

学 位 論 文 題 名

Effects of Styrene Exposure on Middle Latency Auditory Evoked Potentials and Glial Cells in Rat

(スチレン曝露の中潜時聴覚誘発電位およびグリア細胞に及ぼす影響)

学位論文内容の要旨

緒 言

スチレンは、重要な工業原料として、広く使用されている。スチレンは人間と動物の中枢および末梢神経系に様々な影響をもたらすことが知られている。特に、中枢神経系に及ぼす影響としては学習障害、鬱症状などが報告されている。スチレン曝露による脳幹レベルの影響は、聴性脳幹誘発電位を用いて行われているが、脳幹より上位の脳部位にいかなる障害を引き起こすかどうかはまた明らかにされていない。本研究は、中潜時聴覚誘発電位 (Middle latency auditory evoked potentials, MAEPs) を用いて、スチレン投与がラットの高次神経系に影響をおよぼすかどうかについて検討し、さらに、スチレン曝露によるラット脳細胞の変化について、免疫組織化学的方法を用いて検討した。

方 法

MAEPsの測定には雄性 6 週齢のWistar系ラットを用い、スチレン400mg/kg投与群と800mg/kg投与群及びコントロールの3群に (n=6) 分けた。

スチレンは、一日一回、週 5 日、連続 2 週間、ゾンデを用いて経口的に投与した。コントロール群には、同じ要領で生理食塩水を投与した。

MAEPs測定用電極はラットの頭蓋bregmaとlambdaの中間点正中線の右側 2 mmに、不関電極は同側の耳に、アースは正中線から右へ 2 mm、bregmaの前方 5 mmに、測定の一週間前に埋め込んだ。MAEPsは、NEUROPACK (日本光電) を用いて、1 KHz90dB(SPL)の刺激音により、500回平均加算して求めた。この波形からNo, Po, Na, Pa成分の潜時、振幅および各ピークの間隔を、スチレン投与前、投与後 1 週目、投与終了直後及び投与終了後の 2、4、6 週目に、計 6 回、計測した。

グリア細胞の測定には、6 週齢のWistar系ラット72匹を用い、スチレン投与開始後 1、2、3、4 カ月目に、400mg/kg投与群と800mg/kg投与群およびコントロール群の3群のラット各 6 匹を失血死させた後、4 % Paraformaldehydeを含むPBSによりかん流し、摘出した脳を切片の作成まで同一溶液で約24時間固定し、保存した。Microslicerで、切片を 50 ミクロンの厚さに切り出し、免疫組織化学的な方法でGFAP (Glial fibrillary acidic protein) を染色した。

統計学的解析は、それぞれの実験群の各測定時点に得られた値について、分散分析 (two-way

ANOVA, dose x time) を行い、有意差が認められたものについては、多重比較検定を行った。

結 果

スチレン投与両群の体重はコントロール群と比較して、実験の前後で有意な変化は認められなかった。

MAEPsのNo潜時では、スチレン400mg/kg投与群が、投与終了後2週目に、また、800mg/kg投与群では、投与終了後4週目にコントロール群と比較して、有意な延長が認められた ($P < 0.05$)。

Po潜時では、400mg/kgと800mg/kg投与群ともに、コントロール群と比較して投与終了後2週目に、著しい延長が認められた ($P < 0.01$)。800mg/kg投与群のPo潜時は、コントロール群と比較して、スチレン投与開始1週目に、有意な延長が認められた ($P < 0.05$)、また、400mg/kg投与群と比較して、投与終了後2週目に有意な延長が認められた ($p < 0.01$)。

Na潜時では、400mg/kg投与群が、コントロール群と比較して投与終了後2週目 ($P < 0.01$) と4週目に ($P < 0.05$) 有意な延長が認められた。800mg/kg投与群のNa潜時は、コントロール群と比較して、スチレン投与終了直後、投与終了後2、4週目に有意な延長が認められた ($P < 0.01$)、また、400mg/kg投与群と比較すると、投与終了直後 ($P < 0.01$) と投与終了後2週目に ($P < 0.05$)、有意な延長が認められた。

400mg/kg投与群のPa潜時は、コントロール群と比較して、投与終了後2週目に有意な延長が認められた。800mg/kg投与群では、コントロール群及び400mg/kg投与群と比較して、投与終了直後、投与終了後2、4、6週目にいずれも、有意な延長が認められた。

ピーク間隔の変化では、800mg/kg投与群は、スチレン投与投与終了後2週目にNo-Po間隔 ($P < 0.01$) が、終了後4週目にPo-Naの間隔 ($P < 0.01$) とNa-Pa 間隔 ($P < 0.05$) が、コントロール群および400mg/kg投与群と比較して、それぞれ有意な延長を示した。

スチレン400mg/kgおよび800mg/kg投与群のMAEPs振幅は、コントロール群と比較して、実験期間中有意な変化は認められなかった。

組織化学的な変化では、大脳皮質、海馬ともに、800mg/kgスチレン投与開始1ヶ月後のGFAPはコントロール群および400mg/kg投与群のいずれと比較しても有意な増加を示した ($p < 0.01$)。GFAPの量は、スチレン投与開始後2ヶ月目と3ヶ月目の両群において、最も多かった。海馬では4ヶ月後に回復傾向が見られ、皮質では4ヵ月後に投与両群とコントロールの間に有意差が認められた。

考 察

本研究では、スチレン暴露が、ラット中枢神経系に及ぼす影響について電気生理学的及び生化学的な検討を行った。スチレン投与後MAEPs各波の潜時と間隔が著しく延長していることが明らかとなった。MAEPsは脳幹より上位の脳活動を反映することより、スチレンがラットの高次神経系に影響をもたらすことが示唆された。MAEPs潜時の延長が、スチレン投与開始後1週目から観察されることより、MAEPsは高次神経系の機能障害を早期に検討できることが示唆される。また、MAEPsの変化に伴って、ラットの大脳皮質および海馬のグリア細胞において、スチレン投与した両群のGFAPはコントロール群と比べ増加していることより、スチレンが、脳のニューロンお

よびグリア細胞に障害を与えることが推測された。高濃度スチレン暴露が低濃度と比較して、MAEPsおよびGFAPは高濃度で著しく、さらにスチレン投与終了後2週目に最も顕著であることより、スチレン曝露量および経過時間に依存することが明らかになった。

結 論

スチレン投与により得られたMAEPs およびGFAPの結果から、スチレンがラットの高次神経系に障害を引き起こすことが明らかとなった。その変化には量影響関係が成立することが認められた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 和 雄

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 岸 玲 子

学 位 論 文 題 名

Effects of Styrene Exposure on Middle Latency Auditory Evoked Potentials and Glial Cells in Rat

(スチレン曝露の中潜時聴覚誘発電位およびグリア細胞に及ぼす影響)

本研究はスチレン投与がラットの高次神経系に及ぼす影響をおよぼすか、さらに、スチレン曝露によるラット脳細胞の変化について、中潜時聴覚誘発電位 (Middle latency auditory evoked potentials, MAEP) および免疫組織化学的方法を用いて検討した。MAEPの測定には6週齢のWistar系雄性ラットを用い、スチレン投与前、投与後1週目、投与終了直後及び投与終了後2、4、6週目に、計6回、測定を行った。スチレンは、一日一回、週5日、連続2週間、ゾンデを用いて経口的に投与した。グリア細胞の測定には、6週齢のWistar系ラット用い、スチレン投与開始後1、2、3、4カ月目に、厚さ50ミクロの切片についてGFAP (Glial fibrillary acidic protein) を免疫組織化学的方法で染色した。スチレン400mg/kg投与群のMAEPの潜時は、投与終了後2週目から、コントロール群と比較して、有意な延長が認められた。800mg/kg投与群では、コントロール群と比較して投与終了後1週目から、有意な延長が示した。ピーク間隔の変化は、800mg/kg投与群では、コントロール群および400mg/kg投与群と比較して有意な延長を示した。しかしMAEPの振幅には実験期間中スチレン投与両群ともに、コントロールと比較して有意な変化が認められなかった。組織化学的な変化では、大脳皮質、海馬ともに、800mg/kgスチレン投与開始1ヶ月後のGFAPはコントロール群および400mg/kg投与群のいずれと比較しても有意な増加を示した。また、GFAP量は、スチレン投与開始後2ヶ月目と3ヶ月目の両群において最も多く、海馬では4ヶ月後に回復傾向が見られ、大脳皮質では4カ月後に投与両群とコントロールの間に有意差が認められた。以上の結果からスチレン投与後MAEP各波の潜時と間隔が著しく延長していることが明らかとなり、MAEPは脳幹より上位の脳活動を反映することより、スチレンがラットの高次神経系に影響をもたらすことが推測された。ま

た、MAEPの変化に伴って、ラットの大脳皮質および海馬のグリア細胞において、スチレン投与両群のGFAPはコントロール群と比べ増加していることより、スチレンが脳のニューロンおよびグリア細胞に障害を与えることが推測された。さらに、高濃度スチレン暴露が低濃度と比較して、MAEPおよびGFAPの変化が著しく、また、MAEPはスチレン投与終了後2週目に最も顕著であることより、スチレンの高次神経系活動に及ぼす影響は曝露量および経過時間に依存することが明らかになった。

審査にあたって副査の長嶋教授から、スチレンのラット内耳におよぼす影響の有無、スチレンのニューロンにおよぼす影響を直接調べる方法、ミクログリアの反応、MAEPとGFAPの変化可逆性について、副査の岸教授からスチレン投与量設定の根拠、ppmへの換算値、体重に与える影響、ラットの成績のヒトへの応用の可否およびスチレンの影響の回復について質問があったが、申請者は研究結果と文献により概ね妥当な回答を行った。

本研究はスチレンの高次神経系におよぼす影響をMAEPおよびGFAPを測定することにより明らかにしたもので、これらの知見は産業中毒予防の上で重要であり、審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などを併せ、申請者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。