

7. 行動毒性における研究成果

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

これまでの研究において、ホルムアルデヒド低濃度経気道曝露によりマウスにくしゃみが誘発されることを確認した。今年度は、C3H/HeN マウスにおいてトルエンを前曝露した群およびOVA感作した群、さらに肥満細胞欠損モデルマウスについてホルムアルデヒド3ヶ月曝露終了時におけるくしゃみを観察した。その結果、C3H/HeN マウスにおいては昨年までの結果同様にホルムアルデヒドの曝露濃度依存的にくしゃみの増加が観察された。また、トルエン前曝露の影響は認められなかったが、OVAを感作することにより有意にくしゃみの頻度が増加し、昨年観察されたように今年も80ppbにおいても有意なくしゃみの増加が認められた。一方、肥満細胞欠損モデルマウスにおいては、有意なくしゃみの増加は認められなかった。このことは、観察されたくしゃみに肥満細胞が関与していないことが示唆された。

（2）研究目的

低濃度ホルムアルデヒド曝露の影響として、過去2年間は、自発運動能の変化等を評価したが、ホルムアルデヒド曝露による明確な変化は観察されなかった。一方、曝露によりくしゃみの増加が観察され、定量評価を行ってきた。

今年度は、運動能に関しては、自発運動量、記憶学習に関して別項の海馬グループのところでもとめて示す。

本項では、くしゃみについて昨年度まで同様に定量評価するとともに、肥満細胞欠損モデルマウスであるW/W^vマウスについてもくしゃみの定量化を行い、くしゃみと肥満細胞の関与についても検討する。

（3）研究方法

くしゃみの定量法：3ヶ月曝露終了時点において、各マウスを一匹用個別ケージに入れ、15分間目視にてくしゃみをカウントした。

（4）結果

くしゃみの変化：

1) 濃度依存性：C3H/HeN マウスにホルムアルデヒドだけを曝露した結果では、昨年まで同様に、曝露濃度依存的なくしゃみの増加を認めた(図1)。

2) トルエン前曝露の影響：C3H/HeN マウスにおいて、トルエンを前曝露した群も、していない群もホルムアルデヒドの濃度依存的なくしゃみの増加は同様な傾向を示し、トルエン前曝露の影響は認められなかった(図2)。

3) OVA感差の影響：昨年まで同様に、OVA感作群では、非感作群に比較し、有意に高い頻度でくしゃみを認めた。とくに、OVA感作群では80ppbにおいても有意なくしゃみの増加を観察した(図3)。

4) 肥満細胞欠損モデルにおける検討：肥満細胞欠損モデルマウスであるW/W^vマウスとコン

トロール群の+/+を比較すると、W/W^v マウスの方が多い傾向を認めたが、統計的には両系統で有意差を認めなかった。しかも両群ともホルムアルデヒド 2000ppb 曝露と非曝露群で差を認めなかった(図 4)。

(5) まとめ

C3H/HeN マウスにおいては、今年度もホルムアルデヒドの曝露濃度依存的なくしゃみの増加が観察された。しかも OVA 感差群においては 80ppb という低濃度においてもくしゃみの誘発されたことは、本病態を考えていく上で意義深いものと思われる。またくしゃみの発生および抑制メカニズムに関して、肥満細胞欠損モデルマウスにおいては、有意なくしゃみの増加は認められなかった。このことは、観察されたくしゃみに肥満細胞が関与していないことが示唆された。

(6) Abstract

Sneezing after repeated formaldehyde exposure in mice

Naoki Kunugita, Keiichi Arashidani

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

We observed that frequency of sneeze in each animal. The frequency of sneeze increased dose-dependently in C3H/He mice at the end of exposure for three month. The frequency in the groups of mice previously sensitized with OVA is significantly high in comparison with non-sensitized mice. On the other hand, there were no significant increase of sneeze in mast cell deficient WBB6F1-W/W^v and unaffected WBB6F1-+/+ mice.

図1 ホルムアルデヒド曝露によるくしゃみの増加の濃度依存性

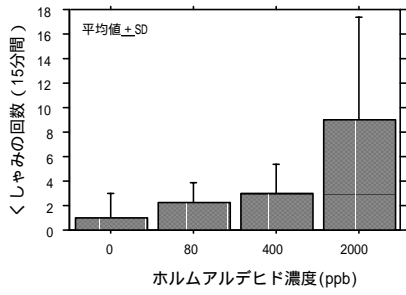


図2 トレン前処理マウスの曝露終了時点でのくしゃみの回数

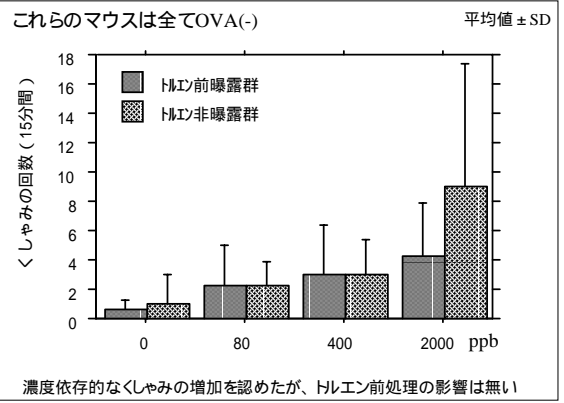


図3 OVA感作処理マウスの曝露終了時点でのくしゃみの回数

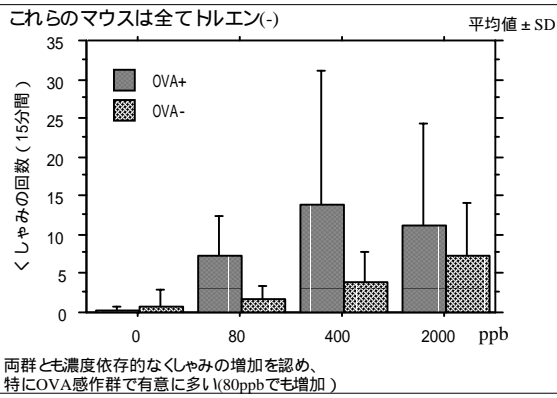
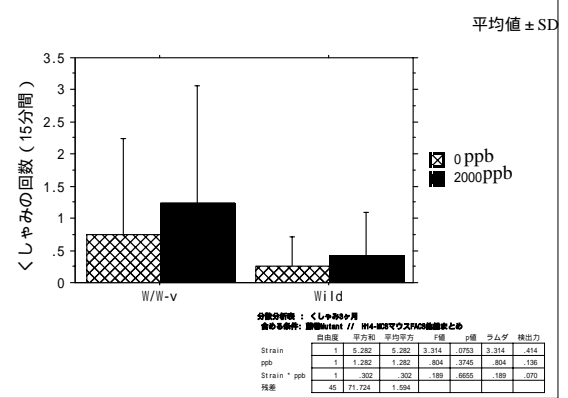


図4 肥満細胞モデルマウスの曝露終了時点でのくしゃみの回数



8. 化学分析における成果

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

今年度新たに用いた肥満細胞欠損モデルマウス W/W^v において強度の皮膚病変を呈したため、マウスの飲料水などにホルムアルデヒド以外の揮発性有機溶剤 VOCs などの混入を含め水質に異常がないか検討した。その結果、測定したクロロホルムは日本の環境基準の約 1/10、トリクロロエチレンは検出限界以下と低値であった。マウスの飲料水中の残留塩素濃度は、水道法の水質基準をみたしており、かつ北九州市水道局水質検査結果と同程度であった。また、以前から試みているバイオマーカーの検索としてホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体の測定法の改良や、今年度は新たに酸化ストレスの代表的マーカーである尿中 8-OHdG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン) の ELISA 法による測定を試みた。しかし、2000ppb までの濃度では、これらに曝露の影響を認められなかった。

（2）研究目的

今年度実験で、別項に述べたように W/W^v マウスにおいて強度の皮膚病変を呈したが、ホルムアルデヒド曝露以外に飲料水中の各種 VOCs 類（クロロホルム、トリクロロエチレン）などの影響が無いか検討した。さらに、ホルムアルデヒド曝露によるバイオマーカーを検討するひとつとして、昨年に引き続きホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体（以下 HCHO-Hb 付加体）の検討を行った。加えて、ホルムアルデヒド曝露による生体影響として酸化ストレスが加わっていないかを検討するために、酸化ストレスの代表的マーカーである尿中 8-OHdG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン) を ELISA 法で測定した。

（3）研究方法

1) 飲料水の分析

マウスの飲料水中のクロロホルム、トリクロロエチレン分析

衛生試験法・注解 2000（日本薬学会）に添って行った。すなわち、マウス給水用水道水をバイアル瓶に 5ml 採取、塩化ナトリウム（純度 99%）1.5g 添加し、よく混合溶解した後（NaCl の添加は、塩類濃度の違いによる測定値の変動を防ぐためである）、25℃ の恒温槽で 30 分静置したものを測定試料とした（5 本）。検量線用のサンプルは、純度 99% のクロロホルム及びトリクロロエチレンをそれぞれ 100mg 秤量し、メタノール（精密分析用）で 100ml にメスアップして 1mg/ml の Mix STD を調整した。それを希釈し、100 µg/ml、200 µg/ml、300 µg/ml を作成した。試料調整同様に 蒸留水 5ml+NaCl に各々の希釈液を 1 µl 入れ、20ng/ml、40ng/ml、60ng/ml の標準液を作成した（絶対検量線）。これらをヘッドスペース・ガスクロマトグラフィー質量分析法により分離・定量した。

マウスの飲料水中の残留塩素分析

残留塩素はジエチル-p-フェニレンジアミン(DPD)法により以下のように定量した。すなわち、
ア．器具・試薬

DPD 溶液：無水 N,N-ジエチル-p-フェニレンジアミン硫酸塩 0.11 g を水に溶かして全量が

100 mL となるようにしたものに CyDTA(1,2-シクロヘキサン-ジアミン四酢酸)0.01 g を加えて、透明ガラス瓶中に貯蔵した(冷暗所保存)

リン酸塩緩衝液: 0.2 mol/L の KH_2PO_4 溶液 50 mL, 0.2 mol/L の水酸化ナトリウム溶液 15.2 mL の割合で pH 6.5 に調整した液 100 mL に CyDTA を 0.1 g 溶かした。

標準比色液調製用 KMnO_4 溶液: KMnO_4 を $0.891 (=35.45 / (39.1 + 54.9 + 16 \times 4) / 0.253)$ g、水に溶かして全量を 1000 mL とし、原液とした。用時、これを 0.5, 1, 2, 4 mL とって水で希釈して 1 L にした溶液は、それぞれ、0.5, 1, 2, 4 mg/L の塩素水に相当する。

比色管 50 mL 容: 検量線作成時は 4 本。検水測定時は 2 本準備した。

イ. 方法

4 本の比色管にそれぞれリン酸塩緩衝液を 0.5 mL とり、DPD 溶液を 0.5 mL 加えて混和した。各濃度の「標準比色液調整用過マンガン酸カリウム溶液」を 10 mL ずつ加えて混和した。すみやかに 510 nm 付近の吸収極大における吸光度(SHIMADZU UV-2200A)を測定して検量線を作成した。

次いで、2 本の比色管にそれぞれリン酸塩緩衝液を 0.5 mL とり、DPD 溶液を 0.5 mL 加えて混和した。

それぞれに検水を 10 mL ずつ加えて混和した。

1 本の比色管についてすみやかに 510 nm 付近の吸収極大における吸光度を測定し、作成済みの検量線から遊離残留塩素濃度(mg/L)を算出した。

残りの 1 本の比色管について、KI を約 0.1 g 加えて溶解し、約 2 分間放置した。

510 nm 付近の吸収極大における吸光度を測定し、作成済みの検量線から全残留塩素濃度(mg/L)を算出した。

全残留塩素濃度と遊離残留塩素濃度との差から結合残留塩素濃度(mg/L)を算出した。

なお、水中の塩素は分子状塩素 Cl_2 、次亜塩素酸 HClO 、次亜塩素酸イオン ClO^- の 3 種類の形態をとる。これらはいずれも遊離残留塩素である。水中にアンモニア、アミン類、アミノ酸などの水素化窒素化合物が存在すると、塩素と反応して NH_2Cl 、 NHCl_2 などのクロラミンを生成する。これらのクロラミン類を結合残留塩素という。

2) HCHO-Hb 付加体測定

昨年度は付加体測定法として、誘導体を形成する試薬として DNPH (2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride) あるいは cyclohexane-1,3-dione を用いて反応させた後、HPLC で分析測定したが十分な測定ができなかった。今回、Dimedone (5,5 dimethyl 1,3cyclohexanedione) による誘導体形成を行い、HPLC-蛍光分析を試みた。

3) 尿中 8-OHdG 測定

代謝ケージで蓄尿採取した尿を ELISA キット: 8-OHdG Check(高感度)キット(日本老化制御研究所)を用いて分析した。

4) Corticosterone の測定

Corticosterone の測定は、解剖時採取した血漿を -80 度で保存した後、ICN ImmChem Double Antibody Corticosterone 125I RIA Kit for Rats and Mice を用いて、ラジオイムノアッセイ

(RIA)により測定した。

(4) 結果

1) 飲料水の分析

クロロホルム濃度は7.04ppbであり、トリクロロエチレンは検出されなかった(図1)。残留塩素は、遊離残留塩素が0.54mg/L, 総残留塩素が0.67 mg/Lであった(図2)。これらの値は北九州市水道局の給水栓における水質検査結果と合致しており、日本の水質基準値と比較しても問題ないものであった。

2) HCHO-Hb 付加体測定

図3に示すように採血した赤血球を生理食塩水で洗浄後、溶血して測定試料とした。これを図4に示すようにDimedoneを用いた誘導体形成法により比較的安定した測定法を確立できた。その結果、図5に示すようにホルムアルデヒドの良好な分離が可能で安定性の高い測定法が確立できた。しかしこの方法で一部のマウスの試料を測定したがホルムアルデヒド曝露による差は認められなかった(図6)。

3) 尿中 8-OHdG 測定

サンプル数が少ないが1~6 µg/g Creatinine程度を示した。ホルムアルデヒド曝露の影響は無かった。今後サンプル数を増やして再度検討する予定である(図7)。

4) Corticosterone の測定

C3H/HeN マウスにおけるCorticosterone濃度は、OVA感作群、あるいはトルエン前曝露群ともホルムアルデヒドの曝露濃度による変化は認めなかった(図8)。このことは、別項で述べられている視床下部-下垂体軸での鋭敏な変化に比較し、副腎での反応は比較的恒常性が保たれているものと考えられる。

(5) まとめ

飲料水の水質に関しては、特に問題は無いことが判明した。またバイオリジカルモニタリングとして、検討したHCHO-Hb付加体、尿中8-OHdGにはホルムアルデヒド曝露による差は認めなかった。これらの指標はこの程度の曝露濃度では変化しないものと考えられた。

(6) Abstract

Hemoglobin-associated HCHO level and 8-OHdG in HCHO exposed mice

Naoki Kunugita, Keiichi Arashidani

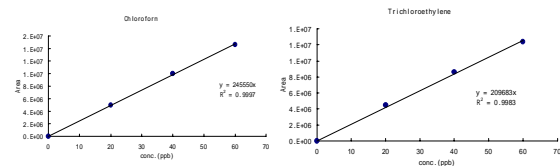
School of Health Sciences, university of Occupational and Environmental Health, Japan

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 5,5- dimethyl-1,3-cyclohexanedione and was determined by reversed-phase high- performance liquid chromatography with UV detection at 395nm and 460nm as excitation and emission wavelengths. Concentration of 8-OHdG (8-Hydroxy-2'- deoxyguanosine) was evaluated by ELISA system. In the results, there were no differences in concentration of HCHO associated with hemoglobin and 8-OHdG between the groups of mice exposed and unexposed to formaldehyde.

図1 マウス飲料水の分析 (VOCs)

飲料水中のVOCs(クロロホルム、トリクロロエチレン)分析
 —ヘッドスペース・ガスクロマトグラフィー法による定量—
 衛生試験法 注解2000 (日本薬学会)

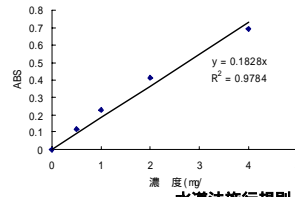


測定結果とWHOガイドライン値および日本の水質基準値との比較

	Chloroform (ppb)	Trichloroethylene (ppb)
マウス給水水道水	7.04 ± 0.22	ND
WHO	200	70
日本水質基準	60	30

図2 マウス飲料水の分析(残留塩素濃度)

マウス飲料水中の残留塩素分析
 - ジエチル-p-フェニレンジアミン(DPD)法による定量 -



水道法施行規則、北九州市水道局水質検査との比較

	遊離残留塩素	残留塩素
マウス給水水道水	0.54 ± 0.002mg/l	0.67 ± 0.004mg/l
水道法	0.1mg/l以上	
北九州市水道局水質検査結果	0.6mg/l	

図3 ヘモグロビン付加体の測定方法

ヘパリン採血

遠心分離 (2800rpm 5m n)

生理食塩水を加え、遠心分離 (2000rpm 5m n) × 3回

蒸留水で溶血、CC 4添加遠心してdebris除去

高速遠心分離 (20,000g, 4, 10m n)

誘導体試薬と反応

図4 HCHO-Hb測定方法 (in edone)

溶血させた血液
 +反応試薬
 沸騰水で反応

冷却

+酢酸添加
 高速遠心分離 (15,000rpm, 4, 10min)

HPLC

反応試薬: 5,5 dimethyl 1,3cyclohexanedione 0.15g

酢酸アンモニウム 12.5g

酢酸 0.2ml

蒸留水で50mlにメスアップ

- HPLC条件: Wakosil-II(C18) 250mm × 0.4mm, ID.
- 励起波長: 395nm, 測定蛍光波長: 460nm
- 移動相: 水/アセトニトリル = 60/40 (v/v)

図5 HCHOの検量線と標準溶液のクロマトグラム

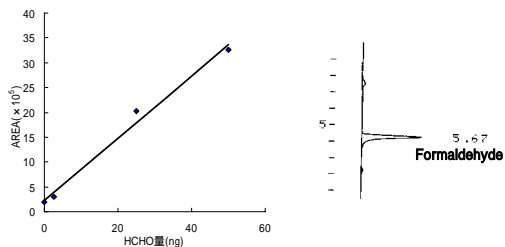


図6 血液試料のクロマトグラム



HCHO量 (μmol/g Hb)	
曝露群	1 1.7
	2 2.2
非曝露群	1 1.9
	2 2.4

図7 尿中 8-OHdG の測定

- 酸化ストレスの代表的なマーカーである尿中8-OHdG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン)をELISA法で測定
- キット 8-OHdG Check(高感度)キット
日本老化制御研究所
- 結果 :1~6 $\mu\text{g/g}$ Creatinine程度を示すが、ホルムアルデヒド曝露の影響は無さそう。今後サンプル数を増やして再度検討予定。

図8 血漿中のコルチコステロン濃度

