

7. その他の影響

7-1. 化学分析による曝露指標

研究協力者：櫻田尚樹, 嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

(1) 研究要旨

低濃度ホルムアルデヒド曝露における曝露指標の開発を目的として、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）によるマウス末梢血におけるホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度測定を試みた。末梢血をヘパリン採血した後、生理食塩水で洗浄後、蒸留水を加えて溶血したものを測定試料とした。反応試薬として cyclohexane-1,3-dione を用い蛍光検出器で測定する方法は、感度が高いがブランク値も高値を示し、サンプル調整中の汚染の可能性なども含め測定法改良の必要性が示唆された。次に 2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride (DNPH)との反応による方法を試みた。この方法では、広い濃度域において直線性を認め、検出法としての有用性が示唆された。しかしながら、本方法による測定結果はホルムアルデヒドを曝露しないコントロールから 2000ppb 曝露群までいずれも、ほぼ同様の値を示し、この程度の曝露域においては、曝露後の生体内における速やかな代謝の影響もあり、化学分析による曝露指標を得ることが困難であり、今後さらに検出方法を改良して検討を加えていく必要性が示唆された。

(2) 研究目的

低濃度のホルムアルデヒドに曝された際の曝露指標として生体試料中のホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度について高感度・簡便に測定する方法の開発を試みた。

(3) 研究方法

末梢血をヘパリン採血した後、生理食塩水で洗浄した後、CCl₄ を添加して遠心分離し debris を除去した洗浄赤血球に蒸留水を加えて溶血したものを測定試料とした。

測定法の一つとしては、図 1 に示すように感度の高い蛍光検出器を用いた Peterson ら(1987)の方法に従い、反応試薬として cyclohexane-1,3-dione を用い、酢酸アンモニウム、塩酸混合溶液中で 90°C、15 分間反応させ、氷冷下で冷却後、遠心分離した試料を HPLC サンプルとして測定した。HPLC の測定条件は、カラム：Wakosil-(II)5C18、励起波長 370nm、測定蛍光波長 450nm、移動相：水 / アセトニトリル = 70 / 30 とした。

第 2 の方法として、チャンバー内濃度評価を行ったと同様に 2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride (DNPH)との反応による方法を試みた。すなわち溶血試料と DNPH を 60°C 温浴中で 30 分間反応後、HPLC にて測定した。HPLC の測定条件は、カラム：Wakosil-(II)5C18、測定波長 360nm、移動相：0.2M 酢酸 / アセトニトリル = 35 / 65 とした。

(4) 研究結果

第 1 の cyclohexane-1,3-dione を用いた反応系における測定の結果、図 1 に示すようにホルムアルデヒド、アセトアルデヒドのピークをきれいに分離可能であり、ヒトの血液サンプルでは、飲酒量に応じ

たアセトアルデヒドの検出が出来たが、ホルムアルデヒドに関しては、ブランクにおいても大きなピークが観察され 2000ppb までの曝露の影響を評価できなかった。そのため、他の方法を試みることにした。第 2 の方法として DNPH を用いた反応系を試みた。ホルムアルデヒド、あるいはアセトアルデヒドなどのその他のアルデヒド類のピークをきれいに分離できる条件を種々に検討し、図 2 に示した方法できれいに分離できることが確認された。ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドをそれぞれ 1 µg/ml 含む溶液のクロマトグラムは図 2 のように得られた。この方法を用いてホルムアルデヒド濃度を測定すると、図に示す通り広範囲にわたって直線性を認め良好な結果が得られた。しかし、マウス血液中のホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度を測定した結果、全体で 51.1 ± 6.8 n mol/g Hb となり、ホルムアルデヒド曝露による有意な増加は検出できなかった。

(5) 結論

ホルムアルデヒドの曝露指標として末梢血におけるヘモグロビン付加体の定量を試みた。反応試薬として DNPH を用いた測定系においては、ホルムアルデヒドのピークの分離定量が可能であったが、今回用いた 2000ppb 程度までの曝露域においては、曝露後の生体内における速やかな代謝の影響もあり、化学分析による曝露指標を得ることが困難であった。今後さらに検出方法を改良して検討を加えていく必要性が示唆された。

(6) 参考文献

- 1) Peterson CM, Polizzi CM., Improved method for acetaldehyde in plasma and hemoglobin-associated acetaldehyde: results in teetotalers and alcoholics reporting for treatment. Alcohol. (1987) 4(6):477-480.

(7) Abstract

Hemoglobin-associated HCHO level in HCHO exposed mice

Naoki Kunugita, Keiichi Arashidani

School of Health Sciences, university of Occupational and Environmental Health, Japan

Blood samples of mice were centrifuged to separate plasma and erythrocyte. The erythrocyte samples were washed in normal saline and were incubated in saline overnight at 4 °C to remove the unstable adduct of aldehyde from hemoglobin. The red cells were hemolyzed with distilled water and CCl₄. Stroma were removed by centrifugation.

HCHO associated with hemoglobin was reacted with acidified 2, 4-dinitrophenyl hydrazine and was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection at 360nm.

Mean of HCHO levels in mice erythrocytes was 51.1 ± 6.8 nmol/g,Hb and the differences according to HCHO exposure concentration were not detected.

図1 HPLCによるヘモグロビン付加体の測定

1. ヘパリン採血
2. 生食で洗浄、CCl₄添加遠心してdebris除去
3. 水を加え、溶血させ試料とした。

4. Petersonら(1987)の方法に従い測定。

反応試薬：cyclohexane-1,3-dione 40mg

酢酸アンモニウム10g

濃塩酸 3.2 ml

水 30 ml

試料：反応試薬=1:1で混合、90℃、15分

HPLC条件：Wakosil-(II)5C18 (150mm x 4.6 mm, i.d)

励起波長370nm, 測定蛍光波長450nm

移動相：水：アセトニトリル = 70 : 30

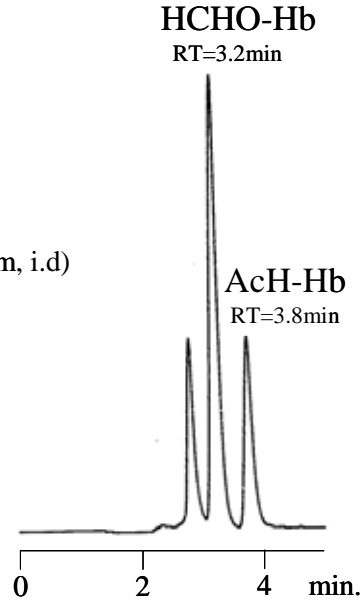
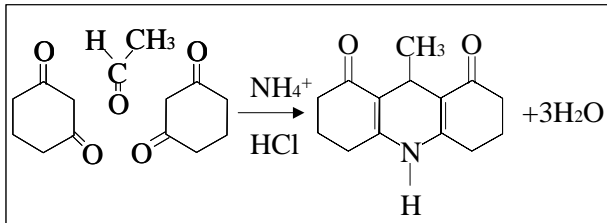


図2 HPLCによるヘモグロビン付加体の測定2

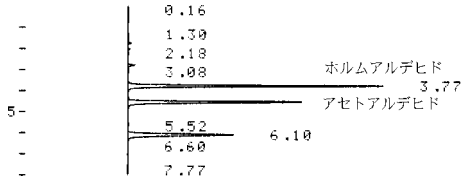
反応試薬：2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride (DNPH)

60℃、30分

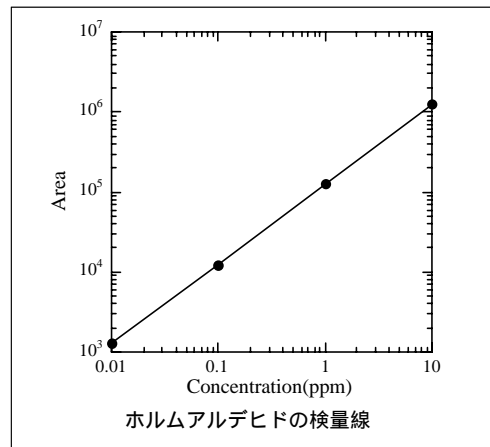
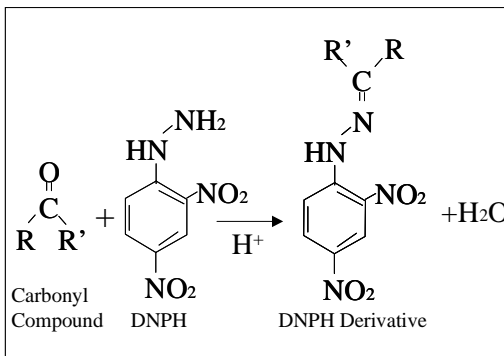
HPLC条件：Wakosil-(II)5C18

測定波長360nm,

移動相：0.2M酢酸 / アセトニトリル
= 35 / 65



結果 全体で 51.1 ± 6.8 n mol/g Hb
濃度依存性は検出できず



7 - 2 . 低濃度ホルムアルデヒド曝露によるマウス気道粘膜上皮細胞の変化と炎症細胞の動態 についての形態学的検索

研究協力者：佐藤房枝, 菊池 亮, 櫻田尚樹, 嵐谷奎一 (産業医科大学産業保健学部)

(1) 研究要旨

低濃度ホルムアルデヒド吸入曝露による病理学的変化について検討した。今回用いた最大で 2000ppb までの吸入曝露では、マウスにおいて気道粘膜上皮細胞の著明な剥離や扁平上皮化生、腫瘍変化等を生じなかった。また明らかな炎症性細胞の浸潤もなく、肥満細胞 (Mast cell) の分布にも変化はみられなかった。一方、アレルギーモデルとして作成した OVA の吸入曝露群においては、気道粘膜変化として肥満細胞の浸潤が観察されるものの、OVA とホルムアルデヒドの両者による相乗効果は光顕的に確認されなかった。

(2) 研究目的

ホルムアルデヒドの吸入毒性については、鼻腔内呼吸上皮細胞の線毛の消失や扁平上皮化生の発生などが報告されている。¹⁾²⁾

今回、マウスを用いて、低濃度ホルムアルデヒド (最大 2000ppb) の吸入曝露が気道粘膜上皮に形態学的な変化を及ぼすかどうか、また気道粘膜に浸潤する炎症性細胞の動態を特に肥満細胞 (Mast cell) の分布を中心として検討した。さらに、昨年と異なりアレルギーモデルの作成として OVA を吸入曝露により投与したが、その効果についても同様に検討した。

(3) 研究方法

1) 上気道組織の検索

マウスはネブタール麻酔下で失血死させ断頭し、頭部を 4%パラホルムアルデヒド / 0.1M 燐酸緩衝液 (pH7.4) で浸漬固定した。さらにメタノールで脱脂したのちに Plank-Rychlo 法により骨組織の脱灰をおこなった。その後、頭部を 4つ (図 1: A,B,C,D) に切り出して型どおりのパラフィン包埋をおこない、マウス 1 匹から 4 Point の頭部標本作製した。染色は HE 染色と Giemsa 染色、Toluidin blue 染色を施した。Toluidin blue 染色標本は 4 Point それぞれにおいて連続しない 3 切片を作製し、気道粘膜上皮の基底膜直下に分布する肥満細胞を計数して比較した。

2) 下気道ならびに全身性組織の検索

C3H/HeN マウス (10 週令,メス) 15 匹と系統差の検討のために C57BL マウス (10 週令,メス) 8 匹を使用した。C3H/HeN マウスは OVA 吸入曝露 + 群と - 群の 2 つに分けた。

マウスはネブタール麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド / 0.1M 燐酸緩衝液 (pH7.4) にて灌流固定後、気管・肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、心臓、腸管 (食道・胃・小腸・大腸)、卵巣、子宮膀胱を採取し、さらに同液で浸漬固定した。通常のパラフィン包埋過程により薄切標本作製し、気管・肺は HE 染色、PAS 反応、Alcian blue 染色ならびに Giemsa 染色、Toluidin blue 染色を、その他の組織は HE 染色を施した。

気管・肺の Toluidin blue 染色標本は互いに連続しない切片を用いて 1 匹のマウスより 5 枚作製し、気管上皮内ならびに気管粘膜固有層に分布する肥満細胞を計数して比較した。

(4) 研究結果

1) 上気道粘膜上皮の変化と炎症性細胞の動態

鼻腔の上皮は鼻孔から扁平上皮細胞、多列線毛円柱上皮細胞と杯細胞よりなる呼吸上皮細胞、嗅細胞へと移行する。Point.A は鼻孔の扁平上皮から呼吸上皮に移行する部位であり、Point.B では鼻甲介・顎甲介が出現して鼻腔のほとんどが呼吸上皮で覆われていた。Point.C は嗅上皮で覆われた種々の内側・外側甲介がみられ、それにより呼吸上皮の占める割合は半減していた。Point.D は喉頭へと続く咽頭呼吸器部で内腔はかなり小さくなり、粘膜は再び呼吸上皮細胞より覆われていた(写真1)。

粘膜上皮細胞には 4 Point いずれにおいても、光顕的に OVA+・OVA- とともにホルムアルデヒド曝露 0ppb と 80ppb, 400ppb, 2000ppb 間に違いはみられなかった(写真2)。粘膜固有層では、OVA+において一部に好酸球の浸潤が観察された。

肥満細胞は組織内のいたるところに分布しており、その数を厳密に比較することは難しい。今回は、C3H/HeN マウスの鼻孔から喉頭間の 4 Point において、鼻腔粘膜上皮基底膜直下に限定して肥満細胞を計数し(写真3)、4 Point それぞれにおける出現量を比較した(図2, 3, 4, 5)。出現する肥満細胞の数は個体差が大きく、また同一個体においても部位による偏在性が大きいように思われた。肥満細胞は扁平上皮細胞下ならびに呼吸上皮細胞下に多く分布する傾向があり、嗅上皮下には少なかった。統計的には Point A を除いてすべてにおいて肥満細胞数に OVA 吸入曝露の影響が推察されたが、ホルムアルデヒド吸入曝露による濃度依存的な有意差はみられなかった。

2) 下気道粘膜上皮の変化と炎症性細胞の動態

喉頭から肺にかけての連続的な組織標本を作製した(写真4)。喉頭に続く気管・気管支の内腔上皮は多列線毛上皮であり、主として線毛細胞と杯細胞からなっている。上皮細胞はさらに肺側の小葉気管支、終末細気管支となるにつれてだいにクララ細胞が優位となり肺胞へと移行する。0ppb, 80ppb, 400ppb, 2000ppb のホルムアルデヒド曝露濃度において OVA+/C3H, OVA-/C3H, OVA-/C57BL のすべてのマウスに、明らかな上皮細胞の剥離や扁平上皮化生、腫瘍性変化等は見られなかった(写真5)。しかし、OVA+ではホルムアルデヒドの曝露濃度に関係なく、気管支から末梢の終末細気管支にかけて著明な杯細胞の増生がみられた(写真6)。さらに、粘膜固有層にも好酸球ほか炎症性細胞の明らかな浸潤像は観察されなかったが、OVA+では気管上皮内に分布する肥満細胞が目立った(写真7)。

気管に分布する肥満細胞を上皮内と上皮下の粘膜固有層に分けて計数し、それぞれを上皮下の軟骨数で割った数値を出現頻度として表した(図6, 7)。統計的に、肥満細胞の出現頻度は各濃度のホルムアルデヒド曝露間では有意差がなかったが、OVA+では肥満細胞の数が有意に増加し、特に上皮内での増加が顕著であった。

C3H/HeN と C57BL の肥満細胞の分布を比較すると、C3H/HeN は粘膜固有層に C57BL では上皮内に多い傾向がみられた。

3) その他の組織所見

気道のほか、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、心臓、腸管（食道・胃・小腸・大腸）、卵巣、子宮、膀胱の各組織を比較検討したが、OVA+/C3H, OVA - /C3H, OVA - /C57BL のいずれにおいても、各濃度のホルムアルデヒド曝露間でこれら組織に光顯的な差は認められなかった。

(5) 考察

ホルムアルデヒドの吸入毒性は形態学的にも検討されており、気道上皮細胞の剥離・変性・増生や扁平上皮化生、扁平上皮癌の発生等が報告されている。Kerns ら³⁾はラットならびにマウスをもちいて吸入曝露（2ppm - 14.3ppm, 6hr/day, 5day/week, 24month）をおこない、上気道と気管上部の形態学的変化を観察している。彼らはホルムアルデヒドの曝露によりマウスの呼吸上皮に炎症、異形成、扁平上皮化生の変化がみられたが、これら所見は 14.3ppm 濃度で 12 month 以上曝露したマウスに生じ、2ppm 濃度では 24month 曝露してもごく少数に鼻炎をともなったマウスがいた他はほとんど変化がみられなかったとしている。また、Kamata ら²⁾はラットをもちいて吸入曝露（0.3 - 15ppm, 6hr/day, 5day/week, 28month）による形態学的変化について検討しており、鼻腔において炎症細胞の浸潤、びらん、浮腫は対照群とともに散発してみられ、曝露群では過形成、過角化、扁平上皮化生がいずれも 12month 以降に観察され、扁平上皮癌は 15ppm 濃度でのみにみられたと報告している。

今回のホルムアルデヒドの吸入曝露（0.08ppm - 2ppm, 16hr/day, 5day/week, 3month）では、鼻腔・気管・肺において組織学的な変化を認めなかったが、これらの結果は Kerns らや Kamata らの報告とも一致するものである。

OVA の吸入曝露は、喘息等のアレルギー性気道炎症の実験モデル作製にもちいられる。

肥満細胞は、喘息やアトピー性湿疹などの即時型アレルギー反応を誘起する細胞として知られている。骨髄前駆細胞より分化成熟するが、分化の度合いの違いと形態的・薬理的違いから血管周囲に多い結合組織内肥満細胞（CTMC: connective tissue mast cell）と寄生虫感染等で増加する T 細胞依存性の粘膜内肥満細胞（MMC: mucosal mast cell）に分けられている。ともにヒスタミンを含有する顆粒を有し、それらの脱顆粒によって肺の気管支収縮や粘膜浮腫、分泌亢進のアレルギー症状が生じるとされている。

鼻腔粘膜上皮ならびに気管に分布する肥満細胞の計数結果より、OVA 吸入曝露による肥満細胞の増加はみられたが、今回の低濃度ホルムアルデヒド曝露による肥満細胞の数的変化はみられなかった。

(6) 結論

今回の低濃度ホルムアルデヒド（最大 2000ppb）の吸入曝露では、マウスにおいて気道粘膜上皮細胞の著明な剥離や扁平上皮化生、腫瘍変化等を生じなかった。また明らかな炎症性細胞の浸潤もなく、肥満細胞（Mast cell）の分布にも変化はみられなかった。さらに、OVA の吸入曝露による気道粘膜変化は観察されものの、OVA とホルムアルデヒドの両者による相乗効果は光顯的に確認されなかった。

(7) 参考文献

- 1) Kamata E et al. Results of a 28-month chronic inhalation toxicity study of formaldehyde in male Fisher-344 rat. J Toxicol Sci 1997;22(3):239-254

- 2) 亀井英夫 他 . ホルムアルデヒドの気管組織に対する作用の毒性学的研究 . 衛生化学
1981,27(6)356-362
- 3) William D.Kerns et al . Carcinogenicity of Formaldehyde in Rats and Mice after Long-Term
Inhalation Exposure .
Cancer Research 1983;43:4382-4392

(8) Abstract

Histopathological changes of the respiratory systems after repeated formaldehyde exposure in mice

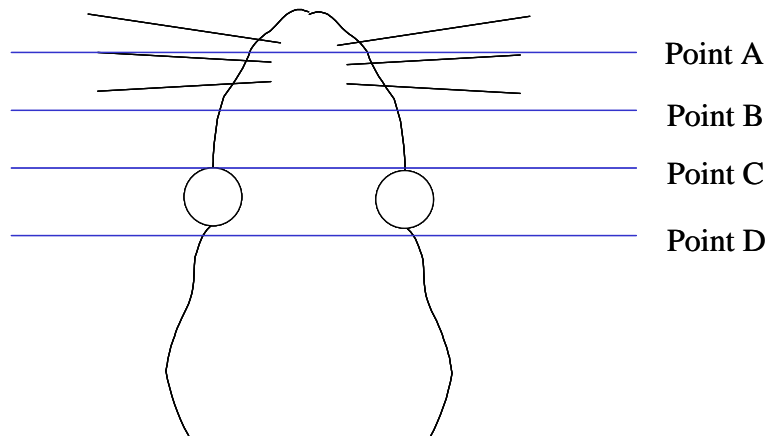
Fusae Sato, Makoto Kikuchi, Naoki Kunugita, Keiichi Arashidani

School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan.

To study the effect of repeated formaldehyde exposure on respiratory systems, histopathological exchange of the lung and trachea has been observed in mice. After the end of the exposure, formaldehyde exposure did not show any adverse effects including epithelial cell proliferation, epithelial dysplasia and squamous metaplasia on morphology of the lung and trachea under light microscope and electron microscope. We also evaluated infiltration of mast cells in nasal and tracheal epithelium. There was a mild infiltration of mast cells in the groups of mice previously sensitized with OVA compared to the mice exposed formaldehyde alone. However, infiltration of mast cell was independent of the formaldehyde exposure. There were also no significant exchanges in the lever, kidney, spleen, thymus, and intestine. These results indicated that the repeated formaldehyde exposure at the dose of 2000ppb did not show any adverse effects on morphology.

病理学的検索

図1 頭部の切片作成部位



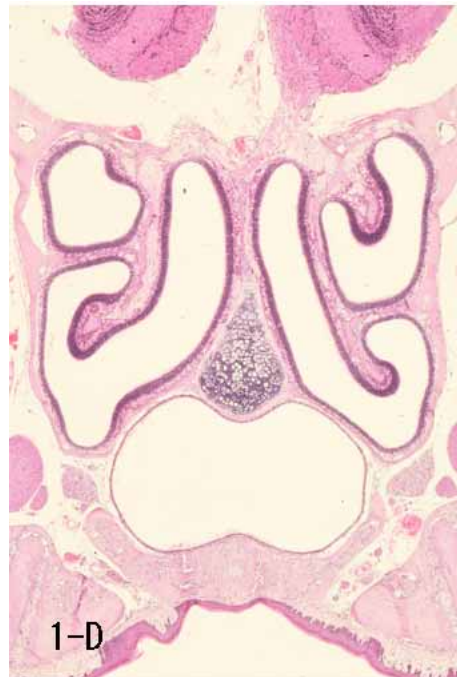
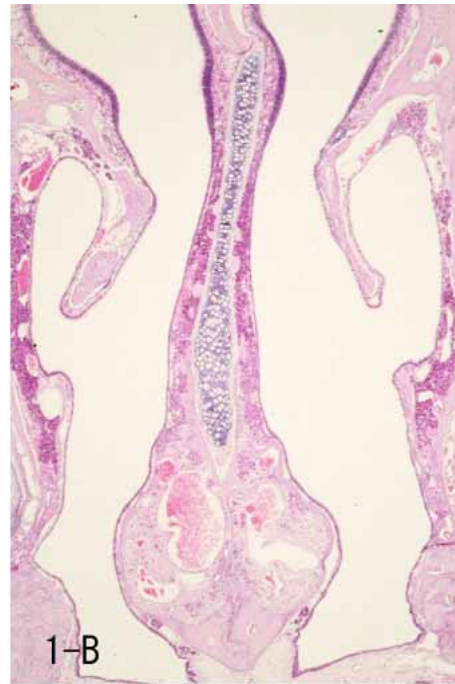
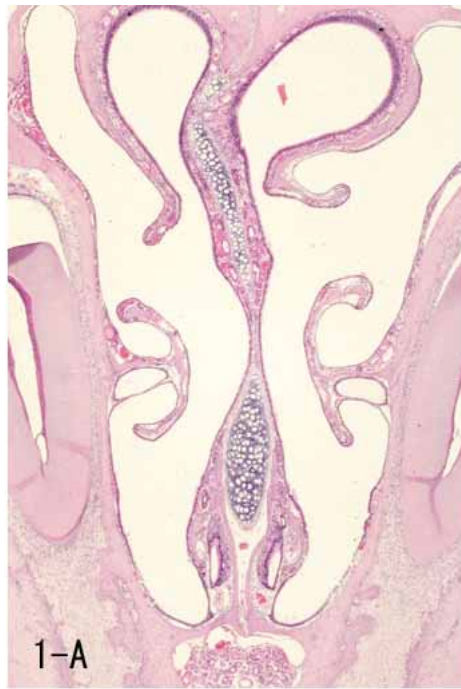


写真1 頭部 PointA,B,C,D の各鼻腔組織

(Oppb,OVA-) HE 染色 ×8

いずれも中央の上下方向に鼻中隔がみられ、鼻腔の側面からは甲介が突出している。

- 1 - A : 鼻腔の上方の一部を嗅上皮、下方を扁平上皮、残りを呼吸上皮が覆っている。
- 1 - B : 鼻腔の上方3分の1に嗅上皮がみられ、下方はすべて呼吸上皮で覆われている。
- 1 - C : 鼻腔の上方のほとんどが嗅上皮で覆われ、呼吸上皮は下方3分の1にみられる。
- 1 - D : 鼻腔のほとんどが嗅上皮で覆われ、中央部の軟骨下に咽頭呼吸部が分かれた腔としてみられる。