

### 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：櫛田尚樹・石田尾徹・保利 一・嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

今年度は、昨年度までのホルムアルデヒドを中心とした曝露において認められた現象の再現性の確認と機序解明を目的に曝露実験を実施した。加えて、これらの現象がホルムアルデヒドに特異的なものであるのか、あるいはその他の化学物質による曝露によっても同様に認められるのかを検討した。そのために、ホルムアルデヒド同様に化学物質過敏状態との関係が懸念され、曝露機会も非常に多いトルエンについてホルムアルデヒド同様の12週間吸入曝露実験を実施した。

ホルムアルデヒドおよびトルエンの吸入曝露は、昨年までと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）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(図1)。次項以降の各実験課題項目のグループわけと各群の使用マウス匹数を表1に示す。

マウスは、ホルムアルデヒド 2000ppb 曝露群、400ppb 曝露群、トルエン 50ppm 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あるいはトルエンを、また、コントロール群には清浄空気のみを曝露した。

##### （2）ホルムアルデヒド吸入曝露装置

吸入曝露装置は昨年までの実験と同様である。吸入曝露実験装置の概略図(図2)を示す。装置はホルムアルデヒドガス発生装置と、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)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。

### (3) ホルムアルデヒドガス曝露方法

ホルムアルデヒドの吸入曝露時間は午後 5 時 30 分から翌朝 9 時 30 分までの夜間帯 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) ホルムアルデヒド曝露濃度評価

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  $2002 \pm 31$ ppb、400ppb 曝露では  $401 \pm 11$ ppb であった (図 4)。

### (5) トルエン吸入曝露装置

吸入曝露実験装置の概略図を示す(図 5)。装置は、トルエン蒸気発生装置と曝露チャンバー A、B の 2 基とから構成されている。

蒸気発生装置 (4) にトルエンを入れ、直接清浄空気バブリングすることによりトルエン蒸気を発生させた。蒸気発生量は恒温槽 (3) の温度と空気流量 (2) でコントロールできる。

曝露チャンバー A、B (容積 100L) (5) 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 (6,7) 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に接続されたポンプで空気を排気することにより、チャンバー上部から室内空気を希釈空気として導入する。トルエン蒸気を含む空気は、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。

### (6) トルエン蒸気曝露方法

トルエン蒸気の吸入曝露はホルムアルデヒドと異なり、曝露時間は午前 10 時から午後 4 時までの昼間帯 6 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。曝露終了後は汚染した餌・水からの経口摂取の可能性をなくすために毎回新規の餌・水に置き換えた。

### (7) トルエン曝露濃度評価

チャンバー側面のガス採取口から自動ガスサンプラー (GL Sciences, GS-5000AP) を用いて定期的に空気をサンプリングし、FID 付ガスクロマトグラフ (GL Sciences, GC353B) で濃度を測定した。その結果、設置したチャンバー A、B の曝露期間中の濃度は、それぞれ  $51.0 \pm 1.4$ 、 $50.3 \pm 1.8$  ppm であった(図 6)。

### (8) OVA 感作

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)感作を行ったアレルギー性炎症モデルの群を設けた(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)。

### (9) 体重変化

12 週間曝露期間中の C3H/HeN マウスの体重変化はホルムアルデヒド曝露群、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)。トルエン曝露においては、曝露期間の 2,3,4,5,6,7 週において、一時的にトルエン 50ppm&OVA-群において、Cont (0ppm&OVA-)に対し有意水準 5%で有意に体重が大きい時期があるがその後の体重増加を含め全体的には差は認めなかった (図9)。

以上、まとめると今年度も非常に安定した曝露が実施され、曝露期間中の感染等の兆候も認めなかった。またホルムアルデヒドおよびトルエン曝露による有意な体重増加の変化は認められなかった。これらのマウスを以下の項目の実験に供し各検討を行った。

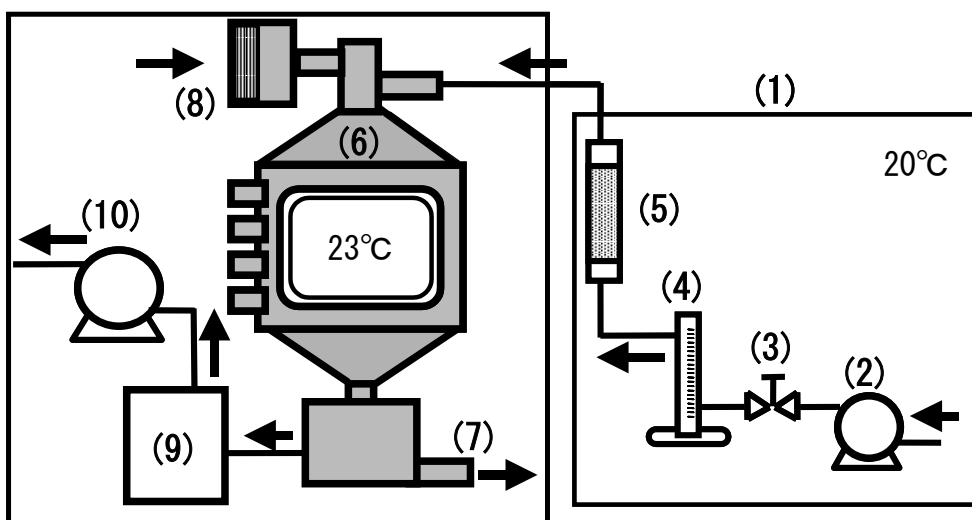
図1 実験動物

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

表1 実験群 (匹数)

課題	OVA有無	Control	トルエン	ホルムアルデヒド	
		0	50ppm	400ppb	2000ppb
嗅球・扁桃体	OVA-	5		5	5
	OVA+	5		5	5
視床下部・下垂体	OVA-	10	10		
	OVA+	10	10		
免疫系	OVA-	12	12	12	
	OVA+	10	10	10	
くしゃみ	OVA-	20			20
海馬	拘束のみ	10			
	OVA-	10		10	6
	OVA+	10		10	6
行動	OVA-	10			10
合計	OVA-	77	22	27	41
	OVA+	35	20	25	11
総計		112	42	52	52

図2 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):吸入曝露チャンパー  
 (7):セパレータ (8):HEPAフィルター (9):排ガス処理装置  
 (10):ブローア

図3 曝露タイムスケジュール

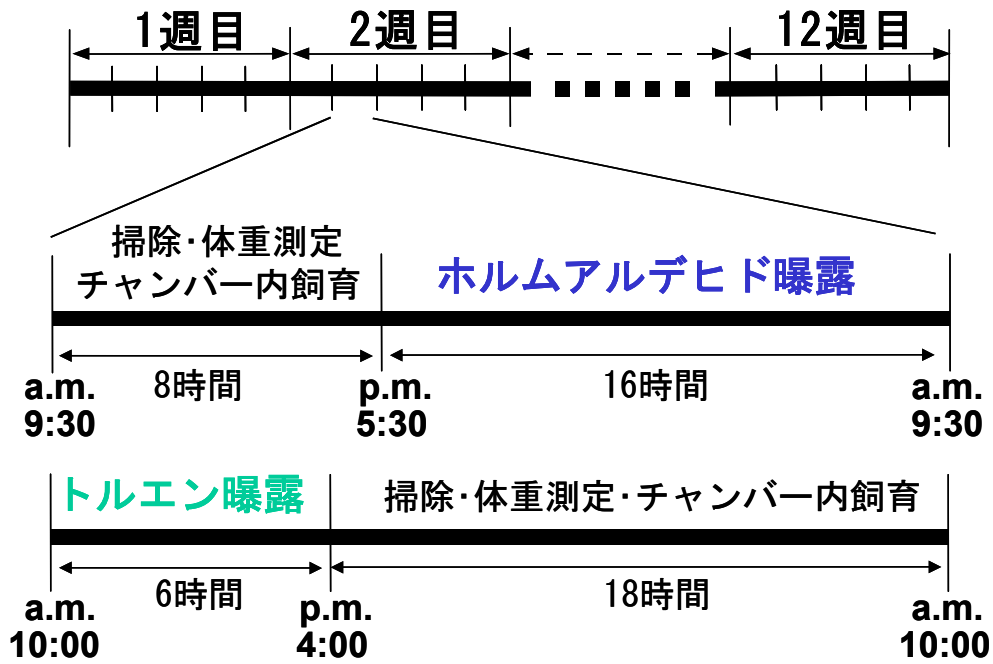


図4 チャンバー内ホルムアルデヒド濃度

