

Ⅲ. 研究結果報告

1. 吸入曝露装置および曝露条件

研究協力者：榎田尚樹・保利 一・嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

ホルムアルデヒドの吸入曝露は、昨年まで同様に産業医科大学・産業保健学部において行った。なお、動物実験の実施にあたっては、産業医科大学・動物実験および飼育倫理委員会に申請を行い許可を得たうえで実施した。

以下に曝露方法の概要を示す。

（1）吸入曝露装置

吸入曝露実験装置の概略図（図1）を示す。装置はホルムアルデヒドのガス発生装置と、曝露チャンバーとから構成されている。

ホルムアルデヒドガスの発生には、パラホルムアルデヒドからの昇華現象を利用したホルムアルデヒドガス発生装置(1) (Hori and Arashidani, 1997) を用いた。この装置を一定温度の室内(20) に設置し、空気を通じることにより、一定濃度のホルムアルデヒドガスを発生させた。ガスの発生量はパラホルムアルデヒドの充填量および空気流量でコントロールした。

曝露チャンバー(容積400L)(6)はステンレス製で、下部に尿・糞を廃棄処理するための容器と配管(7)が取り付けられている。また、チャンバー側面には、内部の空気をサンプリングするためのガス採取口が取り付けられている。このチャンバーの下部は常設の排ガス処理装置(9)に接続されており、ブローア(10)を用いて処理された空気を排気することにより、チャンバー上部からHEPAフィルター(8)を通した室内空気を希釈空気として導入する。ホルムアルデヒドガスを含む空気は、チャンバー上部のT字型の配管部の側面から導入され、希釈空気と混合されてチャンバー内に入る。

（2）実験動物

実験動物は、日本チャールス・リバー(株)のC3H/HeN 雌性マウスを使用し、10週齢より曝露開始した。また、一部はJackson Laboratoryより輸入した肥満細胞欠損モデルマウス(W/Wv)およびそのコントロールマウス(+/+)を用いた。このマウスは、WB系の雌で第5染色体上にW突然変異遺伝子を1つ持ったマウスとC57BL/6系の雄でWv遺伝子を1つ持ったマウスを掛け合わせて生産されたWBB6F1雌マウスである。このWBB6F1マウスには、W/Wv、W/+、Wv/+、+/+の4つの遺伝子型が出現するが、正常対照マウスとして用いたものは+/+、肥満細胞欠損マウスとして用いたものはW/Wvの遺伝子型のものである。+/+マウスは全身黒色の毛を有しているのに対し、W/Wvマウスは皮膚のメラニン細胞がないため毛は白色で貧血を有する特徴があり、肥満細胞はほとんど欠損し、卵巣には生殖細胞がないとされている(2)。この肥満細胞の欠損は前駆細胞のc-kit tyrosin kinase growth factor receptorの産生と機能の異常によるもので、生後20日では正常対照マウスの10%程度の肥満細胞を持っているが、生後100日を経過すると1%以下となり、肥満細胞欠損マウスとして用いられている(3)(図2)。

マウスは、2000ppb 曝露群、400ppb 曝露群、80ppb 曝露群およびコントロール群の 4 群に分け、曝露群には調整したホルムアルデヒドガスを、また、コントロール群には清浄空気のみを曝露した。

(3) 曝露方法

ホルムアルデヒドの吸入曝露時間は午後 6 時から翌朝 10 時までの夜間帯 16 時間とし、最大 3 ヶ月の曝露を行った(図 3)。また、曝露中は自由飲水・摂食(CE-2 日本クレシア株式会社)とした。なお曝露室の照明は午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の 12 時間サイクルとした。

(4) 曝露濃度評価

チャンバー内曝露濃度は化学分析により評価した。すなわち 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) を含浸したシリカゲルカラム (Waters Sep-Pak XPoSure™ Aldehyde Sampler) に気中ホルムアルデヒドを捕集し、アセトニトリルで溶出後、高速液体クロマトグラフィーにて分離・定量を行った。その結果、曝露期間中の平均濃度および標準偏差は、2000ppb 曝露では 1941 ± 42 ppb、400ppb 曝露では 392 ± 18 ppb、80ppb 曝露では 78 ± 5 ppb であった(図 4)。また、一日 16 時間曝露中の濃度変化も、連続モニタリングを実施したが、曝露開始 30 分程度で目標濃度に達し安定した濃度を維持し、曝露中止後は速やかにバックグラウンドレベルに低下することが確認された(図 5)。

(5) OVA 感作およびトルエン前曝露

実験群は、ホルムアルデヒド曝露単独分に加え、昨年同様に卵白アルブミン(OVA)感差を行ったアレルギー性炎症モデルモ作成を、またホルムアルデヒド以外の有機溶剤との混合作用を検討するために、あらかじめトルエン前曝露を実施した群を設けた(図 6)。すなわち OVA の感作は、初回はホルムアルデヒド曝露開始時に OVA とアルミニウムの混合液の腹腔内投与を行い、その後は曝露期間中に 3 週間毎に生理食塩水に溶解した OVA のみを、臨床用吸入器を改良したエアロゾル発生装置と曝露装置を用いて 1 回あたり 6 分間吸入曝露した(図 7)。

またトルエンの前曝露は 500ppm を昼間に 6 時間、連続 3 日間吸入曝露する前処置を行った。本態性多種化学物質過敏状態の臨床所見において、何らかの化学物質にある限度を超えて曝露を受けた場合に、以後は異なった化学物質についても症状を呈することも特徴として挙げられている。そこで、今年度は、職域等でも使用量が多く、本症の発症との関連性も懸念されているトルエンの前処置による影響を検討した。今回トルエン前曝露に用いた 500ppm は、労働環境における許容濃度 50ppm の 10 倍濃度である。

(6) 体重変化

1 2 週間曝露期間中の C3H/HeN マウスの体重変化は曝露群、コントロール群ともに順調な体重増加を認め、両群に相違は認めなかった(図 8)。肥満細胞欠損モデル群では、ホルムアルデヒド曝露の有無に関係なく曝露開始 2 週間ほど一時的に体重の減少が認められたが、その後は野生型同様に増加を示した(図 9)。また外見上の変化として、肥満細胞欠損群では、後述するように強度の皮膚の炎症所見を呈した。

(7) 参考文献

- 1) Hori H, Arashidani K: Basic Characteristics of a Formaldehyde Gas Generator Using Solid Paraformaldehyde, J. UOEH, 19(2), 123-131 (1997)
- 2) 関正利, 平嶋邦猛, 小林好作: 疾患モデル . 実験動物の血液学 . ソフトサイエンス社 . 東京 , 1981 : 205-227
- 3) Barry K et al : The analysis of mast cell function in vivo using mast cell deficient mice . Immunobiology of proteins and peptides . Advances in Experimental Medicine and Biology . 1981 ; 347 : 39-54

(8) **Abstract**

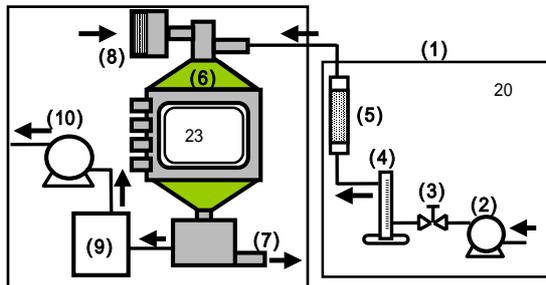
Exposure apparatus and experimental procedure

Naoki Kunugita, Hajime Hori, Keiichi Arashidani

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

Formaldehyde exposure is considered to be one of the causes of multiple chemical sensitivity (MCS). In this study, we developed an animal model to investigate the effect of chronic exposure to low levels of formaldehyde in mice. Female mice (C3H/He, mast cell deficient WBB6F1-W/W^v and unaffected WBB6F1-+/+ mice, 10 weeks old) with or without ovalbumin (OVA)-immunization were exposed to either ambient air or formaldehyde gas obtained by depolymerization of paraformaldehyde at a dose of 80, 400 and 2000 ppb over a 3-month period (16 hours/day x 5 days/week x 12 weeks). The formaldehyde gas concentration in the chamber was measured by a 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) - high performance liquid chromatography (HPLC). The concentrations of 80, 400 and 2000 ppb exposure groups were 78 ± 5 , 392 ± 18 and 1941 ± 42 ppb, respectively. The body weights of animals exposed to formaldehyde were similar to those of their controls

図1 吸入曝露装置の概略図



(1):ホルムアルデヒドガス発生装置 (2):ポンプ (3):バルブ
 (4):流量計 (5):試料充填セル (6):吸入曝露チャンバー
 (7):セパレーター (8):HEPAフィルター (9):排ガス処理装置
 (10):プロア

図2 実験動物

日本チャールスリバー

・C3H/HeN

メスを8週齢で購入、10週齢より曝露

Jackson Laboratoryより輸入マウス

・肥満細胞欠損モデルマウス(W/W^v)

・コントロールマウス(+/+)

これらはWB系雌とC57BL/6系雄のF1マウスWBB6F1マウス。
 WBB6F1マウスには、W/W^v、W/+、W^v/+、+/+の4つの遺伝子型が
 出現するが、+/+は正常対照マウス、W/W^vが肥満細胞欠損マウス。
 +/+マウスは全身黒色毛、W/W^vマウスは皮膚のメラニン細胞がな
 いため毛は白色で貧血を有し、肥満細胞はほとんど欠損し、卵巣に
 は生殖細胞がない。生後20日では正常対照マウスの10%程度の肥
 満細胞を持っているが、生後100日を経過すると1%以下となる。

図3 タイムスケジュール

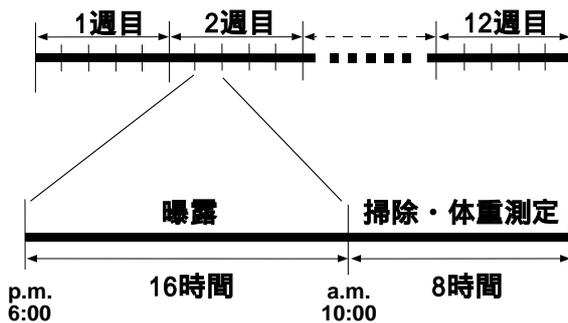


図4 濃度設定値と測定濃度

設定値	実測値
80ppb	78 ± 5
400ppb	392 ± 18
2000ppb	1941 ± 42

図5 チャンバー内濃度の日内変化

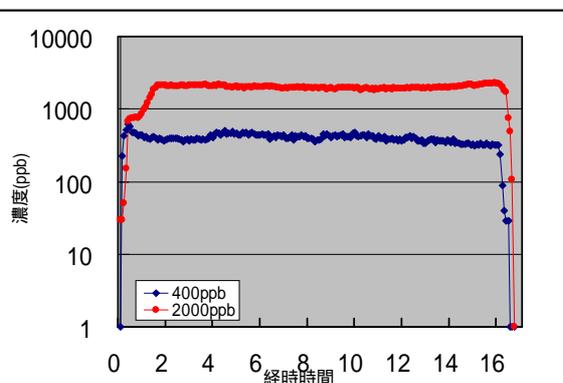


図6 実験群

- 1) C3H/HeN:ホルムアルデヒド曝露単独群
- 2) C3H/HeN: OVA感作 + ホルムアルデヒド曝露群
- 3) C3H/HeN:トルエン前曝露 + ホルムアルデヒド曝露群
 トルエン曝露 = ホルムアルデヒド曝露前に500ppmx3日間
- 4) 肥満細胞欠損モデルマウス群: W/W^v群および+/+群

図7 アレルギー性疾患モデルのOVA感作

曝露開始時 (第0週)	第3週	第6週	第9週	第11週	第12週終了後
OVA + Alum (ip)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	OVA alone (aerosol)	解剖

写真1 OVA感作の様子



図8 各週におけるマウス体重変化
(C3H/HeN)

