

令和 5 年 7 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15375

研究課題名(和文)低濃度2EH慢性曝露マウスを用いた特発性環境不耐症の発症機序解明

研究課題名(英文)Effect on olfactory epithelium in mice after chronic exposure to 2-ethyl-1-hexanol

研究代表者

三宅 美緒 (Miyake, Mio)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80128610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：2-エチル-1-ヘキサノール(2EH)は、シックビル症候群を引き起こす。2EHによるシックビル患者には、初期の咳や鼻の症状が発症した後に、他の化学物質にも反応する化学物質過敏症様の症状を示す人がいる。また、不定愁訴を呈するケースも報告されている。2EH慢性吸入曝露(0, 0.5, 10, 100 ppm)によって嗅覚過敏やうつ様症状を発症するのではないかと仮説を立てた。嗅覚試験では、対照群と比較して0.5 ppm曝露群では嗅覚試験のスコアが低く、100 ppm曝露群では逆に嗅覚試験のスコアが高かった。うつ症状の行動試験において、本研究の曝露濃度では2EH曝露によるうつ様行動は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質過敏症の患者では目眩、発汗異常等の自律神経症状が見られることから、自律神経系への作用や嗅覚過敏状態の持続がこの疾病に関与していると考えられる。したがって、本研究はブレークスルーをもたらし、化学物質過敏症発症の機序解明の第1歩となる蓋然性は高く、将来根本的な治療法の提案につながる。

研究成果の概要(英文)：2-ethyl-1-hexanol (2EH) is one of the causative agents of sick building syndrome. After the onset of coughing and nasal symptoms, some patients with 2EH-related sick building syndrome exhibit idiopathic environmental intolerance (known as multiple chemical sensitivity)-like symptoms that also react with other chemicals. Indefinite complaints such as fatigue and depression have also been reported in the patients. We hypothesized that chronic inhalation exposure to 2EH (0, 0.5, 10, 100 ppm) would cause hyperosmia and depression-like symptoms. Compared with the control, the score of the olfactory tests was lower in the group exposed to 0.5 ppm of 2EH, and the score was higher in the group exposed to 100 ppm of 2EH. In a behavioral test for depressive symptoms, no depression-like behavior caused by 2EH exposure was observed at the exposure concentration of this study.

研究分野：毒性病理学

キーワード：呼吸上皮化生

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の濃度指針値が未設定の揮発性有機化合物 (VOC)、2-エチル-1-ヘキサノール (2EH) の濃度がきわめて高い建物で、シックビル (シックハウス) 症状を示す事例を、連携研究者の上島らは国内で初めて報告している (Kamijima et al., 2002)。2EH によるシックハウス患者の中には、初期の咳や鼻の症状発症後 (Wieslander et al., 1999; 2010)、他の化学物質にも反応する特発性環境不耐症 (いわゆる化学物質過敏症) 様の経過をたどる人がいる。また、疲労感やうつ症状といった不定愁訴を呈するケースも存在し、嗅覚刺激が脳へ影響していることが推察されるが、この機序は明らかになっていない。

坂部らの報告によれば、化学物質過敏症の原因の半数以上はシックビル原因物質であり、他の VOC である有機溶剤が原因の例を併せると、67%を占める。空気中の化学物質は、嗅上皮を覆う粘液の中に溶け込み嗅細胞によって感知され、電気信号として、まず一次中枢である嗅球へと伝わる。その後上位中枢に伝わり、情報処理をされて臭いとして認識される。嗅球では、抑制性神経細胞が嗅覚反応の活動を調節している。また、嗅球や海馬においては、成人においても神経新生が常に行われていることが近年明らかになってきている (Eriksson et al., 1998; Magavi et al., 2000)。

我々のこれまでの研究で、2EH 吸入曝露は嗅球で抑制性神経細胞を減少させ、嗅神経の新生を攪乱する他、炎症反応性のミクログリアの増加をもたらしていることが明らかになっている。近年、このミクログリアの活性化や神経新生障害がうつ病との関連が指摘されている (Steiner et al., 2008; Aguzzi et al., 2013; Kato et al., 2013)。

したがって、2EH 吸入長期曝露が嗅覚の過剰反応と、慢性炎症と神経新生障害を介したうつ様症状発症に関係していると仮説をたて、検証した。

## 2. 研究の目的

室内環境中の 2-エチル-1-ヘキサノール (2EH) が高濃度で検出される建物で、シックビル (シックハウス) 症候群の事例が発生している。この患者の中には、特発性環境不耐症 (いわゆる化学物質過敏症) に進行するケースが存在し、うつ症状や易疲労感等の不定愁訴を呈することがある。我々は、2EH 連続曝露が嗅上皮の嗅神経とその投射先の嗅球において慢性炎症や嗅覚の抑制性細胞の減少を引き起こすこと、嗅神経の新生を攪乱することをこれまでに明らかにしてきた。慢性炎症や神経新生の傷害は近年うつ病との関連が示唆されており、この嗅覚刺激を介した脳への作

用こそが化学物質過敏症の原因である可能性が考えられる。そこで、本研究では 2EH の低濃度長期吸入曝露を行い、嗅覚過敏症状と嗅覚刺激を介した抑うつ症状の有無を行動実験、病理組織学的検討により明らかにした。

## 3. 研究の方法

(1) 低濃度 2EH 長期曝露実験の予備的検討  
ヒトが実際に曝露するような低濃度の揮発性有機化合物 (VOC) を濃度管理して実験動物に曝露することは難しく、これまでほとんど行われていない。実際に環境下で検出される 2EH は高いところで 1 ppm 程度になることが我々の共同研究で判明しているため、1 ppm を目標にした。理論濃度が 1 ppm になるようにセットした吸入曝露チャンバーから 1 日に 2 回を 5 日間 10 L アクティブサンプリングし、日内変動、日差変動 (日間変動) を検討した。日内変動は日差変動に比べて非常に小さいことが既に前回までの曝露実験で明らかになっている。サンプリングした空気は活性炭チューブに吸着させ、二硫化炭素で 2EH を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) で測定した。既にこの方法は確立しており、前回の吸入曝露実験でも用いている。

### (2) 低濃度 2EH 長期曝露実験

予備実験の結果 0, 1, 20, 150 ppm を曝露濃度の理論値として濃度設定を行った結果、実測値は、それぞれ 0, 0.5, 10, 100 ppm となったため、この設定で 2EH 吸入曝露を開始した。餌と飲料水は自由摂取とし、週に 1 度体重測定をした。

### (3) 嗅覚試験

KYNOSYS 4-Channel Olfactometer を使用して嗅覚試験を行った。2%の酢酸エチルを匂い物質とし、飲水ポート上部からランダムに発生する酢酸エチルの発生直後のみ、ポートを舐めると報酬として水が飲めることを学習させた。2EH 曝露 26 週より給水制限を行い、曝露終了後は引き続き給水制限を行いながら嗅覚試験を行った。試験には酢酸エチル 10 ppb と 0.1 ppb を用いた。

### (4) うつ症状の行動試験

曝露 26 週経過時に、直径 90cm、壁の高さ 40cm の円形のオープンフィールドの 1 か所に籠に入った初見のマウスを入れ、10 分間ソーシャルインターアクションテストを行った。また、翌週には直径 10 cm のシリンダーを用いて、水温 23℃、水面の高さ 15 cm で 6 分間強制水泳試験を行った。5 秒以上動かなかった場合に不動とみなした。いずれも SMART 3.0 ビデオ画像化行動解析装置を用いて解析した。

#### (5) 鼻腔の病理解析

曝露終了後、4%パラホルムアルデヒドでかん流固定を行い、鼻腔を摘出した。鼻腔は脱灰後、パラフィン包埋を施し、ミクロトームで厚さ5µmのパラフィン切片を作成した。鼻腔の標本は、HE染色、ボウマン腺及び杯細胞を染める高鉄ジアミン・アルシアンブルー重染色、嗅細胞及び嗅神経のマーカーであるOlfactory Marker Protein(OMP)の染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 期間中の曝露濃度の変動

実験期間の平均濃度、標準偏差は0.0±0.0(0 ppm群)、0.5±0.2(1 ppm群)、10.7±2.2(20 ppm群)、98.8±14.5 ppm(150 ppm群)であった。変動係数は20 ppm以上では20%以下であったが、1 ppmは37.6%であった。

##### (2) 2EH曝露中の体重変化

10 ppm群と100 ppm群において平均体重が2週目から対照群に比べて有意に低下していた。

##### (3) 嗅覚試験

嗅覚試験では、匂い物質として設定した酢酸エチルの濃度が10 ppbのときに2EH 0.5 ppm曝露群では嗅覚試験の結果が悪くなる傾向が、100 ppm曝露群では逆に嗅覚試験の成功率が上がる傾向が見られたが、匂い物質の濃度をさらに下げた場合にはそのような変化は見られなかった。

2EH慢性曝露による嗅上皮の減少と、100 ppm群での匂いに対する感受性の向上との乖離が観察されたが、嗅球での嗅細胞の変化を観察する必要がある。

##### (4) うつ症状の行動試験

ソーシャルインタラクションテストの結果、2EH曝露群で初見のマウスに対する無関心は10 ppm群の1匹以外見られなかった。0.5 ppm群の1匹は他の個体の3倍以上動く異常行動を示した。

強制水泳試験の結果、統計的有意差はないが2EH曝露群で不動時間に至るまでの潜時が延びる傾向が見られ、10 ppm群と100 ppm群で対照群に比べて不動回数が減少し、総不動時間は短くなっていた。この変化は濃度依存적であった。

2EH曝露によるうつ様行動は見られなかった。強制水泳試験の結果、2EH曝露群の方が対照群に比較して動いている時間が長かった原因は現時点で不明であるが、10、100 ppm群では体重が減少していたことによる浮力の低下、曝露による運動器への影響等が考えられた。

#### (5) 嗅上皮の病理組織学的解析

鼻腔天蓋部の嗅上皮には、対照群では嗅細胞のみが見られたが、2EH6ヶ月曝露により、嗅細胞の減少が見られた。嗅細胞の減少とともに呼吸上皮細胞への置換が見られ、それに伴い、ボウマン腺の減少と杯細胞の増加が見られた。これらの結果は、濃度依存적であったが、10ppmと100ppmの影響には差が見られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Miyake M, Ito Y, Sawada M, Sakai K, Suzuki H, Sakamoto T, Sawamoto K, Kamijima M. Subchronic inhalation exposure to 2-ethyl-1-hexanol impairs the mouse olfactory bulb via injury and subsequent repair of the nasal olfactory epithelium. Arch Toxicol. 2016 Aug;90(8):1949-58.

〔学会発表〕(計 3件)

三宅美緒、伊藤由起、大矢菜穂子、佐藤博貴、若山貴成、上島通浩. 2-エチル-1-ヘキサノール吸入曝露中止後のマウス嗅上皮回復の病理学的解析. 2017年5月11日~13日 第90回日本産業衛生学会 東京ビッグサイト TFTビル(東京都)

三宅美緒、伊藤由起、大矢菜穂子、佐藤博貴、若山貴成、上島通浩. 2-エチル-1-ヘキサノール慢性吸入曝露による嗅上皮の病理変化と嗅覚試験への影響. 2018年5月16日~19日 第91回日本産業衛生学会 熊本市国際交流会館(熊本市)

伊藤由起、三宅美緒、大矢菜穂子、佐藤博貴、若山貴成、上島通浩. 2-エチル-1-ヘキサノール慢性吸入曝露とうつ様行動との関係. 2018年5月16日~19日 第91回日本産業衛生学会 熊本市国際交流会館(熊本市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 美緒 (MIYAKE, Mio)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80128610

(2) 研究分担者

( 0 )

研究者番号：

(3) 連携研究者

上島 通浩 (KAMIJIMA, Michihiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80281070

坂本 龍雄 (SAKAMOTO, Tatsuo)

中京大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：60262896

伊藤 由起 (ITO, Yuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80452192

(4) 研究協力者

澤本 和延 (SAWAMOTO, Kazunobu)

澤田 雅人 (SAWADA, Masato)

大矢 菜穂子 (OYA, Naoko)

若山 貴成 (WAKAYAMA, Takanari)

佐藤 博貴 (SATO, Hirotaka)