIESポスドクフェロー

江副優香（平成15，16年度）

PM2.5・DEP研究プロジェクト

毒性影響評価研究チーム

古山昭子

[B 所外協力者]

市川眞澄（東京都神経科学総合研究所）（平成15～17年度）

林 洋（東京都神経科学総合研究所）（平成15～17年度）

佐々木文彦（大阪府立大学大学院）（平成15～17年度）

嵐谷奎一（産業医科大学）（平成15～17年度）

保利 一（産業医科大学）（平成15～17年度）

樺田尚樹（産業医科大学）（平成15～17年度）

笛田由紀子（産業医科大学）（平成15～17年度）

[C 客員研究員]

市川眞澄（東京都神経科学総合研究所）（平成15～17年度）

長谷川眞紀（国立病院機構相模原病院）（平成15～17年度）

坂部 貢（北里大学薬学部）（平成15～17年度）

嵐谷奎一（産業医科大学）（平成15～17年度）

掛山正心（東京大学医学部）（平成17年度）

2 研究課題と担当者（客員研究員）

（1）脳・神経系における化学物質の影響解析および評価手法の開発

黒河佳香・塚原伸治・掛山正心

（2）免疫系における化学物質の影響解析および評価手法の開発

藤巻秀和・山元昭二・古山昭子

（3）体内動態評価

後藤純雄・中島大介

研究成果発表一覧

1 誌上发表

発表者・題目・掲載誌・巻(号)・頁・刊年

- 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*, 11: 373-375, 2004
- 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, *Toxicol.*, 197: 1-13, 2004
- Fujimaki H., Kurokawa Y.: Diesel exhaust-associated gas components enhance chemokine production by cervical lymph-node cells from mice immunized with sugi basic proteins, *Inhal. Toxicol.*, 16: 61-65, 2004
- Goto S., Asada S., Fushiwaki Y., Mori Y., Tanaka N., Umeda M., Nakajima D., Takeda K.: Tumor-promoting activity and mutagenicity of 5 termiticide compounds, *J. UOEH*, 26(4): 423-430, 2004
- Hayashi H., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., Ichikawa M.: Long-term exposure to low levels of formaldehyde increases the number of tyrosine hydroxylase-immunopositive periglomerular cells in mouse main olfactory bulb, *Brain Res.*, 1007: 192-197, 2004
- Sari D.K., Kuwahara S., Tsukamoto Y., Hori H., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., Sasaki F.: Effect of prolonged exposure to low concentrations of formaldehyde on the corticotrophin releasing hormone neurons in the hypothalamus and adrenocorticotrophic hormone cells in the pituitary gland in female mice, *Brain Res.*, 1013: 107-116, 2004
- 中島大介, 鈴木香織, 後藤純雄, 矢島博文, 石井忠浩, 吉澤秀治, 渡辺征夫, 酒井伸一: 混合揮発性有機化合物 (VOC) の吸着能に及ぼす木炭の炭化温度の影響, *室内環境学会誌*, 8(1): 9-14, 2005
- Tsuji K., Fushiwaki Y., Mori Y., Arashidani K., Nakajima D., Fujimaki H., Goto S.: Simultaneous analysis of termiticides in indoor air by using gas chromatography mass spectrometry, *J. UOEH*, 27(2): 151-160, 2005
- 中島大介, 後藤純雄, 藤巻秀和: II環境アレルゲン等の環境因子モニタリング法の現状と将来 3)生物由来以外の環境アレルゲン汚染の指標とそのモニタリング法の現状と将来展望, *アレルギー・免疫*, 12: 52-59, 2005
- Fujimaki H., Yamamoto S., Kurokawa Y.: Effect of diesel exhaust on immune responses in C57BL/6 mice intranasally immunized with pollen antigen, *J. UOEH*, 27: 11-24, 2005
- Sari D.K., Kuwahara S., Furuya M., Tsukamoto Y., Hori H., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., Sasaki F.: Hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis in mice inhaling toluene prior to low-level long-term exposure to formaldehyde, *J. Vet. Med. Sci.*, 67: 303-309, 2005
- Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S., Kakeyama M., Kobayashi T., Fujimaki H.: Effect of intratracheal instillation of ultrafine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 209: 51-61, 2005
- Maekawa F., Fujiwara K., Tsukahara S., Yada T.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide neurons of the ventromedial hypothalamus project to the midbrain central gray, *Neuroreport*, 17: 221-224, 2006
- Nakajima D., Ishii R., Kageyama S., Onji Y., Mineki S., Morooka N., Takatori K., Goto S.: Genotoxicity of microbial volatile organic compounds, *J. Health Sci.*, 52(2): 148-153, 2006
- 塚原伸治: 下位脳幹の性差, 「脳の性分化」(編集: 山内兄人, 新井康允), 裳華房, 東京, 84-92, 2006

- Yamaguchi T., Nakajima D., Ezoe Y., Fujimaki H., Shimada Y., Kozawa K., Arashidani K., Goto S.: Measurement of volatile organic compounds (VOCs) in new residential buildings and VOCs behavior over time, *J. UOEH*, 28: 13-27, 2006
- Sari D.K., Kuwahara S., Tsukamoto Y., Hori H., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., Sasaki F.: Effects of Subchronic Exposure to Low Concentration of Toluene on the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Gland Axis of Female Mice, *J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.*, 41: 38-43, 2006
- Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S., Ahmed S., Kakeyama M., Kobayashi T., Fujimaki H.: Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black, *Toxicol. Lett.*, 163: 153-160, 2006
- 塚原伸治, 掛山正心: 神経核形成のメカニズム (アポトーシス), 「脳の性分化」(編集: 山内兄人, 新井康允), 裳華房, 東京, 107-121, 2006
- Murayama R., Goto S., Nakajima D., Fujimaki H., Watanabe I., Arashidani K., Uchiyama I.: Measurements of exposure concentrations of benzene, toluene and xylene, and amounts of respiratory uptake, *J. UOEH*, 28: 173-183, 2006
- Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S., Kobayashi T., Fujimaki H.: Effect of ultrafine carbon black particles on lipoteichoic acid-induced early pulmonary inflammation in BALB/c mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 213: 256-266, 2006
- Nakajima D., Tin-Tin-Win-Shwe, Kakeyama M., Fujimaki H., Goto S.: Determination of toluene in brain of freely moving mice using solid-phase microextraction technique, *Neurotoxicology*, 27: 615-618, 2006
- Ahmed S., Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S., Tsukahara S., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H.: Increased hippocampal mRNA expression of neuronal synaptic plasticity related genes in mice chronically exposed to toluene at a low-level human occupational-exposure, *Neurotoxicology* (in press)
- 藤巻秀和: 環境化学物質による感染・アレルギーの修飾, 「生体防御医学事典」, 朝倉書店 (印刷中)
- Tsukahara S., Kakeyama M., Yuki T.: Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats, *J. neurobiology*, 66: 1411-1419, 2006
- Tsukahara S., Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H.: Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice, *Neuroimmunomodulation*, 13: 63-68, 2006
- 藤巻秀和, 市川真澄, 佐々木文彦, 嵐谷奎一: シックハウス症候群の発症 中枢神経と揮発性化学物質, 臨床免疫・アレルギー科, 46: 182-187, 2006
- Fujimaki H., Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Hojo R., Sato F., Kunugita N., Arashidani K.: Effect of long-term exposure to low-level toluene on airway inflammatory response in mice, *Toxicol. Lett.* (in press)
- Fujimaki H., Kurokawa Y., Yamamoto S., Satoh M.: Distinct requirements for IL-6 in airway inflammation induced by diesel exhaust in mice, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* (in press)
- Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D., Nakajima D., Ahmed S., Yamamoto S., Tsukahara S., Kakeyama M., Goto S., Fujimaki H.: Toluene induces rapid and reverse of hippocampal glutamate and taurine neurotransmitter levels in mice, *Toxicol. Lett.* (in press)
-

2 口頭発表

発表者・題目・学会等名称・開催都市名・年月

Fueta Y., Fukuda T., Kunugita N., Hori H., Arashidani K., Fujimaki H.: Chronic inhalation of formaldehyde induces disinhibition in the dentate gyrus of the mouse brain, 9th Meet. Int. Neurotoxicol. Assoc., Dresden, 2003.6

Fujimaki H., Kurokawa Y., Kakeyama M., Kunugita N., Fueta Y., Hori H., Arashidani K.: The effect of low levels formaldehyde inhalation on nerve growth factor production in the brains of mice, 9th Meet. Int. Neurotoxicol. Assoc., Dresden, 2003.6

Kunugita N., Fueta Y., Sato F., Kikuchi M., Hori H., Arashidani K., Fujimaki H.: Inhalation of very low dose of formaldehyde induces sneezing in mice, 9th Meet. Int. Neurotoxicol. Assoc., Dresden, 2003.6

Fueta Y., Natsume K., Fukunaga K., Arai J., Ogata G., Kunugita N., Hori H., Arashidani K., Fujimaki H.: Chronic inhalation of formaldehyde induces functional disturbances in the hippocampal neurons of mice, 26th Annu. Meet. Jpn. Neurosci. Soc., Nagoya, 2003.7

藤巻秀和，嵐谷奎一：化学物質過敏状態と動物モデル，第44回大気環境学会，京都，2003.9

藤巻秀和，掛山正心，黒河佳香，樺田尚樹，保利 一，嵐谷奎一：低濃度ホルムアルデヒド長期曝露による神経成長因子の変動，第44回大気環境学会，京都，2003.9

樺田尚樹，佐藤房枝，菊池 亮，笛田由紀子，保利 一，嵐谷奎一，藤巻秀和：肥満細胞欠損モデルマウスを用いた低濃度ホルムアルデヒド長期曝露影響評価，第44回大気環境学会，京都，2003.9

佐々木文彦，ドゥイ・ケスマ・サリ，保利 一，樺田尚樹，嵐谷奎一，藤巻秀和：トルエン前処置後ホルムアルデヒド長期曝露が視床下部 - 下垂体 - 副腎軸に及ぼす影響，第44回大気環境学会，京都，2003.9

林 洋，市川眞澄，樺田尚樹，保利 一，嵐谷奎一，藤巻秀和：低濃度ホルムアルデヒドの長期曝露がマウス嗅覚系に及ぼす影響について - 免疫細胞化学的解析 - ，第44回大気環境学会，京都，2003.9

Hayashi H., Ichikawa M., Arashidani K., Kunugita N., Fujimaki H.: Influence of long-term exposure to low concentrations of formaldehyde on the mice olfactory system, 74th Annu. Meet. Zool. Soc. Jpn., Hakodate, 2003.9

藤巻秀和：動物実験モデルを用いた環境化学物質の毒性評価，第10回日本免疫毒性学会，相模原，2003.9

藤巻秀和：抗原反復投与によるアレルギーモデルにおける低濃度ホルムアルデヒドの影響，第53回日本アレルギー学会，岐阜，2003.10

Dwikesuma S., Kuwahara S., Tsukamoto Y., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., Sasaki F.: The influence of hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis in mice after exposure with formaldehyde and toluene, 136th Annu. Meet. Jpn. Soc. Vet. Sci., Aomori, 2003.10

Fujimaki H., Kurokawa Y.: Changes in the production of nerve growth factor in OVA immunized mice exposed to low levels of formaldehyde, 33th Annu. Meet. Jpn. Soc. Immunol., Fukuoka, 2003.12

Kakeyama M., Kurokawa Y., Kunugita N., Yamamoto S., Hojo R., Arashidani K., Fujimaki H.: Low dose exposure to formaldehyde alters glutamate NMDA receptor mRNA expressions in the rat neocortex, 21st Int. Neurotoxicology Conf., Honolulu, 2004.2

黒河佳香，笛田由起子，嵐谷奎一，藤巻秀和：低濃度揮発性化学物質の吸入は海馬CA1シナプス伝達効率に影響を与えるか？，第81回日本生理学会大会，札幌，2004.6, Jpn. J. Physiol., 54(Suppl.) : S241

中島大介, 影山志保, 石井瑠里, 陰地義樹, 峯木 茂, 諸岡信久, 後藤純雄: 微生物の生育に伴い発生する揮発性有機化合物の検出手法の検討, 第13回環境化学討論会, 静岡, 2004.7, 同講演要旨集, 426-427

Fujimaki H., Kurokawa Y., Kakeyama M., Yamamoto S., Kunugita N., Arashidani K.: Exposure to low levels formaldehyde modulates nerve growth factor production in immunized mice, 12th Int. Congr. Immunol./ 4th Annu. Conf. FOCIS, Montreal, 2004.7, Clin. Invest. Med., 27(4): 157C

Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H.: Synergistic effect of ultrafine carbon particles on bacterial exotoxin-induced early pulmonary inflammation, 12th Int. Congr. Immunol./ 4th Annu. Conf. FOCIS, Montreal, 2004.7, Clin. Invest. Med., 27(4): 183B

中島大介, 石井瑠里, 影山志保, 陰地義樹, 峯木 茂, 諸岡信久, 後藤純雄: 糸状菌の培養に伴い発生する揮発性有機化合物 (MVOC) の検出手法, 第56回マイコトキシン研究会学術講演会, 熊本, 2004.8, 同講演集, 11

Fujimaki H., Yamamoto S., Kakeyama M., Kurokawa Y., Kunugita N., Hori H., Arashidani K.: Modulation of immune responses in mice exposed to toluene by nose-only inhalation, 7th Int. Congr. Neuroimmunol., Venice, 2004.9, J. Neuroimmunol., 154(1/2): 132

Kakeyama M., Kurokawa Y., Yamamoto S., Hojo R., Kunugita N., Hori H., Arashidani K., Fujimaki H.: Effects of exposure to formaldehyde and NO₂ on neurotransmitter-related mRNAs expression in the mouse brain, 7th Int. Congr. Neuroimmunol., Venice, 2004.9, J. Neuroimmunol., 154(1/2): 134

Tin-Tin-Win-Shwe, 山元昭二, 藤巻秀和: ナノ粒子の気管内投与によるマウスの肺及びリンパ節におけるケモカインの蛋白質産生とmRNA発現の修飾, 2004年免疫毒性・アレルギー学会 / 第11回日本免疫毒性学会総会・学術大会シンポジウム 2, 福井, 2004.9

吉澤秀治, 柴野一則, 中島大介, 後藤純雄, 小川 游: 炭化物ボードによる化学物質の吸着速度に及ぼす湿度の影響, 平成16年度日本環境管理学会・室内環境学会合同研究発表会, 東京, 2004.10, 環境の管理(52), 330-331

中島大介, 石井瑠里, 影山志保, 峯木 茂, 陰地義樹, 諸岡信久, 後藤純雄: 室内に生育する微生物から発生する揮発性有機化合物 (MVOC) の検出法, 平成16年度日本環境管理学会・室内環境学会合同研究発表会, 東京, 2004.10, 環境の管理(52), 276-277

樺田尚樹, 佐藤房枝, 石田尾徹, 笛田由起子, 保利 一, 藤巻秀和, 嵐谷奎一: マウスを用いたトルエン長期経気道曝露における影響評価, 第45回大気環境学会年会, 秋田, 2004.10, 同講演要旨集, 558

佐々木文彦, サリ・ウィウィ・ケスマ, 桑原佐知, 塚本康浩, 保利 一, 樺田尚樹, 嵐谷奎一, 藤巻秀和: トルエン長期曝露による視床下部 - 下垂体 - 副腎軸の変化, 第45回大気環境学会年会, 秋田, 2004.10, 同講演要旨集, 559

藤巻秀和, 山元昭二, 黒河佳香, 掛山正心, 樺田尚樹, 保利 一, 嵐谷奎一: 長期低濃度トルエン曝露のマウス免疫系への影響解析, 第45回大気環境学会年会, 秋田, 2004.10, 同講演要旨集, 560

市川眞澄, 林 洋, 樺田尚樹, 保利 一, 嵐谷奎一, 藤巻秀和: 長期低濃度ホルムアルデヒド曝露のマウス大脳辺縁系への影響 - 免疫細胞化学的解析 -, 第45回大気環境学会年会, 秋田, 2004.10, 同講演要旨集, 561

掛山正心, 黒河佳香, 樺田尚樹, 山元昭二, 北條理恵子, 保利 一, 嵐谷奎一, 藤巻秀和: 長期低濃度ホルムアルデヒド曝露マウスにおける海馬グルタミン酸受容体遺伝子の発現変動, 第45回大気環境学会年会, 秋田, 2004.10, 同講演要旨集, 562

Tin-Tin-Win-Shwe, 山元昭二, 藤巻秀和: マウスにおけるナノ粒子の気管内投与が自然免疫反応に及ぼす影響, 第45回大気環境学会年会, 秋田, 2004.10, 同講演要旨集, 557

藤巻秀和, 掛山正心: アレルギーモデルマウスへの低濃度ホルムアルデヒド曝露による海馬グルタミン酸受容体遺伝子の発現変動, 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 2004.12, 同学術集会記録, 106

中島大介, Tin-Tin-Win-Shwe, 掛山正心, 藤巻秀和, 後藤純雄: VOC曝露測定技術, 低濃度揮発性化学物質の生体影響に関するワークショップ, 国立環境研究所, 2005.1, 9-11

Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S., Fujimaki H.: Brain cytokine and chemokine mRNA expressions in mice intranasally instilled with ultrafine carbon black, 3rd World Congr. Immunopathol. Respir. Allergy, Pattaya, 2005.2, Int. J. Immunorehabilitation, 7(1): 30

Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H.: Synergistic effect of ultrafine carbon particles and staphylococcal cell wall components early pulmonary inflammation, 3rd World Congr. Immunopathol. Respir. Allergy, Pattaya, 2005.2, Int. J. Immunorehabilitation, 7(1): 33

Fujimaki H., Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Nakajima D., Goto S., Kunugita N., Arashidani K.: Suppression of IFN-g production in mice exposed to low level toluene, 3rd World Congr. Immunopathol. Respir. Allergy, Pattaya, 2005.2, Int. J. Immunorehabilitation, 7(1): 33-34

佐々木文彦, 市川眞澄, 嵐谷奎一, 藤巻秀和: 動物モデルを用いた病態に関する研究 とくに中枢神経と揮発性化学物質, 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム, 招待講演, 岡山, 2005.4, アレルギー, 54(3/4): 248

Fujimaki H., Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Nakajima D., Goto S.: A stimulatory role of low level toluene inhalation in a mouse model of allergy, 19th World Allergy Org. Congr., Munich, 2005.6, Allergy Clin. Immunol. Int.-J. World Allergy Org., Suppl. 1, 1

真鍋徹郎, 内田勝美, 吉澤秀治, 中島大介, 後藤純雄, 矢島博文: 木材の炭化条件と炭化物のVOC吸着能および物性について, 木質炭素学会 第3回研究発表会, 東京, 2005.6, 同講演要旨集, 39-40

中島大介, 石井瑠里, 影山志保, 峯木 茂, 陰地義樹, 諸岡信久, 後藤純雄: 微生物由来の揮発性有機化合物(MVOC)の遺伝子損傷性, 第14回環境化学討論会, 大阪, 2005.6, 同講演要旨集, 752-753

藤巻秀和, Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S., 山元昭二: 環境化学物質による感染・アレルギーの修飾, 第16回日本生体防御学会学術総会, シンポジウム招待講演, 東京, 2005.8, 同講演抄録集, 33

Tin-Tin-Win-Shwe, 山元昭二, 藤巻秀和: マウスにおけるナノ粒子の点鼻投与が神経-免疫応答に及ぼす影響, 第12回日本免疫毒性学会学術大会, 東京, 2005.9, 同講演要旨集, 73

藤巻秀和, 山元昭二, Tin-Tin-Win-Shwe, 塚原伸治, 黒河佳香, 櫻田尚樹, 嵐谷奎一: ホルムアルデヒド長期曝露における神経情報伝達阻害剤による免疫情報の修飾, 第46回大気環境学会年会, 名古屋, 2005.9, 同講演要旨集, 382

藤巻秀和, 山元昭二, Tin-Tin-Win-Shwe, 中島大介, 櫻田尚樹, 嵐谷奎一, 後藤純雄: 低濃度トルエン鼻部曝露による免疫応答の亢進, 第46回大気環境学会年会, 名古屋, 2005.9, 同講演要旨集, 383

藤巻秀和: 低濃度トルエン鼻部曝露によるアレルギー反応の増強作用, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡, 2005.9, アレルギー, 54(8/9): 1139

Fujimaki H., Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S., Nakajima D., Goto S.: Modulated CXCL12 production in mice exposed to low level toluene, Int. Cytokine Soc. Conf. 2005, Seoul, 2005.10, abstr., 69

Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S., Ahmed S., Nakajima D., Goto S., Fujimaki H.: Role of T lymphocytes in toluene-induced chemokine mRNA expression in mouse olfactory bulb, Int. Cytokine Soc. Conf. 2005, Seoul, 2005.10, abstr., 69

Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S., Fujimaki H.: Effect of ultrafine carbon particles on lipoteichoic acid-induced early pulmonary inflammation in mice, International Cytokine Society Conference 2005, Seoul, 2005.10, abstr., 117

中島大介, Tin-Tin-Win-Shwe, 掛山正心, 藤巻秀和, 後藤純雄: SPMEを用いたトルエン曝露マウスの脳内トルエンの直接検出, 平成17年度室内環境学会総会, 北九州, 2005.11, 室内環境学会誌, 8(2): 76-77

藤巻秀和: 動物モデルから見た化学物質過敏症の病態解明, 平成17年度室内環境学会総会, シンポジウム招待講演, 北九州, 2005.11, 室内環境学会誌, 8(2): 38-39

3 平成15～17年度特別研究セミナー・ワークショップ

- 1．平成15年7月14日（月） 坂部 貢（北里病院）「化学物質過敏症の現況」
- 2．平成15年7月24日（木） 長谷川真紀（国立相模原病院）「わが国のシックハウス症候群」
- 3．平成15年12月16日（火） 嵐谷奎一（産業医科大学）「化学物質による室内汚染の現状」
- 4．平成16年6月8日（火） 高橋雄二（東大大学院医学系研究科）「哺乳類嗅球における匂い分子地図」
- 5．平成16年7月13日（火） 竹内直信（東大病院耳鼻咽喉科）「ヒトの嗅覚について」
- 6．平成16年9月17日（金） 市川真澄（東京都神経科学総合研究所）「嗅覚・鋤鼻系の最新の戦略 記憶とのかかわり」
- 7．平成16年11月25日（木） 福永浩司（東北大学薬学部）「海馬の可塑性 分子メカニズム」
- 8．平成17年1月24日（月） 低濃度揮発性化学物質の生体影響に関するワークショップ（於：国立環境研究所）
所外参加者：嵐谷奎一（産業医科大学），安藤正典（武蔵野大学），白川太郎（京都大学），
長谷川真紀（国立病院機構相模原病院），柳沢幸雄（東京大学），坂部 貢（北里大学），
内山巖雄（京都大学），櫻田尚樹（産業医科大学），市川真澄（東京都神経科学総合研究所），
佐々木文彦（大阪府立大学）
- 9．平成17年9月30日（金） 10月1日（土） 特別研究検討会
環境因子と記憶メカニズムー
（於：国立大学法人東京大学大学院理学系研究科附属三崎臨海実験所）
- 10．平成18年2月28日（火）美津島 大（横浜市立大学大学院医学系研究科）
「*In vivo microdialysis*法を用いた脳機能の性差解析」

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR - 66 - 2006

平成18年12月28日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会
発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2
電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 朝日印刷株式会社
〒309-1117 茨城県筑西市向川澄82-1

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

December 2006

無断転載を禁じます