

#### 4. 血液生化学検査と生物学的マーカー

#### 4. 血液生化学検査と生物学的マーカー

研究協力者： 櫻田尚樹（産業医科大学・産業保健学部・保健情報科学）  
嵐谷奎一（産業医科大学・産業保健学部・第二環境管理学）  
石田尾徹（産業医科大学・産業保健学部・第一環境管理学）  
保利 一（産業医科大学・産業保健学部・第一環境管理学）

##### 1. 研究要旨

ホルムアルデヒド長期曝露による生体影響評価として、一般血液生化学検査および生物学的マーカーとして曝露マーカーである尿中代謝物測定と細胞遺伝学的マーカーのひとつである赤血球の小核発現頻度について検討した。さらに、別項(課題1-2)で述べられている視床下部・下垂体系のホルモン産生に関する研究に関連して血漿中コルチゾル濃度などを測定した。その結果、2000ppb、3ヶ月曝露を行っても、血液生化学検査としてGOT(AST), GPT(ALT), LDH, CPKに有意な変化は認めなかった。また網状赤血球頻度および網状赤血球の小核発現頻度も影響を受けなかった。ホルムアルデヒドの尿中代謝物である蟻酸の測定に関しては、今回は曝露濃度が低く十分に測定できなかった。また、血漿中のコルチゾル濃度は曝露群で増加する傾向が観察されたが、個体数を含め再検討を要すると思われた。

##### 2. 研究目的

ホルムアルデヒド長期曝露による影響を評価するひとつの指標として、一般血液生化学検査と各種生物学的マーカーについて検討した。生物学的マーカーとしては、曝露指標としてホルムアルデヒドの尿中代謝物である蟻酸の測定、細胞遺伝学的マーカーのひとつである赤血球の小核発現頻度を測定した。また、最近MCSの動物実験モデルにおいて中枢神経系パスウェイの何らかのsensitizationの関連をとらえ、血漿中コルチゾル濃度の増加が報告(Sorg et al., 2001)されているが、本実験でも同様の現象が確認されるか検討した。

##### 3. 研究方法

###### 3-1) 血液生化学検査

各群マウスを屠殺解剖時に、心腔よりヘパリン採血した後、遠心分離して得られた血漿についてGOT(AST), GPT(ALT), LDH, CPKについて測定した。

### 3-2) 網状赤血球頻度と赤血球小核頻度

各群マウスを屠殺解剖時に、心腔よりヘパリン採血し、Dertinger et. al. の報告に従い測定した。すなわち-70℃メタノールで赤血球を急速固定し、その後 FITC 標識抗トランスフェリンレセプター抗体 (抗 CD71 抗体) とヨウ化プロピジウム (PI) 液で網状赤血球中の小核を染色しフローサイトメーター FACS で解析した。末梢血赤血球のうち網状赤血球はトランスフェリンレセプターを発現しており、骨髄より末梢血に成熟する段階で脱核する赤血球のうち小核を保有するものを PI で染色することにより FACS を用いて評価した。また成熟赤血球中の小核頻度はトランスフェリンレセプターを発現しない赤血球を対象に同様に解析を行った。

### 3-3) ホルムアルデヒド尿中代謝物の蟻酸の測定

ホルムアルデヒドの代表的な尿中代謝物である蟻酸の量を測定するため、代謝チャンバーにて、尿を採取した。採取した尿中蟻酸の分析法は、尿に硫酸ジメチルを加えて蟻酸を蟻酸メチルとし、加温後直ちにヘッドスペースの空気をガスタイトシリンジに採り、ガスクロマトグラフ質量分析計で測定した。

### 3-4) 血漿中の ACTH, コルチゾル濃度の測定

心臓採血して得られた血漿について、RIA による定法で ACTH およびコルチゾル濃度を測定した。

3-5) 統計解析は一元配置分散分析により群間の相違の有無を検定した後、有意差を認める場合は、Dunnett 法により 0ppb コントロール群に対する多重比較検定を行った。

## 4. 研究結果

### 4-1) 血液生化学検査

血液生化学検査の結果は、図 1-4 にそれぞれ示すように GOT (AST), GPT (ALT), LDH, CPK いずれも、3ヶ月曝露によっても各群に有意な変化は認めなかった。

### 4-2) 赤血球頻度と赤血球小核頻度

網状赤血球頻度は、図 5 に示すように 0ppb から 2000ppb の曝露 3ヶ月間でいずれの群においても、群間に有意な相違は認めなかった。また小核試験においても、網状赤血球中の小核頻度は図 6 に示すようにいずれの群でも 0.3%前後で変化を認めなかった。赤血球の小核頻度については一元配置分散分析の結果、図 7 に示すように群間に相違を認めたが、いずれの群も 0ppb コントロール群とに有意差を認めなかった。

#### 4-3) ホルムアルデヒド尿中代謝物の蟻酸の測定

今回の方法では、曝露濃度も低く、また蟻酸のピークが十分に分離できなかったため測定ができなかった。今後さらに測定法について検討を加える必要があると考えられた。

#### 4-4) 血漿中の ACTH, コルチゾル濃度の測定

コントロール群、80ppb 群、400ppb 群、2000ppb 群の、血漿中の ACTH 濃度はそれぞれ  $10.52 \pm 1.11$ 、 $13.58 \pm 5.01$ 、 $10.80 \pm 0.68$ 、 $14.36 \pm 5.15$  (pg/ml)、コルチゾル濃度はそれぞれ  $2.88 \pm 0.47$ 、 $5.59 \pm 1.31$ 、 $4.08 \pm 1.14$ 、 $4.11 \pm 1.26$  ( $\mu$ g/dl)であった。ACTH 濃度は各群において曝露による有意な変化を認めなかったが、コルチゾル濃度は曝露群で増加する傾向を認め、特に 80ppb 群で高値を示した。ただいずれの群も今回は個体数が少なく統計的に十分検討を加えられるサンプル数でないため、今後さらに検討を要すると考えられた。

### 5. 考察

#### 5-1) 血液生化学検査

肝臓における代謝酵素を中心に血液生化学検査の相違を検討したが、全く変化を認めなかった。このことは今回の実験系で用いた 3 ヶ月という長期間曝露においてもホルムアルデヒド 2000ppb までの濃度では、少なくとも従来の中毒学的影響を及ぼすほどの曝露で無いことが示唆された。

#### 5-2) 網状赤血球頻度と赤血球小核頻度

網状赤血球頻度は、造血機能の指標として何らかの骨髄抑制等が見られる場合、早期から低下が認められる。今回の曝露では有意な変化は認めず、ホルムアルデヒド 2000ppb の吸入曝露 3 ヶ月までの影響としては、造血抑制などへの影響は全くないことが確認された。

ホルムアルデヒドは、鼻腔、副鼻腔、咽喉頭、肺の腫瘍発生などが報告され、ラットを用いた動物実験でも扁平上皮癌の発生などが報告され IARC (国際がん研究機関) の評価で 2A (人に対して恐らく発癌性がある) に分類されている。今回、生物学的マーカーのうち早期影響マーカーとして細胞遺伝学的マーカーのひとつである赤血球の小核発現頻度について検討した。網状赤血球の小核発現頻度はその分化過程から過去 24 から 48 時間程度の曝露の反映を、また赤血球における小核発現頻度はその寿命からもっと長期的な曝露の影響を評価していることになる。今回の結果から網状赤血球における小核頻度には全く相違は認めず、また成熟赤血球中の小核頻度においては群間で相違が観察されたが、量・反応関係が認められないこと、また 2000ppb においてもコントロール群と有意な相違がないことから、いずれにしても 2000ppb の 3 ヶ月間の吸入曝露では有意な影響は及ぼさないと考えられる。

### 5-3) 血漿中の ACTH, コルチゾル濃度の測定

目的にも前述したように、最近低濃度ホルムアルデヒド反復曝露が視床下部・下垂体・副腎皮質系の過敏状態を誘導しコルチゾル濃度の増加を引き起こすことが報告されている(Sorg et al., 2001)。また本実験系においても別項(課題1-2)に述べているようにホルムアルデヒドによるこのパスウェイの修飾が示唆されている。今回得られた結果はこれらの結果と符合するところであり非常に興味あるものである。しかしながら、結果の項にも述べたように、サンプル数が少ないためその解釈には慎重を要すると考えられる。今後、再実験を実施して検討を重ねていきたい。

## 6. 結論

ホルムアルデヒド 2000ppb の3ヶ月間の吸入曝露は、一般生化学検査、造血機能および変異原性試験の一種である赤血球小核試験に対して全く影響を及ぼさなかった。しかしながら、視床下部・下垂体・副腎皮質系のホルモン産生を修飾する可能性が示唆され今後の慎重な検討が必要と考えられた。

## 7. 参考文献

Dertinger SD, Torous DK, Tometsko KR., Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer.  
Mutat Res. 1996;371(3-4):283-292.

Sorg BA, Bailie TM, Tschirgi ML, Li N, Wu WR., Exposure to repeated low-level formaldehyde in rats increases basal corticosterone levels and enhances the corticosterone response to subsequent formaldehyde.  
Brain Res. 2001 ;898(2):314-20.