

平成 1 6 年度
本態性多種化学物質過敏状態の調査研究
研 究 報 告 書

平成 1 7 年 3 月

財団法人 日本公衆衛生協会

総 目 次

A. 目 的	-----	1
B. 検討会委員	-----	1
C. 調査研究結果	-----	3
第 1 章 二重盲検法による微量化学物質曝露試験	-----	3
第 2 章 マウスを用いた動物モデルに関する研究	-----	2 3
第 3 章 微量化学物質の測定に関する研究	-----	9 7

本態性多種化学物質過敏状態の調査研究

A. 目 的

近年、環境中に存在する微量な化学物質による環境汚染や人体汚染が大きな社会問題となっている。とりわけ、シックハウス症候群との関連性等が指摘されている本態性多種化学物質過敏状態（いわゆる化学物質過敏症）については、不確実な点が多いものの、科学的知見の収集を急ぐ必要がある。

そこで、本調査では、平成 12 年度より平成 15 年度に実施した二重盲検法による研究成果の総括を実施し、本病態が化学物質によって誘発されるか否かを検証するとともに、モデル動物を利用した非アレルギー性の過敏状態の発症機序を検討し、メカニズムの解明を図った。

また、新たに化学物質過敏症の原因として疑われる化学物質が明らかになった際には、可及的速やかに極微量分析を行わなければならないので、そのための分析手法の開発に着手した。

B. 検討会委員（順不同 敬称略）

座長	大井 玄	東京大学名誉教授
	相澤 好治	北里大学医学部衛生学公衆衛生学教授
	荒記 俊一	独立行政法人産業医学総合研究所理事長、東京大学名誉教授
	浦野 紘平	横浜国立大学大学院環境情報研究院教授
	久保木富房	東京大学医学部附属病院心療内科教授
	竹中 洋	大阪医科大学医学部耳鼻咽喉科教授
	土屋 悦輝	工学院大学工学部応用化学科講師
	西岡 清	横浜赤十字病院長
	橋本 信也	日本医師会常任理事
	藤巻 秀和	（独）国立環境研究所環境健康研究領域室長
	吉村 健清	福岡県保健環境研究所長
	鈴木 達夫	（社）北里研究所メディカルセンター病院環境科学センター長
	坂部 貢	北里大学薬学部公衆衛生学教授
	嵐谷 奎一	産業医科大学産業保健学部教授

C. 調査研究結果

第 1 章 二重盲検法による微量化学物質曝露試験

目 次

研究実施担当者	5
I. 目的	6
II. 方法	6
(1) インフォームド・コンセント (説明と同意)	7
(2) 施設	7
(3) 対象	7
(4) 薬物代謝酵素遺伝子の解析およびマイクロアレイによる遺伝子発現 パターンの検討	7
(5) 神経学的検査	8
(6) 症例の要約	11
III. 結果	16
A. 薬物代謝酵素発現の評価	16
B. マイクロアレイ法による遺伝子発現パターンの評価結果	18
C. 眼球運動と視覚空間周波数特性検査(MTF)の評価	20
IV. 考察	20
V. 結論と今後の課題	21

二重盲検法による微量化学物質曝露試験総括研究

研究実施担当者

総括	坂部 貢	北里大学薬学部公衆衛生学教室教授 (社) 北里研究所北里研究所病院臨床環境医学センター
	遠乗 秀樹	北里大学医学部衛生学公衆衛生学助手・同大薬学部公衆衛生学教室講座研究員
	尾島 正幸	北里大学医学部衛生学公衆衛生学研究員
	齋藤麻里子	東京大学大学院ストレス防御心身医学研究員
	土本 寛二	北里大学薬学部臨床薬学研究センター病態解析部門教授 (社) 北里研究所北里研究所病院院長
	鈴木 幸男	(社) 北里研究所北里研究所病院呼吸器内科部長
	相澤 好治	北里大学医学部衛生学公衆衛生学教授
	田中館明博	北里大学医療衛生学部医療工学科助教授
	宮田 幹夫	(社) 北里研究所北里研究所病院臨床環境医学センター客員部長
	吉田 貴彦	旭川医科大学医学部健康科学教授
	小島 弘幸	北海道立衛生研究所健康科学部研究員

I. 目的

本態性多種化学物質過敏状態（いわゆる化学物質過敏症）については、平成9年より研究班が設置され、微量化学物質に対して過敏性を有すると判断された被験者に対して平成12年度8名、平成13年度15名、平成14年度15名の計38名について、二重盲検方法による微量ホルムアルデヒド曝露負荷試験を施行、年度毎に結果を評価し検討を重ねてきた。しかしながら、曝露負荷試験後の自覚症状の増強が医学統計学的、即ち、科学的評価に耐えうる一定の傾向を示さず神経学的検査を中心とした他覚的検査においても曝露前後の生理学的変動を十分に捉えることが出来なかった。

そこで平成15年度は、これまでの研究結果・検討会において今後の課題としてあげられた種々の指摘・示唆を踏まえ、複数化学物質混合同時負荷・負荷時間の延長を中心として、負荷前後の自覚症状、バイタルサイン、各種神経学的検査等を記録・検討した。その結果、平成14年度の結論と同様、本態性多種化学物質過敏状態と診断された集団の中には、様々な状態の患者が混在し均一な集団ではなく、昨年度の結果からも、ごく微量（混合曝露でガイドライン値の半分以下）のホルムアルデヒド+トルエンの曝露と被験者の症状誘発との間に、統計学的に有意差をもった関連性は、確認出来なかった。即ち、微量化学物質曝露で自覚症状を呈する集団が存在することに間違いはないが、被験者の内容は非常に変化に富んでおり、曝露負荷試験のみで、本症の病態解析を行なうことが困難であるとの結論と評価を得た。

そこで本年度は、平成15年度の研究協力を得られた被験者を中心に、被験者に対する薬物代謝酵素の遺伝子多型性・神経学的検査所見を加味した再評価を施行し、二重盲検法における本症の病態解析に関わる有用性について最終的結論を引き出したいと計画した。

II. 方法

昨年度（平成15年度）に施行した微量ガス負荷試験の被験者および健常者（化学物質過敏性を自覚していない者）における薬物代謝酵素の遺伝子多型性および神経学的検査所見を検討した。

(1) インフォームド・コンセント (説明と同意)

薬物代謝酵素の遺伝子多型性検査については、社団法人北里研究所及び学校法人北里学園の倫理委員会の承認を受けた。さらに、被験者には、本研究の趣旨・得られた研究結果の取り扱い方法および個人遺伝情報管理・倫理委員会における承認事項等を詳細に説明し、同意の得られた者のみ研究協力を依頼した。

(2) 施設

使用施設は、分子生物学的研究設備を有する北里大学薬学部公衆衛生学研究室を主として利用し、一部、北里研究所病院・バイオメディカルラボも利用した。マイクロアレイを用いた遺伝子発現の評価は、北海道道立衛生研究所の研究施設も利用した。

(3) 対象

評価は、平成15年度の被験者9名を対象として計画し、本態性多種化学物質過敏状態と判断され、かつ遺伝子多型検査に協力の得られた8名（以下、本態性多種化学物質過敏状態患者という）について評価を行った。

また被験者の年齢は20歳から40歳までとし、社会生活が極めて制限されている者は対象としていない。本態性多種化学物質過敏状態の診断は、北里研究所病院臨床環境医学センターに所属する医師が行い、第三者の医師により、本態性多種化学物質過敏状態の診断基準*に合致しているかどうかの判定を得て選択され、かつ研究開始時の対象選定にあたり、精神疾患の有無についての判定を行い、精神疾患を有する者を除外している。*なお、診断基準については、最終頁に記載した。

(4) 薬物代謝酵素遺伝子の解析およびマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの検討

今回は、薬物代謝酵素として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ群（以下GSTs）の遺伝子発現を対象とした。サンプルは被験者の上腕皮静脈より採血、末梢リンパ球を分離し、Total RNAを抽出した。GSTs遺伝子の発現は、常法通りに、RT-PCR法によって評価した。さらに、被験者末梢リンパ球より得たTotal RNAは、マイクロアレイ解析に用いた。

(5) 神経学的検査

被験者に対して以下の神経眼科学的検査を施行、評価した。

a. 眼球運動検査

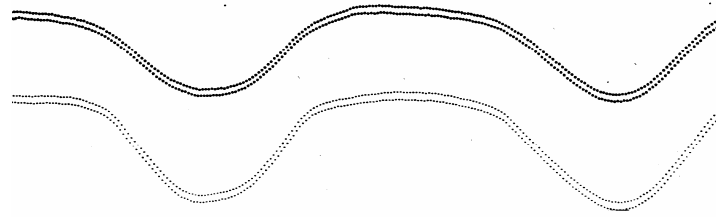
本態性多種化学物質過敏状態を有する集団では、核下性麻痺を訴え複視を示す例は殆ど認めず、眼位の変化は生じにくい。しかし、高率に中枢性または核上性眼球運動障害を認めることがこれまでに報告されている。眼球運動には急速に動く衝撃性眼球運動 (saccadic movement) とゆっくり動く滑動性眼球追従運動 (smooth pursuit movement) があり、本態性多種化学物質過敏状態では眼球運動異常を認め、それは核上性変化が中心となる。両眼の黄斑部を時々刻々刺激することにより両眼が同時に追従を行いスムーズに動くのが健常者である。この際、異常があったとしても、首を水平または垂直に動かして前庭神経の関与を行なって誘発される前庭動眼反射は、多くの場合正常である。この系の障害が高度になると注視麻痺に至る。今回の評価では、光学的な眼球運動記録装置により判定した。刺激としてはCRT画面上に水平方向あるいは垂直方向へ指標を振子のように動かし、目標物の動きを追いかける両眼の滑動性追従運動を眼球電位図 (EOG) を用いて記録、評価した。

a-1. 眼球運動測定装置: 測定に用いた眼球運動測定装置について

今回使用した眼球運動装置は、光電素子眼球運動記録法の機器 IOTA AB 社 (スウェーデン) 製 ober II である。振幅 $\pm 20^\circ$ 周波数 0.4 Hz の正弦波で追従性眼球運動の測定を行った。追従性眼球運動測定とは、ある視標に対して眼球が追従可能かどうかを評価する検査である。

この測定から得られた波形を図 1 と図 2 に示した。

図 1 は視標に追従可能な健常者の波形で、図 2 は視標に追従不可能な例の典型波形 (異常波形) で、本症の代表波形である。



図－1 健常者



図－2 本態性多種化学物質過敏状態

a-2. 眼球運動検査の記録法

測定に用いた眼球運動測定装置は、眼球からの光反射を利用した方法で、いわゆる強膜反射法によるものである。この方法は、眼球上の角膜部分と強膜部分の色彩と明度が大きく異なる部分に非侵襲赤外光を照射し、その反射光の変化により測定をする方法である。強膜は瞳孔に比べて光の反射率が高く角膜と強膜の境界部分に赤外光を照射すると、眼球の位置の変化にしたがって照射された位置がずれ、角膜と強膜の面積の割合が変化する。このときの反射光量の変化を、光電素子を用いて電圧に変換すれば眼球の位置の変化をアナログ的に見ることができる。

a-3. 測定法

振幅±20° 周波数 0.4Hz の正弦波で追従性眼球運動の測定を行った。

・眼球運動測定の解析手順

眼球運動測定装置より測定された追従運動から衝動性眼球運動（サッケード）の出現の大きさを求めた。計算方法は以下の式を用いて求めた。

$$\text{サッケード値} = \frac{a + b + c + d + e + \dots}{X} \times 100$$

サッケード値は、一周分の振幅に対する追従出来なかった高さの合計の占める割合とした。この計算式より、サッケード値が大きければ視標の動きに対しどの程度追従することが出来ないかを判定できる。また測定結果は、サッケード値が 25 以上の場合、追従運動を円滑に行なうことが出来ないと判定した。

b. 視覚空間周波数特性検査(MTF)

一般に視力として用いられているものは、中心視力であって本態性多種化学物質過敏常態では異常が出にくく低下例はむしろ少ない。そこで今回は、鋭敏な高位視覚中枢検査法である視覚空間周波数特性検査（以下 MTF）を行い異常の有無を判定した。これは正弦波形になっている白黒の濃淡差を視覚領における識別感度（コントラスト感度と呼ぶ）を利用して他覚的に視力を評価する鋭敏な検査法であり、今回我々は、ミシガン大学視覚生理学教室で開発された方法を採用している。CRT画面上に低～高周波数の濃淡正弦波の縞模様を示し、左右それぞれの空間周波数毎の感度測定を行い評価した。

(6) 症例の要約

被験者 9 名の概要をまとめて次に示す。ただし、症例 3 については、遺伝子解析の同意が得られなかった。

被験者概要

症例	年齢・性	主要発症推定原因・場所
1	24 歳男性	大学の化学研究室。アレルギー歴あり。
2	27 歳女性	化粧品会社勤務から発症
3	27 歳男性	新築ビルにおける勤務。アレルギー歴あり。
4	25 歳男性	大学の化学研究室。
5	35 歳女性	主要発症要因不明。アレルギー歴あり。(平成 14 年度症例 5)
6	26 歳女性	新築住居。
7	32 歳男性	組織ホルマリン固定作業。アレルギー歴あり。
8	30 歳男性	大学の化学研究室
9	37 歳男性	建材作業で発症。中毒後遺症状と本症の境界型。アレルギー歴あり。

参考のため、昨年度のホルムアルデヒド・トルエン混合曝露負荷検査結果について概要を示す。なお解析方法は以下の通りである。

1) 症例ごとの検討

各患者のスコアは、以下の方法で解析した。

- (1) 曝露条件ごとに、曝露直前と曝露直後の自覚症状のスコアを、症状ごとに対応させた上で比較する (Wilcoxon signed-rank test)。
(以下、曝露前後比較)
- (2) 全条件での曝露後の症状スコアを、症状ごとに対応させて上で、3 群間比較する (Freidman test)。 (以下、3 群比較)
- (3) 昨年度報告書と同様、曝露前後の自覚症状を比較した解析の結果をもとに 9 名の被験者を以下の 4 型に分類できる。

- Type 1: プラセボでは自覚症状の増強がなく、混合曝露（1回目・2回目）のみで自覚症状増強が認められた者
- Type 2: プラセボ、混合曝露（1回目・2回目）ともに、自覚症状増強が認められた者
- Type 3: プラセボ、混合曝露（1回目・2回目）ともに、自覚症状増強が認められなかった者
- Type 4: プラセボのみで自覚症状の増強が認められた者

2) 平成 15 年度症例の曝露試験結果（表-1 参照）

・ 症例 1 について

プラセボ負荷前後、曝露 1 負荷前後では、有意な症状の変化は認められなかった。曝露 2 負荷前後では、負荷後に有意な症状の増強が認められた($p=0.028$)(不完全な Type 1)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、Freidman 検定では、3 群間に差が認められていたが ($p=0.041$)、ボンフェローニの不等式で訂正した場合、3 群間の症状に差は認められなくなった。

・ 症例 2 について

プラセボ負荷前後、曝露 2 負荷前後では、症状の強さに有意な差は認められなかった。曝露 1 負荷前後の比較では、曝露後に有意な症状の増強が認められた ($p=0.011$)(不完全な Type 1)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

・ 症例 3 について

プラセボ負荷試験、曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後の全てで、症状の強さに有意な差は認められなかった (Type は 3)。負荷後の 3 群比較で

は、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 4 について

プラセボ負荷試験、曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後の全てで、症状の強さに有意な差は認められなかった (Type は 3)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 5 について

プラセボ負荷前後では、有意な症状の変化は認められなかった。曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後では、有意な症状の増強が認められた (曝露 1 ・ $p=0.017$ 、曝露 2 ・ $p=0.030$)。この被験者では、プラセボに反応せず、曝露で症状が強くなるパターンを呈している (Type 1)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、3 群間の症状に強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 6 について

プラセボ負荷試験、曝露 1 負荷前後、曝露 2 負荷前後の全てで、症状の強さに有意な差は認められなかった (Type は 3)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 7 について

プラセボ負荷前後では、負荷後、有意な症状の増強が認められた ($p=0.045$)。この被験者では、プラセボのみで症状が強くなるパターンを呈している (Type 4)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 8 について

プラセボ負荷前後では、負荷後、有意な症状の増強が認められた ($p=0.046$)。この被験者では、症例 7 と同様、プラセボのみで症状が強くなるパターンを呈している (Type 4)。負荷後の 3 群比較では、プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、3 群間に症状の強さの違いは認められなかった。

- ・ 症例 9 について

プラセボ負荷前後、曝露 2 負荷前後では、症状の強さに有意な差は認められなかった。曝露 1 負荷前後の比較では、曝露後に有意な症状の変動が認められた ($p=0.001$) (不完全な Type 1)。プラセボ負荷後、曝露 1 負荷後、曝露 2 負荷後の症状の強さを比較すると、Freidman 検定では、3 群間に有意の差が認められていた ($p=0.0000004$)。ボンフェローニの不等式で訂正しても、有意差が認められ、プラセボ負荷後は、他の 2 つの曝露負荷後に比べ、症状が強いことが認められた。ただし、この結果は負荷前の状態を反映しているものと考えられ、考慮出来ない結果と判断された。

表-1 曝露負荷前後における自覚症状の変化について

症例	年齢	性別	発症要因	プラセボ負荷 前後の症状	曝露 1 負荷前 後の症状	曝露 2 負荷前 後の症状	Type
1	24	男性	化学研究室	×	×	○	1 不完全
2	27	女性	化粧品会社	×	○	×	1 不完全
3	27	男性	新築ビル	×	×	×	3
4	25	男性	化学研究室	×	×	×	3
5	35	女性	不 明	×	○	○	1
6	26	女性	新築住居	×	×	×	3
7	32	男性	組織固定作業	○	×	×	4
8	30	男性	化学研究室	○	×	×	4
9	37	男性	建材作業	×	○	×	1 不完全

○：有意差あり(P<0.05)

×：有意差なし

各症例の自覚症状スコアとその比較解析結果については、平成 15 年度報告書を参照。

3) 平成 15 年度症例の曝露検査結果：まとめ

昨年度における混合負荷曝露前後の自覚症状の解析では、9 名中、プラセボ負荷では、負荷前後における自覚症状スコアの有意な差が認められず、曝露 1 回目、曝露 2 回目のみで、自覚症状スコアの有意な差が認められる「Type1」に相当するのは、症例 5 の 1 名のみであった。また、プラセボ負荷では、負荷前後における自覚症状スコアの有意な差が認められず、曝露 1 回目あるいは曝露 2 回目のどちらかで、自覚症状スコアの有意な差が認められる、いわば「不完全な Type 1」が、症例 1、症例 2、症例 9 の 3 名、プラセボ負荷のみで、自覚症状スコアの有意な差が認められる「Type 4」に相当したものは、症例 7、症例 8 の 2 名、症例 3、症例 4、症例 6 については、いずれの負荷においても自覚症状スコアに有意な差が認められない「Type 3」に相当した。よって、プラセボ負荷においては、症状の出現・悪化は認めないが、混合負荷において

のみ自覚症状の出現・悪化が認められた症例が存在したものの（曝露1回目・曝露2回目の再現性に乏しい不完全な症例も含めて）、日常的に化学物質に対して過敏性を有すると自覚している被験者の特徴を捉えるのに、平成14年度まで施行したホルムアルデヒド単独負荷と比較して、ホルムアルデヒド+トルエン混合負荷が、より有利であるという結果を得ることは出来なかった。

即ち、日常的に化学物質に対して過敏性を有すると自覚している多種多様な愁訴を呈する集団から、それらの愁訴が、微量化学曝露がどの程度関与しているかについて、高い信頼性をもって評価するのは、曝露負荷前後における自覚症状の比較のみでは、困難であるということを昨年度の結果は示していると判断できた。

Ⅲ. 結 果

A. 薬物代謝酵素発現の評価

薬物代謝酵素群として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ酵素群 (GSTs) を評価した。GSTs として、GSTM1、GSTT1、GSTP1 の3種を検討した（表-2・図-1 参照）。

表-2 各症例における GSTs 群の発現について

症例 (ID)	GSTM1	GSTT1	GSTP1	Type
1 (G643)	欠 損	欠 損	欠 損	1 不完全
2 (G645)	欠 損	発現あり	欠 損	1 不完全
4 (G642)	発現あり	欠 損	欠 損	3
5 (G644)	欠 損	欠 損	欠 損	1
6 (G507)	発現あり	発現あり	発現あり	3

7 (G646)	発現あり	欠 損	発現あり	4
8 (G648)	欠 損	発現あり	欠 損	4
9 (G647)	発現あり	発現あり	欠 損	1 不完全

図-1 各症例における GSTs 群の発現パターン



以上の結果より、3 種とも欠損していたのが、8 例中 2 例、いずれかの 2 種が欠損していたものが、8 例中 3 例、いずれか 1 種のみが、8 例中 2 例、3

種とも発現していた健常パターンは、8例中1例のみであり、化学物質過敏性を訴える集団では、健常人と比して、何らかの化学物質不耐性（薬物代謝遅延）の存在する可能性を示唆した。

B. マイクロアレイ法による遺伝子発現パターンの評価結果

図-2a,b に本研究における代表的なアレイパターン（スキャン画像）を示す。

図-2a 代表的なアレイパターン

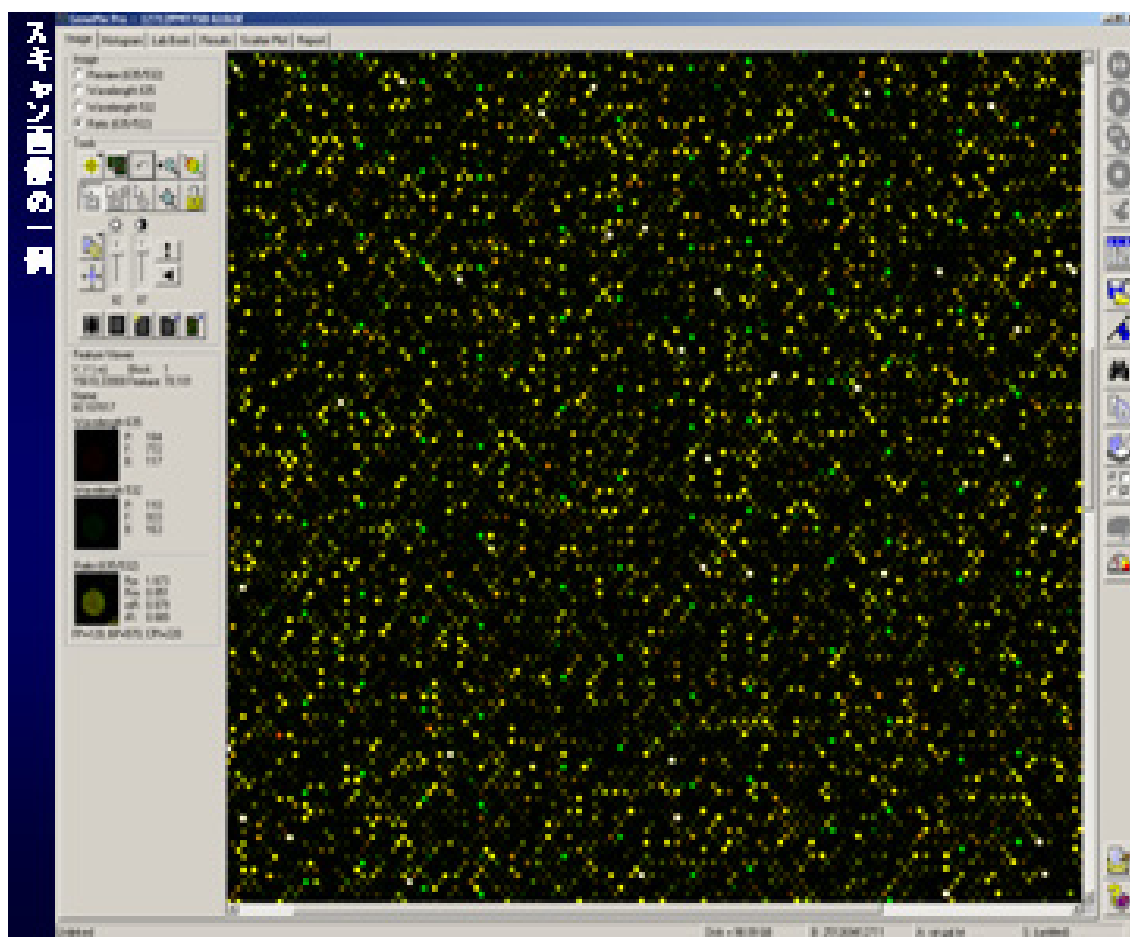
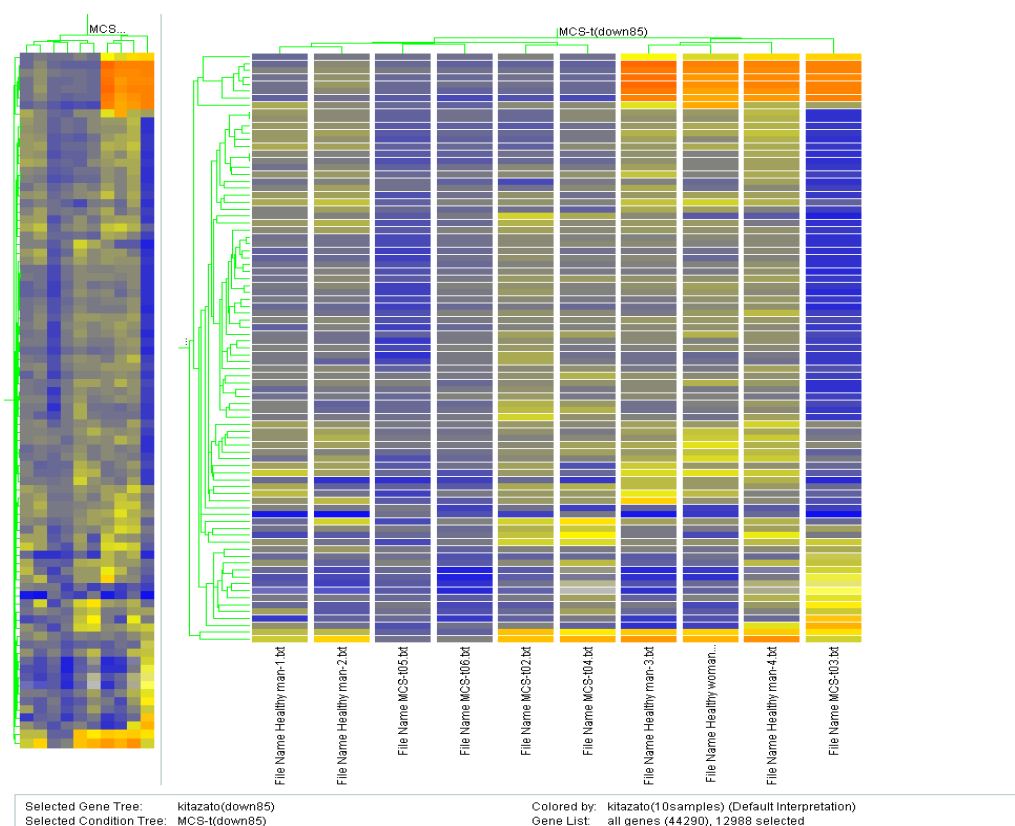


図-2b 代表的なアレイパターン



上記の結果をまとめると以下通りである。

健常者で変動していないが、過敏状態群で変動（減少）していた遺伝子 (Cy5/Cy3 ratio)

Gene	Array No.
Unknown	8285
Unknown	4566
Unknown	7448

過敏状態群で健常者よりも上昇していた遺伝子 (Cy5/Cy3 ratio)

Gene	Array No.
Hemoglobin α 2	19715
Unknown	27414

今回の結果より、健常者群（5名）と過敏状態群（5名）で、Cy5/Cy3 ratio から、減少あるいは上昇していた遺伝子が確認できたものの、両者の遺伝子発現に関する評価は困難と判断された。

C. 眼球運動と視覚空間周波数特性検査（MTF）の評価

- ・症例における眼球運動測定結果を示す(表-3 参照)

表－3 症例の眼球運動の評価結果（サッケード値）

症例	水平サッケード値	垂直サッケード値
1	42%	46%
2	32%	37%
3	22%	33%
4	38%	42%
5	24%	29%
6	30%	28%
7	36%	31%
8	35%	37%
9	23%	21%

サッケード値の評価：眼球運動測定において、被験者において、水平もしくは垂直、あるいは両者の眼球運動時のサッケード値を評価した。25 以上であった被験者の割合は、水平が 9 例中 6 例、垂直が 9 例中 8 例であり、本症では、サッケード値が 25 以上となる割合、すなわち異常検出率は極めて高値であることがわかった。また MTF に関しては、9 例中 6 例について高周波数領域にける視覚感度低下傾向が認められた。

IV. 考 察

本態性多種化学物質過敏状態の発症機序、本態、さらにはその存在についてさえ、なお議論が続けられている。本年度研究は前年度までの（平成 12

年～平成 15 年度) の二重盲検曝露負荷研究の結果・検討会における討議・本症に関する内外の研究動向を踏まえて、微量化学物質に対して過敏性を自覚している被験者の遺伝的特性、神経眼科学的特長を確認するために行われた。

遺伝的特性については、薬物代謝酵素の発現に注目し、特に薬物代謝第 2 相のグルタチオン抱合反応に重要な役割を担うグルタチオン-S-トランスフェラーゼ群の評価を行った。さらに DNA マイクロアレイ法を用いて、患者群と健常者群における約 4 万種遺伝子の発現パターン(強度)を評価した。神経眼科学的特長については、眼球電位図を用いた眼球運動評価および高位視覚中枢の昨日検査である視覚空間周波数特性検査を評価した。その結果、これまでの曝露負荷による症状のみの評価では本態性多種化学物質過敏状態を有する被験者の多様性と不安定性のために、各自覚症状スコアの変動に科学的に有意な結論は見出せなかったが、遺伝的特性・神経眼科学的検査においては、明らかに健常者の基準から外れる特徴のある集団であることが今回の試験結果からは示唆された。しかしながら今回の試験は極端にサンプル数が少なく、マイクロアレイのパターンで患者において変動を見せた遺伝子の機能は、全ては把握されていないことから、その変動の生物学的意義も現在までのところは全く不明である。結果が、微量化学物質曝露で自覚症状を呈する集団の特徴であるか否かについては、今後さらに慎重な検討が必要であると判断された。

V. 結論と今後の課題

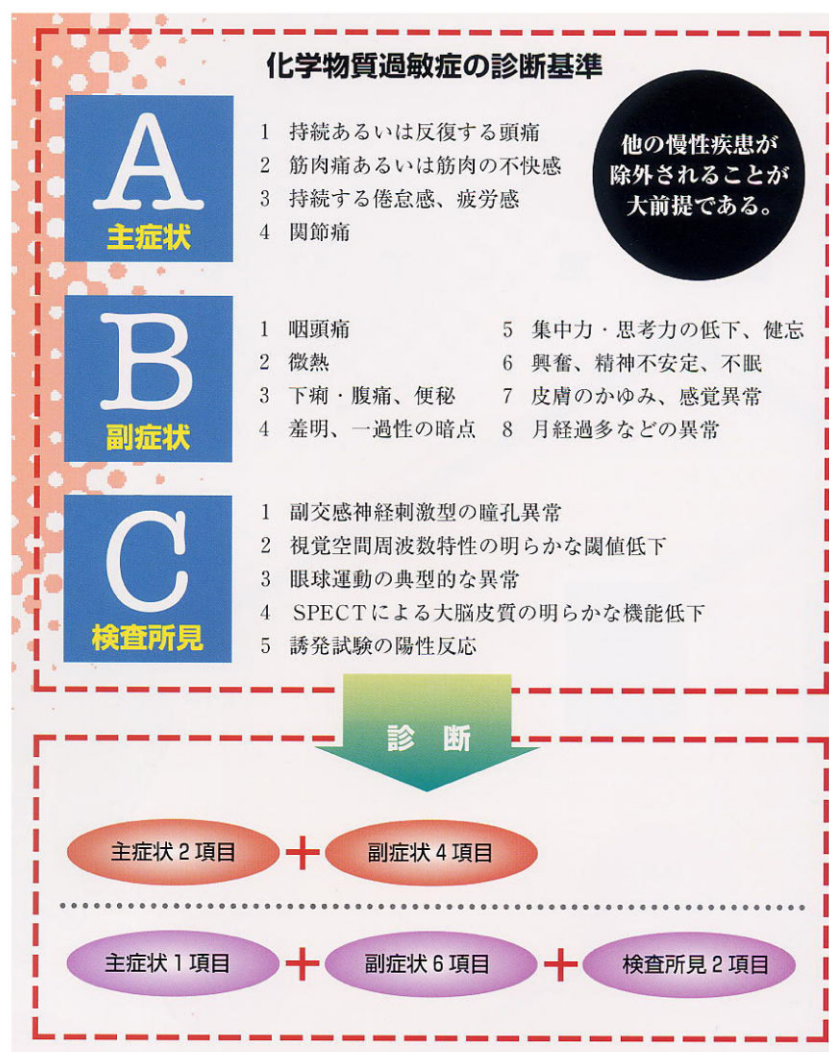
本年度の研究は、これまでの研究の総括として、前年度に微量の化学物質曝露による症状誘発の有無を確認した被験者に対する遺伝的・神経学的特長

を明らかにするために施行された。

本態性多種化学物質過敏状態と診断された集団の傾向として、薬物代謝酵素(GSTs)を欠損している例が多いこと、健常者の集団と一部異なる遺伝子発現パターンを有すること、神経学的に明らかに異常所見を有する者が多いことが推察されたが、母集団が極めて小さいことから、これらの結果と過敏状態との関連性は未だ断定することは出来なかった。

*本研究で採用した、本態性多種化学物質過敏状態の診断基準を示す。

旧厚生省長期慢性疾患総合研究事業アレルギー研究班（班長：石川哲）による



第2章 マウスを用いた動物モデルに関する研究

目 次

I. 動物モデル研究の概要	27
II. 研究者及び研究協力者名簿	33
III. 研究結果報告	35
1. 低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅覚系の形態学的 解析	35
(1) 研究目的	35
(2) 方法	35
(3) 結果	35
(4) 考察	37
(5) 文献	37
図	38
2. ホルムアルデヒド及びトルエンの長期曝露が視床下部一下垂体— 副腎軸に及ぼす影響	40
(1) 研究目的	40
(2) 研究方法	40
(3) 研究結果	42
(4) 考察	43
(5) 参考文献	44
図	46
3. 脳内海馬での情報処理変化の検討	57
(1) 過敏症の動物モデル作成における研究班のアプローチ	57
(2) 2000ppbのエンドポイントとその量—反応関係について	57
(3) メカニズムについての仮説	59
(4) 平成16年度の新たな知見	60
4. 低濃度長期ホルムアルデヒド及びトルエン曝露の免疫系、及び神経 —免疫軸への影響についての検討	62
(1) 研究目的	62
(2) 研究方法	62
(3) 主な研究結果	62
(4) 考察	65
(5) まとめ	67

(6) 参考文献	67
5. ホルムアルデヒド曝露後の自発運動量の観察、 およびホルムアルデヒドあるいはトルエン吸入曝露によるマウスの くしゃみ様症状の定量	69
(1) 研究目的	69
(2) 研究方法	69
(3) 研究結果	69
(4) 考察	70
図	71
6. その他の影響	76
6-1) 化学分析による曝露指標	76
(1) 研究目的	76
(2) 研究方法	76
(3) 研究結果	77
(4) 結論	77
図	78
6-2) 低濃度ホルムアルデヒドおよびトルエン曝露による 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	82
(1) 研究目的	82
(2) 研究方法	82
(3) 研究結果	82
(4) 結論	83
図	84
付録. 吸入曝露装置および曝露条件	90
(1) 実験動物	90
(2) ホルムアルデヒド吸入曝露装置	90
(3) ホルムアルデヒドガス曝露方法	90
(4) ホルムアルデヒド曝露濃度評価	91
(5) トルエン吸入曝露装置	91
(6) トルエンガス曝露方法	91
(7) トルエン曝露濃度評価	91
(8) OVA感作	92
図	93

I. 動物モデル研究の概要

MCSはある種の有害化学物質を低濃度で長期にわたり曝露することにより神経系が過敏な状態になり、それに伴って免疫系や内分泌系にも異常状態を引き起こすことがその発症に関与している可能性があると考えられている。化学物質として過敏状態の誘導に関与している可能性の高いホルムアルデヒドをとりあげ、まず単一の低濃度曝露を行って過敏状態の指標になりえるものを探るために神経－免疫－内分泌軸に関与する分野での検討を始めた。初年度は、実験動物の選択、曝露濃度、曝露期間、影響指標の選択を行い、2年度以降は本格的な実験に取り組んだ。実験動物としてC3Hマウスを用い、0, 80, 400, 2000ppbホルムアルデヒドの低濃度3ヶ月曝露を行い以下の結果を得た。

低濃度ホルムアルデヒド曝露による脳神経－内分泌－免疫軸それぞれのエンドポイントにおける過敏状態の発現の有無について明らかにするとともに、嗅球－海馬間での情報伝達系への影響をより深く分子レベルで検討した。また、抗原の経気道投与によりアレルギー性炎症を誘導する疾患動物モデルを用いて、その炎症反応と過敏状態との関連についても検索した。さらに、動物モデルでのホルムアルデヒド曝露による過敏状態の誘導を支持する指標による化学物質の特異性との関連、およびその過敏状態とアレルギー反応との相違について検索した。

平成16年度は、動物モデルでの研究目的である“低濃度ホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露によりアレルギー学的反応とも、中毒学的反応とも異なる過敏状態の誘導が見られたか否か”ということについてこれまでの研究成果を総括する。その中で、毒性影響を評価するための量－反応関係が、マウス嗅覚系の形態学的解析、視床下部－下垂体－副腎軸の変化、脳内海馬での情報処理変化、及び行動毒性における影響において新たに本研究で見つけられたエンドポイントで見られたか否か、また、中毒学的反応と異なるときにどのようなメカニズムが考えられるかについてまとめた。更に、免疫系への影響では、低濃度ホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露により従来の Th1/Th2 バランスの偏り、IgE 抗体産生、肥満細胞の活性化などアレルギー反応としてみられてきた反応がどのように修飾されたのか、その相違点に重点を置いてまとめを行った。

1. 低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅球系の形態学的解析

化学物質の低濃度長期曝露によって、嗅覚系ニューロンに与える影響を調べるため、ホルムアルデヒド (0, 80, 400, 2000ppb) に3ヶ月間持続的に曝露したマウスの嗅覚系を形態学的に解析した。

嗅上皮を観察した結果、2000ppb のグループで一部変性過程を示すものもあるが、全体としては軽微なものであり、機能的障害を起こしていると考えにくい。

嗅球ニューロンへの解析をドーパミン合成酵素の TH に対する抗体を用いて、嗅球糸球体でおこなった。この結果、0 ppb に比べて曝露群で陽性ニューロンの数が増えることが見いだされた。嗅球におけるドーパミンニューロンの機能は明らかでないが、刺激依存的に増加し嗅覚情報を調節していると考えられる。さらにドーパミンニューロンに加えて、嗅球の外

叢状層のニューロンの解析をおこなった。この解析のために、 Ca^{2+} 結合タンパク質の抗体を用いて解析した。嗅球外叢状層に存在する Parvalbumin 陽性の GABA ニューロンの数が、曝露群で増加する傾向が見いだされた。Calbindin 陽性ニューロンでは差は認められなかった。

嗅球からは大脳辺縁系の扁桃体皮質核および梨状葉皮質へ投射する、そこでこれらの部位のニューロンへの影響を解析した。大脳辺縁系の Ca^{2+} 結合タンパク質含有ニューロンは GABA ニューロンであることが知られている。そこで、 Ca^{2+} 結合タンパク質の抗体を用いて免疫細胞化学的に解析した。扁桃体皮質核で Ca^{2+} 結合タンパク質のうち Parvalbumin および Calbindin 陽性ニューロンが曝露群で多くなる傾向が認められた。したがって、ホルムアルデヒド曝露により GABA ニューロンの活動が高まっていることが示唆される。梨状葉皮質では、曝露群で顕著な差は認められなかった。

以上をまとめると、嗅球のドーパミンニューロンおよび大脳辺縁系扁桃体の Ca^{2+} 結合タンパク質 Parvalbumin および Calbindin 含有ニューロンが低濃度ホルムアルデヒド長期曝露群で増加している結果を得た。これらのニューロンは GABA を神経伝達物質とする抑制性の機能を有する。持続的にホルムアルデヒド刺激が嗅覚系に入力するため、これを抑制する必要から、抑制性ニューロンの活動が高まり、この結果、共存するドーパミンや Ca^{2+} 結合タンパク質の発現も増加し、この免疫陽性ニューロン数も増加したものと思われる。抑制性ニューロンの活動の増強が動物の脳にどのような影響を与えているか推測の域を出ないが、ホルムアルデヒドの持続的な刺激を解除するような脳内メカニズムが働いていると考えられる。

2. ホルムアルデヒド及びトルエンの長期曝露が視床下部—下垂体—副腎軸に及ぼす影響

視床下部—下垂体—副腎(HPA)軸はストレスに対応する軸であるので、低濃度ホルムアルデヒドとトルエンの長期曝露が視床下部室旁核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)神経細胞と下垂体の副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)細胞にどのような影響を与えるかを免疫組織学的方法、計量計測学的方法、半定量的 RT-PCR 法により解析した。又、MCS に罹患した患者の多くは、アレルギーを発症している女性であることから卵白アルブミン(OVA)を前処置して作成したアレルギー発症のメスマウスを用いた。更に、アレルギーを発症しないトルエンを前処置したマウスを用いて、OVA 前処置で発症したアレルギーの意義を解析した。

マウスをホルムアルデヒド曝露群(A 群)、アレルギー発症群(B 群)、トルエン前処置群(C 群)と低濃度トルエン曝露群(D 群)の 4 群に分類した。A 群は非アレルギー (OVA-) マウスで、0ppb (対照群)、80ppb、400ppb、2000ppb 濃度のホルムアルデヒドを 12 週間曝露した。B 群はアレルギー (OVA+) マウスで、ホルムアルデヒド曝露前に抗原として $10\mu\text{g}$ /マウス濃度の卵白アルブミン (OVA) と 2mg alum を腹腔に投与し、以降 3 週間ごとに OVA を腹腔に投与した。ホルムアルデヒド曝露は、A 群同様に行った。C 群では、500ppm のトルエンを 3 日間経気道曝露後、A 群同様の処理を行った。D 群は (OVA-) マウスと (OVA+) マウスに 0ppm か 50ppm のトルエンを 12 週間曝露した。

A 群 (OVA-) マウスの CRH-免疫陽性(ir)神経細胞数、下垂体の ACTH-ir 細胞出現率と数並びに下垂体の ACTH-mRNA の発現量はホルムアルデヒド曝露量依存的に増加した。B 群 (OVA+) マウス対照群の CRH-ir 神経細胞数、下垂体の ACTH-ir 細胞出現率と数並びに

下垂体の ACTH-mRNA の発現量は、A 群 (OVA-) マウスの対照群のものよりそれぞれ有意的に増加していた。B 群 80ppb ホルムアルデヒド曝露マウスの CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir 細胞の出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量は、A 群の 2000ppb 曝露マウスの値までさらに増加した。しかし、400ppb と 2000ppb 曝露マウスのこれらの値は減少した。C 群の CRH-ir 神経細胞数、ACTH-ir 細胞の出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量は、ホルマリン曝露量依存的に増加した。D 群の (-OVA) マウスでは、対照群の CRH-ir 神経細胞数、ACTH-ir 細胞の出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量と比較してトルエン曝露群で増加していた。

(OVA+) トルエン曝露群の CRH-ir 神経細胞数、ACTH-ir 細胞の出現率と数並びに ACTH-mRNA の発現量は、(OVA+) 対照群に比べて増加していた。

A 群と D 群では、ホルムアルデヒドとトルエンがそれぞれストレスラーとして HPA 軸に作用していることを示した。一方、B 群では高濃度(2000ppm)ホルムアルデヒド曝露により HPA 軸が障害を受けていた。このことから、シックハウス症候群において、アレルギーとホルムアルデヒドの2つのストレスの相乗作用で HPA 軸が損傷を受け、更なるストレス(腹痛、頭痛など)を処理できない状態になっていると推察することが可能である。

アレルギー発症モデル B 群とトルエン前処理した C 群の結果は、アレルギー性炎症は、ホルムアルデヒド曝露に対する HPA 軸の反応に悪影響を与えるが、アレルギー炎症を発現しないトルエン前処置ではなんらの影響も与えていないことを示唆した。

このような5年間の結果を総合して、本実験系は MCS あるいはシックハウス症候群のモデルマウスとして適切であると思われる。

3. 脳内海馬での情報処理変化の検討

本態性多種化学物質過敏状態と診断された患者共通の中枢神経症状として、頭痛・抑うつ・記憶困難・集中力低下・いらいら感・不安などが以前より報告されている。本課題におけるマウスでの行動試験においても、ホルムアルデヒド (FA) 長期曝露は不安情動を増強し、回避学習を促進した。FA 曝露は一般活動性、空間学習機能、侵害受容には影響しないことから、動物実験においても情動に関する脳機能への影響が示唆された。

不安情動には大脳辺縁系のなかの海馬が主に関与すると考えられている。われわれは 2000 ppb 濃度における FA 曝露動物海馬における形態学的な変化がないことを確認した。FA 曝露したマウス海馬においては、歯状回で興奮性が亢進し、フィードバック抑制は海馬 CA1 と歯状回で減弱した。この抑制の減弱は抑制性シナプス伝達物質 γ -アミノ酪酸 (GABA) の合成酵素であるアミノ酸脱炭酸酵素 (GAD) のサブタイプ GAD67 の低下と一致し、興奮と抑制の攪乱が伝達物質合成レベルでおきていることが示唆された。400 ppb からフィードバック抑制の低下傾向がみられた。シナプス伝達の可塑性については、短期増強 (STP) は減弱したが長期増強 (LTP)・長期抑圧 (LTD) は変化しなかった。が、スライスの実験条件を変えると LTP の低下が観察された。条件を修正して測定した LTP の低下については、80、400 ppb でも観察された。海馬 CA1 領野においては、シナプス伝達の可塑性と関連している Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) α および β アイソフォームの自己リン酸化反応が亢進し

ており、恒常的活性の上昇がシナプス可塑性を発現する能力を頭打ちとした結果として障害したと考えられる。

曝露モデルにおけるこれらの変化にたいするアレルギーの関与については、400 ppb 濃度でFA曝露されたアレルギーモデルでのLTPや炎症性サイトカインの発現変動の解析結果からは明らかににはならなかった。一方、海馬以外の部位での変化としては、曝露群の脳皮質でも副腎皮質刺激ホルモンや増殖因子活性化プロテインキナーゼ（ERK）の増加がみられたことから脳辺縁系以外へのFA曝露の影響も示唆された。

FA曝露マウスでは、嗅覚情報が嗅内野でさまざまな感覚情報と集約・統合され、その情報（興奮性入力）が海馬内に入って増幅され、視床下部の神経活動をストレス反応へと変異させたと考えられる。さらに中枢神経系内のストレス軸の変移が情動反応の亢進と関連していることが示唆された。

4. 低濃度長期ホルムアルデヒド及びトルエン曝露の免疫系、及び神経—免疫軸への影響についての検討

（4. 1）獲得免疫系、及び神経—免疫軸への影響についての検討

化学物質の曝露による過敏状態とアレルギー性炎症モデルの反応との違いについて明らかにするために、ホルムアルデヒドのみの曝露群と抗原を腹腔内投与とエアロゾルで感作しながらホルムアルデヒドを曝露した群における免疫応答を比較検討した。その結果、吸入抗原感作を行うアレルギー性炎症モデルでは2000ppbホルムアルデヒド曝露による肺への炎症性細胞の集積や400と2000ppb曝露による脾臓細胞からのケモカイン産生の増加がみられたが、Th2タイプのサイトカイン産生やIgE抗体価における増強は認めなかった。一方、脳内のサイトカイン量について下垂体、海馬、線条体での測定においては、炎症性のサイトカインレベルで顕著な差はみられなかったが、神経栄養因子であるNGFにおいては海馬で400ppb曝露による増加が認められた。さらに、海馬におけるNGF mRNAの発現の増強は低濃度において顕著であり、蛋白レベルの結果と合致した。免疫組織化学的検索でも、海馬においてNGF陽性反応の顕著な増強が確認できた。血漿中と肺胞洗浄液では、脳内とは逆に、ホルムアルデヒド曝露によるNGFの有意な低下が認められた。次に、神経伝達物質受容体の遺伝子発現量の変化を調べるために、海馬及び扁桃体のNMDA型グルタミン酸受容体(ϵ 1, ϵ 2mRNA)、ドーパミン受容体(D1, D2, mRNA)のmRNA発現量を半定量的PCR法により測定した。海馬において、ホルムアルデヒド曝露により ϵ 1、 ϵ 2の変動が認められ、またD1、D2の増加傾向もみられた。扁桃体では、 ϵ 1、 ϵ 2、D1の増加が認められた。海馬において ϵ 1、 ϵ 2の構成が変化したことは、記憶形成機構に変化が生じた可能性を示唆しており、また扁桃体における遺伝子発現量の増加は、情動機能の変化の可能性を示唆している。

トルエン曝露では、抗体価と神経伝達物質受容体の遺伝子発現でホルムアルデヒドとは異なる反応がみられた。

これまでのまとめとして、ホルムアルデヒド曝露のみでは蛋白の発現の変動がみられない低い濃度でも、免疫系への抗原刺激が加わることにより脳内での神経伝達物質分子の動きが誘導されることが明らかとなり、過敏状態に繋がる可能性が示唆された。

(4. 2) ホルムアルデヒド曝露とアレルギー反応に関わる肥満細胞機能との関連

ホルムアルデヒド曝露と抗原の吸入感作によるアレルギー性炎症モデルにおいてもっとも顕著にくしゃみの増加が観察された。そこで、肥満細胞が関与する可能性について解析するために、肥満細胞欠損マウス(WBB6F1-W/Wv)とその正常対照マウス(WBB6F1-+/+)を用いて、ホルムアルデヒド曝露により誘導される炎症性反応について比較検討した。その結果、皮膚の炎症病変やリンパ球分画について変化は認めなかった。肺胞洗浄液中への炎症性細胞の集積においては、W/Wv マウスと+/+マウスでホルムアルデヒド曝露による違いが認められたが、両マウス間でサイトカイン産生、及び血漿中の抗体価において差異は認められなかった。これらの結果から、今回のホルムアルデヒド曝露条件下では、免疫-神経軸における影響に肥満細胞の関与は少ないと推察された。

5. ホルムアルデヒド曝露後の自発運動量の観察、およびホルムアルデヒドあるいはトルエン吸入曝露によるマウスのくしゃみ様症状の定量

MCS の動物モデルを用いての行動毒性試験で中枢神経刺激薬に対する感受性亢進の有無が報告されている。そこで、移所運動活性へのホルムアルデヒド曝露の影響について検討した。2000ppb の3ヶ月曝露で運動活性の増加がみられ、また、くしゃみ様行動の増加も認められた。次に、無刺激の自発運動のみを経時的に測定し、曝露中に観察されたくしゃみ様行動を定量化し、曝露の影響を評価するとともに、OVA 感作との関連についても検討した。その結果、移所運動活性の観察においては、低濃度ホルムアルデヒドの曝露影響は観察されなかった。くしゃみ様行動回数の変化に関しては、曝露2ヶ月時ですでに曝露濃度依存的なくしゃみ様行動の増加が観察された。曝露終了時点でのくしゃみ様行動の回数はさらに増加し濃度依存性を認めた。また、OVA の感作により非感作群に比べ有意な増加を認めた。また、曝露期間の増加にしたがってくしゃみ様行動回数が増加していること、くしゃみ様行動回数だけでなく、くしゃみ様行動の発症率においても曝露濃度の増加に依存していることが観察された。次に、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様行動を観察した。その結果、C3H/HeN マウスにおいてはこれ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様行動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様行動の頻度が増加し、80ppb においても有意なくしゃみ様行動の増加が認められた。一方、肥満細胞欠損モデルマウスと正常マウスの比較においては、有意なくしゃみ様行動の違いは認められなかった。このことから、観察されたくしゃみ様行動に肥満細胞が関与していないことが示唆された。

以上、低濃度ホルムアルデヒド曝露によりくしゃみ様行動の増加が観察されたが、50 ppm トルエン濃度ではくしゃみ様行動の誘発はみられなかった。

6. その他の影響

6-1) 化学分析による曝露指標

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ー(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。またトルエンの曝露指標として尿中代謝産物である馬尿酸を測定したところ曝露直後には高く翌日には正常レベルに戻っており経気道曝露により確実にマウス生体内に取り込まれていることが確認された。

6-2) 低濃度ホルムアルデヒドおよびトルエン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

低濃度ホルムアルデヒド（最大で 2000ppb）および 50ppm トルエンの 12 週間吸入曝露による病理学的変化について検討した。今回用いた濃度域における吸入曝露では、いずれの物質においても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。

7. まとめ

低濃度のホルムアルデヒドを C3H マウスへ長期（3 ヶ月）にわたり曝露することにより、嗅覚系におけるドーパミンニューロンの活動の増強、視床下部一下垂体でのホルモン産生の障害、脳内海馬におけるシナプス伝達の異常、アレルギー性炎症モデルでの NGF の変動、くしゃみ様症状の増加などが確認された。これらの結果は、低濃度ホルムアルデヒド曝露が嗅覚系を介して神経—内分泌—免疫軸を過敏な状態に導く可能性を示唆している。また、アレルギーモデルにおける嗅覚での変動はわずかではあるが、低濃度化学物質曝露とアレルギー状態の共存とにより、より脳神経—免疫軸への作用を増強させることが推察された。中毒学領域としてとらえられていない濃度域での反応や通常のアレルギー状態とは異質の反応が観察されたことは、低濃度曝露がなんらかの反応異常を神経—免疫系に引き起こす可能性は否定できない。今後、動物モデルにおいてはアレルギー感作状態の併用効果に見られる機構の解析、化学物質特異性に係わる遺伝的な素因の検討、低濃度域での複合化学物質曝露による影響解明などの研究が MCS の解明により重要と考える。

Ⅱ. 研究者及び研究協力者名簿

1. 低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅球系の形態学的解析

市川 眞澄 (財) 東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所

林 洋 (財) 東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所

2. ホルムアルデヒド及びトルエンの長期曝露が視床下部—下垂体—副腎軸に及ぼす影響

佐々本文彦 大阪府立大学大学院

トウイ・ケスマ・サリ 大阪府立大学大学院

桑原 佐知 大阪府立大学大学院

3. 脳内海馬での情報処理変化の検討

笛田由紀子 産業医科大学産業保健学部

夏目季久代 九州工業大学大学院

黒河 佳香 独立行政法人国立環境研究所

福永 浩司 東北大学大学院

栗生 修司 九州工業大学大学院

福田 孝一 九州大学大学院医学研究科

吉田 安宏 産業医科大学医学部

4. 低濃度長期ホルムアルデヒド及びトルエン曝露の免疫系、及び神経—免疫軸への影響についての検討

藤巻 秀和 独立行政法人国立環境研究所

黒河 佳香 独立行政法人国立環境研究所

山元 昭二 独立行政法人国立環境研究所

掛山 正心 独立行政法人国立環境研究所

樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

5. ホルムアルデヒド曝露後の自発運動量の観察、およびホルムアルデヒドあるいはトルエン吸入曝露によるマウスのくしゃみ様症状の定量

嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部

笛田由紀子 産業医科大学産業保健学部

樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

6. その他の影響

佐藤 房枝 産業医科大学産業保健学部

菊池 亮 産業医科大学産業保健学部

嵐谷 奎一 産業医科大学産業保健学部

樺田 尚樹 産業医科大学産業保健学部

Ⅲ. 研究結果報告

1. 低濃度のホルムアルデヒドに長期曝露されたマウス嗅覚系の形態学的解析

研究協力者 市川眞澄、林 洋（（財）東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所）

（1）研究目的

嗅覚はニオイを感受する感覚系である。ニオイは化学物質により引き起こされる。このニオイ物質は吸気とともに鼻腔に取り込まれ鼻腔の奥にある嗅覚器に到達する。ここで、感覚細胞（嗅細胞）に受容され、その情報は嗅球から大脳辺縁系を経由して高次脳中枢へと運ばれる。この感覚系は嗅覚系と呼ばれる。低濃度ホルムアルデヒド（80, 400, 2000 ppb）長期曝露により、嗅覚系にどのような影響を与えるかを嗅覚器、嗅球、大脳辺縁系で形態学的に解析した。嗅覚系のなかで、嗅覚器の特徴は、嗅細胞が外界に接していることである。この理由から、外界の様々な物質に曝露されてその影響を直接を受けることである。嗅上皮を破壊したりあるいは鼻腔をふさぐなどして嗅神経の活動を抑制すると、嗅球のドーパミンニューロンの活動が変化する。これをドーパミン合成酵素の TH（チロシン水酸化酵素、tyrosine hydroxylase）量あるいは TH 陽性細胞が減少することで解析可能である。この方法により、嗅神経の活動をモニターするには、大変有効である。そこで、TH 抗体により免疫染色し、染色された細胞数を計測することにした。嗅覚系の高次中枢である大脳辺縁系特に扁桃体は、本能行動、特に摂食や情動に強く関わっている。また、視床下部との神経連絡も密であることから、自律機能や内分泌機能への影響も考えられる。そこで、嗅球からさらに高次中枢への影響を明らかにするために、嗅球の大脳辺縁系投射部位である梨状葉および扁桃体におけるニューロンを解析した。この解析のために、Parvalbumin と、Calbindin の Ca 結合タンパク質免疫陽性ニューロンを用いた。大脳辺縁系におけるこれらのニューロンは、抑制性シナプス伝達物質である GABA と共存することが知られている。したがって、これら GABA ニューロンの増減活動をモニターできれば、機能的解析に大変有効であると考え Ca 結合タンパク質免疫陽性ニューロンの低濃度ホルムアルデヒドによる影響を解析した。

（2）方法

低濃度ホルムアルデヒド（0, 400, 800, 2000 ppb）を3ヶ月間曝露したマウスを、組織標本用に固定し、嗅覚系（嗅上皮、嗅球および大脳辺縁系）を形態的に電子顕微鏡および免疫細胞化学的に解析した。特に、嗅球では、ドーパミンニューロンのマーカーであるチロシン水酸化酵素（TH）および Ca 結合タンパク質のうち、Parvalbumin と、Calbindin の抗体を用いた免疫細胞化学法を、大脳辺縁系では、Ca 結合タンパク質のうち、Parvalbumin と、Calbindin の抗体を用いた免疫細胞化学法をもちいて解析をおこなった。

（3）結果

低濃度ホルムアルデヒド長期曝露マウスの嗅上皮の解析

ヘマトキシリン-エオジンおよびニッスル染色で嗅上皮を観察した結果、細胞数の減少や上皮の厚さについて、グループ間で差は認められなかった。Olfactory marker protein（OMP）は嗅細胞に特有に存在する蛋白質で、成熟嗅細胞のマーカーとして利用されている。OMP の抗体を用いて曝露嗅粘膜を

観察した。嗅上皮下半層部に OMP 陽性細胞が観察され、粘膜固有層には OMP 陽性の嗅神経の束が走っているのが観察される。これらの染色性に関して、グループ間で染色性に特に有意な差はみとめられなかった。これは、嗅細胞は、曝露の影響で変性死滅することにより、成熟が止まったりその数を減少することなく、嗅上皮に存在することを意味する結果である。

嗅細胞の上皮表面に突出している嗅小胞や繊毛および支持細胞の微絨毛の形態異常を示すマウスは 2000ppb 曝露グループでわずかに認められた。認められた形態異常は変性像としては軽微なもので、機能障害を示すほどのものではないと思える。

嗅球ニューロンの解析

糸球体を取り囲む傍糸球体ニューロンの一部はドーパミンを含有している。(TH はドーパミン合成酵素群の律速酵素である)。ドーパミンの存在意義はいまだ不明であるが、共存する GABA の抑制機能を修飾していると推測されている。たとえば、嗅上皮を破壊したりあるいは鼻腔をふさぐなどして嗅神経の活動を抑制すると、TH 量あるいは TH 陽性細胞が減少することが知られている。したがって、嗅神経の活動をモニターするのには、大変有効である。

そこで、TH 抗体により免疫染色し、染色された細胞数を計測した。嗅球糸球体はほぼ一定の大きさで同心円状に並んでいる。嗅球背側の TH 陽性ニューロンを 1 糸球体あたりの数で示した結果が図 1 である。0 ppb 群に比べて 400, 2000 ppb 曝露群で有意に TH 陽性細胞が増加している事が明らかになった (Hayashi et al, 2004)。これは、曝露の結果 TH の合成が高まり免疫的に染色された細胞数が増加した結果と考えられる。TH はドーパミン合成酵素である、したがって、ドーパミンの含有量も増加していると推測される。

Calbindin 陽性ニューロンは糸球体および外叢状層に存在する。それぞれを計測した結果、ホルムアルデヒド曝露による影響は認められなかった。Parvalbumin 陽性ニューロンは外叢状層に存在する。このニューロンを計測した結果、曝露群で増加する傾向が認められた。この結果、嗅球に存在する Ca 結合タンパク質含有ニューロンも、ホルムアルデヒド曝露の影響を受けている事があきらかになった。

嗅球のドーパミンニューロンが低濃度ホルムアルデヒド長期曝露の影響を受け、その細胞内発現量を増加させている事が明らかになった。これらのニューロンは、GABA と共存していることから、抑制的に働いている。したがって、嗅球における抑制機構が高まっていると考えられる。持続的な曝露によるホルムアルデヒドの刺激を抑制する機構が働いている可能性を示唆するものである。

大脳辺縁系ニューロンの解析

大脳辺縁系は大脳を中心である大脳新皮質の縁を構成する部位の総称である。

主なものは、海馬、梨状葉、扁桃体などである。このうち、嗅球から投射するものは、梨状葉皮質、扁桃体内側核である。そこで、これらの部位のホルムアルデヒド長期曝露の影響を解析した。

Ca 結合タンパク質はニューロンに存在し、Ca の輸送あるいは細胞内の Ca バッファーとしての役割を持つと言われている。また、脳内に広く特異的に分布するので、ニューロンのマーカーとしても用いられている。嗅覚系の Ca 結合タンパク質含有ニューロンでは、GABA ニューロンと共存し、活動依存的にその発現が変化する事が報告されている (Kemppainen & Pitkanen 2000)。おそらく、ニューロンの活動を抑制的に調節する役割を持つものと考えられる。したがって、嗅覚系のニューロンの活動をモニタ

一するのにも有効であると考え、免疫細胞化学的に解析した。

Ca 結合タンパク質のうち Parvalbumin の免疫細胞化学法により、曝露の影響を解析した。扁桃体のなかで嗅球から投射する部位は扁桃体皮質核である。そこで、扁桃体皮質核と梨状葉皮質で、Parvalbumin 陽性ニューロンの数を計測した。表に単位面積当たりの陽性ニューロン数を各曝露群ごとに示してある。扁桃体皮質核および梨状葉ともに曝露された個体で、Parvalbumin 陽性ニューロンの数が増加する傾向を示す（図2）。

Ca 結合タンパク質のうち Calbindin の免疫細胞化学法により、曝露の影響を解析した。扁桃体皮質核と梨状葉皮質で、陽性ニューロンの数を計測した。単位面積当たりの陽性ニューロン数を各曝露群ごとに示してある。扁桃体皮質核では、および梨状葉で曝露された個体で、陽性ニューロンの数が増加する傾向を示す（図3）。

Ca 結合タンパク質陽性ニューロンの免疫細胞化学的解析の結果、ホルムアルデヒド長期曝露により、Ca 結合タンパク質含有ニューロンが増加することから、嗅覚系が強く関わる大脳辺縁系に影響を及ぼしていることが示唆された。Ca 結合タンパク質含有ニューロンは、GABA と共存し、活動依存的にその発現が変化する事が報告されている。おそらく、ニューロンの活動を抑制的に調節する役割を持つものと考えられる。ホルムアルデヒドの持続的な刺激を抑制機能により解除するような脳内メカニズムが働いている可能性を示唆する。扁桃体は本能行動、特に摂食や情動に強く関わっている、また、視床下部との神経連絡も密であることから、ストレスと密に関わる自律機能や内分泌機能への影響も考えられる。

（4）考察

ホルムアルデヒドの低濃度長期曝露により、嗅球のドーパミンニューロンおよび大脳辺縁系の Ca^{2+} 結合タンパク質陽性ニューロンすなわち GABA 抑制ニューロンの一部が曝露群で増加している結果を得た。これは、持続的に刺激が嗅覚系に入力するため、これを抑制する必要から、抑制性ニューロンの活動が高まり、この結果免疫陽性ニューロン数が増加したものと推測される（図4）。これら抑制性ニューロンの活動の増強が動物の脳にどのような影響を与えているか推測の域を出ないが、少なくとも嗅覚系においては、ホルムアルデヒドの持続的な刺激を抑制機能により解除するような脳内メカニズムが働いていると思われる。

（5）文献

- Hayashi H, Kunugita N, Arashidani K, Fujimaki H, Ichikawa M (2004) Long-term exposure to low levels of formaldehyde increases the number of tyrosine-hydroxylase-immunopositive periglomerular cells in mouse main olfactory bulb Brain research 1007: 192-197.
- Kemppainen S, Pitkanen A (2000) Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. J Comp Neurol. 426:441-67.

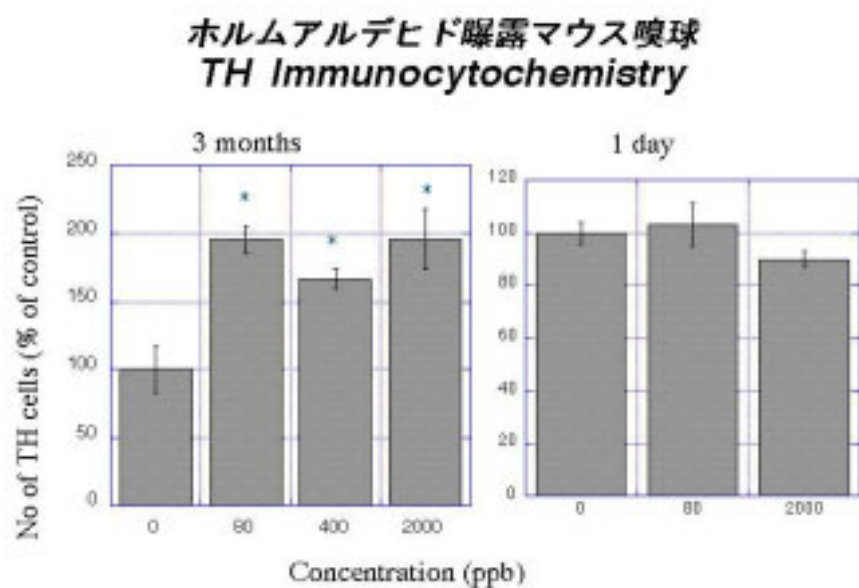


図1

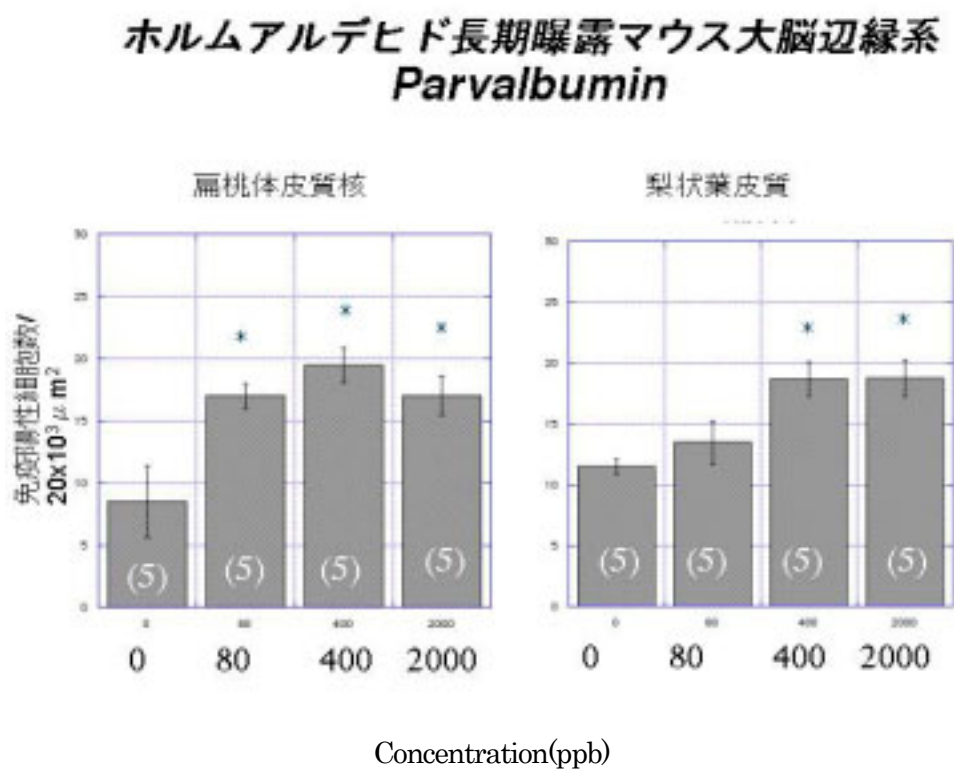
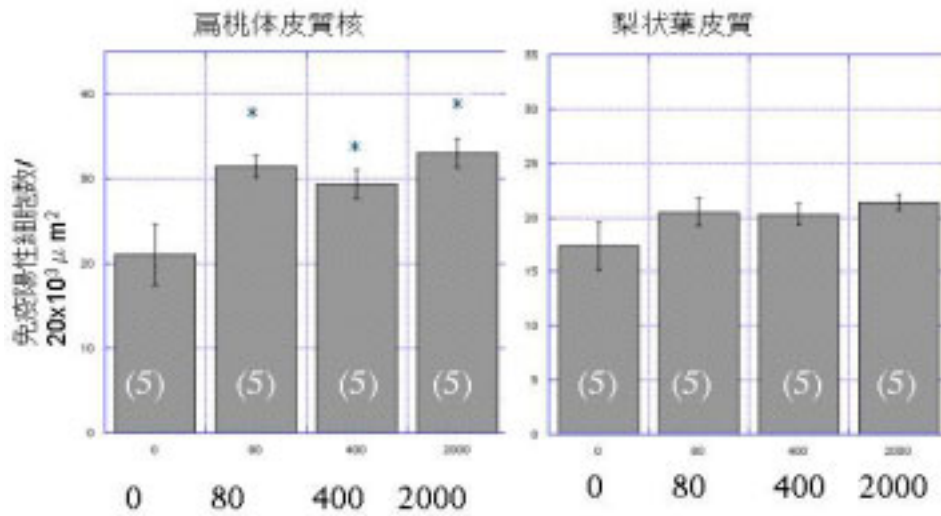


図2

ホルムアルデヒド長期曝露マウス大脳辺縁系 Calbindin



Concentration(ppb)

図3

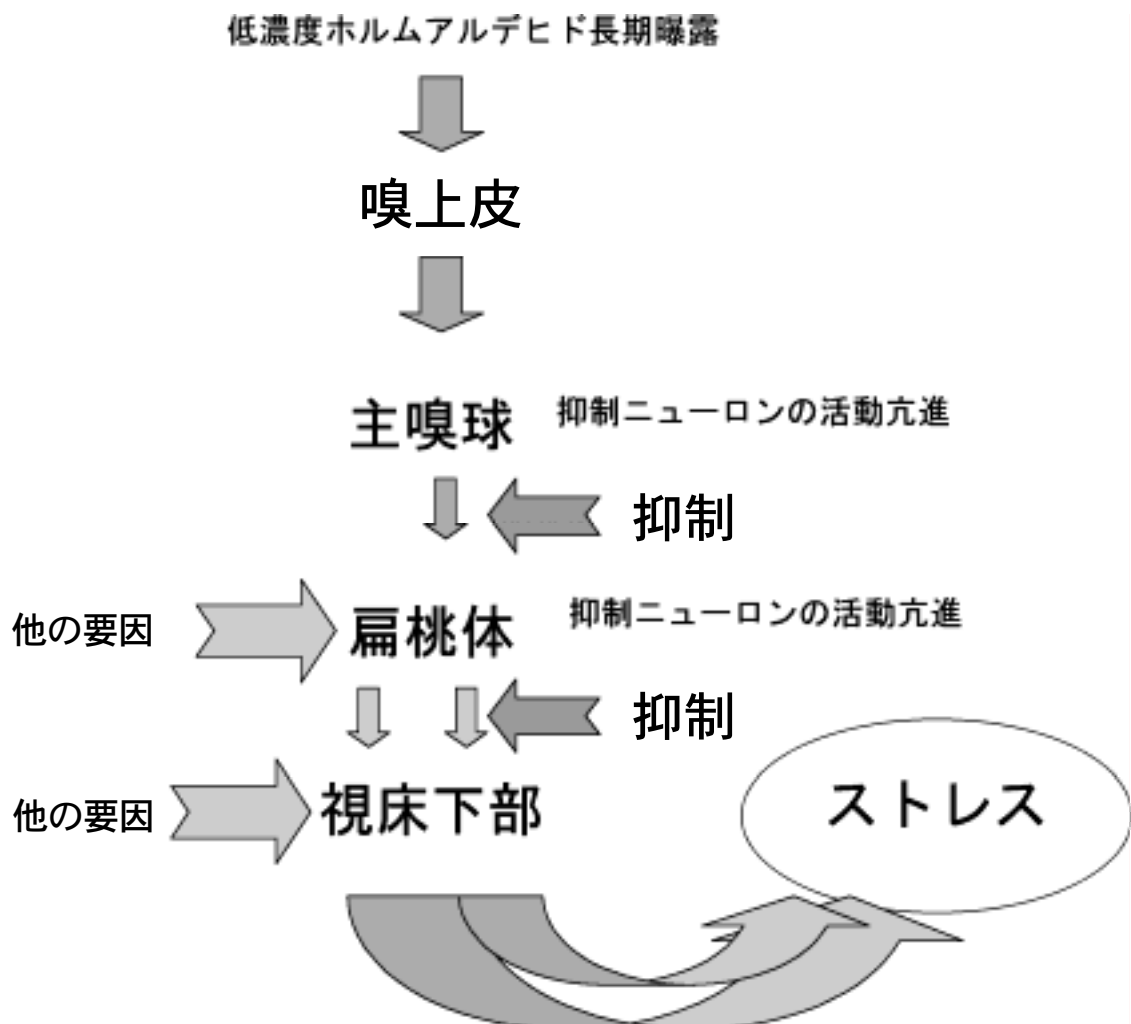


図4

2. ホルムアルデヒド及びトルエンの長期曝露が視床下部—下垂体—副腎軸に及ぼす影響

研究協力者 佐々木文彦、ドゥイ ケスマ サリ、桑原佐知（大阪府立大学大学院）

（1）研究目的

最近、環境中に存在する多種類の微量な化学物質が人体に種々の疾病を引き起こす本態性多発化学物質過敏状態 (Multiple Chemical sensitivity: MCS) の研究が重要視されている^{1, 2)}。なお低濃度ホルムアルデヒドにより惹起されることが知られているシックハウス症候群については社会問題として取り上げられている。家屋内で発生するホルムアルデヒドの曝露とシックハウス症候群罹患との関係が研究され^{3, 4)}、特に、低濃度のホルムアルデヒド曝露とヒト⁵⁾、ラット²⁾やマウス⁷⁾の呼吸器の疾病との関係がこれまでに研究されてきた。さらにトルエンについてもホルムアルデヒドと同様の症状を発症させるとして認められている⁷⁾。トルエンは、接着剤、ラッカー、ペンキなどの成分に含まれ、広く産業界で使用されている⁸⁻¹⁰⁾。

視床下部—下垂体—副腎 (HPA) 軸はあらゆるストレスに対応し、ホルムアルデヒドの様な化学薬品曝露に際してもそのストレスを解消する¹¹⁻¹³⁾。しかしながら、低濃度のホルムアルデヒドやトルエン曝露が HPA 軸にいかなる効果を及ぼすかについては報告がないのが現状である。したがって、本研究の第一の目的は低濃度ホルムアルデヒド曝露が HPA 軸に如何なる影響をもたらすかを免疫組織学的方法、計量学的方法、半定量的 RT-PCR 法を用いて解明することである。又、シックハウス症候群に罹患する患者の多くは、アレルギーを発症している女性であることから、卵白アルブミンを前処理したアレルギー発症メスマウスの HPA 軸が低濃度ホルムアルデヒドの曝露でどのようになるかを検討する事が第二の目的である。更に、第三の目的は、アレルギーを惹起しないトルエンを前処置したマウスの HPA 軸が低濃度ホルムアルデヒド曝露でどのように反応するかを検討する事により卵白アルブミン処理で惹起したアレルギーの意義を解析する事である。最後に、トルエン曝露とアレルゲンが HPA 軸にどのような影響を及ぼすかを検討することが第四の目的である。このような4年間の実験を総合して、MCS の中でも病態が広く研究されてきたシックハウス症候群の発症の機構を解明すること並びにそのモデルマウスを作成することが本研究の主目的である。

（2）研究方法

1) 動物

日本エスエルシー株式会社より8週齢の成熟メスマウス (C3H/He) を購入し、2週間の馴化後実験に使用した。マウスをホルムアルデヒド曝露群 (A 群)、アレルギー発症群 (B 群)、トルエン前処置群 (C 群) と低濃度トルエン曝露群 (D 群) の4群に分類した。さらに、A 群では80ppb、400ppb、2000ppb の濃度で12週間ホルムアルデヒドを曝露し、曝露しないマウスを対照に用い、それぞれ80、400、2000 と0群とした。B 群では抗原として卵白アルブミン (OVA) をホルムアルデヒド曝露開始前に10 μ g/マウスの濃度で2mg alumとともに腹腔内に投与し、以降OVAを3週間ごとに腹腔内に投与した。ホルムアルデヒド曝露は、A 群同様に12週間、80、400、2000 と0群とした。C 群では、500ppm のトルエンを経気道曝露後、ホルムアルデヒド

曝露は、A 群同様に行い、80、400、2000 と 0 群とした。D 群は、非アレルギー (NAG) とアレルギー (AG) マウスに 0ppm か 50ppm のトルエンを 12 週間曝露した。合計 34 群の内それぞれの群は、10 匹ずつのマウスから成り、5 匹は形態学的観察に、他の 5 匹は下垂体の ACTH-mRNA 発現の観察に使用した。体重測定後、視床下部、下垂体、副腎を採取した。副腎は、ブアンの液で固定し、全ての試料採取後重量を測定し、絶対重量と相対重量 (副腎絶対重量/体重) で示した。

2) 視床下部室旁核の CRH-(免疫陽性) ir ニューロンの解析

視床下部をブアンの液で固定し、アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋した。光学顕微鏡用のミクロトームで $10\mu\text{m}$ の連続切片とし、ガラススライドに塗付した。切片をキシレンで脱パラフィンし、ヒト CRH 抗体 (希釈倍率: 1:1,000) を用いて免疫染色 (ABC 法) し、核はヘマトキシリンで対比染色した。二次抗体としては、ビオチン標識抗ウサギ IgG (Vector Laboratories, Inc., USA) を用い、ジアミノベンチジン (Zymed Laboratories, Inc., USA) で発色させた。結果を光学顕微鏡で観察した。室旁核を含む切片を 4 枚ごとに選択し、CRH-ir 細胞数を数えた。数えた切片の数は各群 7~8 枚である。室旁核中の CRH-ir ニューロン数 (T) は、下記の公式に代入して求めた。 $T = n/i \times \sum Ni$ (n: それぞれの動物の室旁核を含む全切片数; i: 選択した切片数)。

3) 下垂体前葉の ACTH 細胞の解析

3-1) 免疫組織化学による解析

下垂体を 10%ホルマリンで固定し、アルコール系列で脱水後、パラフィンに包埋した。パラフィンプロックを $10\mu\text{m}$ の連続切片とし、キシレンで脱パラフィン後、ヒト ACTH 抗体 (希釈倍率: 1:1,000) にて ABC 法を用いて免疫染色し、核をヘマトキシリンで染色し、光学顕微鏡で観察した。二次元画像解析装置 Cosmozone-1SB を用いて ACTH-ir 陽性細胞を計測した。パソコン画面上に 1 辺が $40\mu\text{m}$ の正方形を描き、倍率 400 倍の顕微鏡像を投影し、画面上に存在する核を持つ免疫陽性細胞と全核数を数えた。ただし、正方形内に存在する免疫陽性細胞と核並びに上辺と左辺にまたがるものは数えるが、下辺と右辺にまたがるものは除外した。このようにして、ACTH 免疫陽性細胞の出現率と数は、下記の公式に代入して求めた。

$$\text{ACTH-ir 細胞の出現率 (\%)} = (\text{免疫陽性細胞数} \div \text{全核数}) \times 100.$$

下垂体前葉実質細胞の絶対数 (T) = $N^{3/2} \times V/40^3$ (N: $40^2\mu\text{m}^2$ 中に存在する平均の核数; V: 下垂体の体積)。

3-2) 下垂体の半定量的 RT-PCR による ACTH-mRNA の発現量の測定

下垂体を採取後直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで -70°C の冷凍庫中で保存した。組織を TORISOL (Life Technologies, Inc., USA) 中でホモジナイズし、total RNA を抽出した。 $2\mu\text{g}$ の total RNA、オリゴ dT プライマーおよび逆転写酵素を用いて cDNA を鋳型 DNA として、マウス ACTH に対するプライマーを使い、PCR により増幅させた。PCR 産物は、アガロースゲルで電気泳動し、得られたそれぞれのバンドについてその強度を比較することにより、ACTH-mRNA の発現の測定を行った。なお、得られた PCR 産物は、DNA シークエンスにより ACTH

であることを確認している。

(3) 研究結果

1) A (NAG) 群 (OVA-)

1-1) 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 1 の NAG (OVA-) 群 に示した。体重、副腎重量、下垂体前葉体積は、曝露 (80、400、2000) 群と対照 (0) 群で差がなかった。

1-2) 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

CRH-ir ニューロン数は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた (Fig. 1)。

1-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率 (Fig. 2)、数 (Fig. 3) は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた。

1-4) 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

ACTH-mRNA の発現量ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた (Fig. 4)。

2) B (AG) 群 (OVA+)

2-1) 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

80ppb ホルムアルデヒド曝露群の体重は対照群のものより減少し、副腎の相対重量は増加していた。400ppb と 2000ppb の体重と副腎重量は対照群のものと差はなかった。下垂体前葉の体積は、曝露群と対照群で差がなかった (Table 1 の AG (OVA+) 群)。

2-2) 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

B (AG) 群の対照 (0) 群マウスの CRH-ir ニューロン数は、A (NAG) 群マウス対照 (0) 群のものより有意に増加していた。80ppb 曝露マウスの CRH-ir ニューロン数は、A (NAG) 群の 2000ppb 曝露マウスの値まで増加した。400ppb と 2000ppb では減少した (Fig. 1)。

2-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

B (AG) 群の対照 (0) 群マウスの ACTH-ir ニューロンの出現率 (Fig. 2) と数 (Fig. 3) は、A (NAG) 群マウス対照 (0) 群のものより有意に増加していた。80ppb 曝露マウスの ACTH-ir ニューロン数は、さらに増加し、A (NAG) 群の 2000ppb 曝露マウスの値と差はない。400ppb と 2000ppb では減少した。

2-4) 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

B (AG) 群の対照 (0) 群マウスの ACTH-mRNA の発現量は、A (NAG) 群マウス対照 (0) 群のものより有意に増加していた。80ppb 曝露マウスの ACTH-mRNA の発現量は、さらに増加し、A (NAG) 群の 2000ppb 曝露マウスの値と差はない。400ppb と 2000ppb では減少した (Fig. 4)。

3) C 群 (OVA-、トルエン+)

3-1) 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 2 に示した。体重と下垂体前葉体積は、曝露群と対照群で差がなかった。80ppb と 2000ppb 曝露群の副腎重量は、対照群のものより小さく、相対重量では、80ppb 曝露群の

ものが対照群のものより小さかった。

3-2) 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

CRH-ir ニューロン数は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた (Fig. 5)。

3-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率 (Fig. 6) は、ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していたが、数 (Fig. 7) では 400ppm 群のみが対照群のものに比べて有意的に増加した。

3-4) 下垂体前葉の sinusoid

対照群に比べて 400 と 2000ppm ホルムアルデヒド曝露群で、sinusoid の有意的な拡張が見られた。特に、2000ppm 群で著明であった (Fig. 8)。

3-5) 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

ACTH-mRNA の発現量ホルムアルデヒド曝露量依存的に増加していた (Fig. 9)。

4) D 群

4-1) 体重、副腎重量、下垂体前葉体積

結果を Table 3 に示した。NAG (OVA-) マウスの体重は、対照群よりトルエン曝露群で増加した。副腎重量と下垂体前葉の容積は、各群で有意の差はなかった。

4-2) 視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数

NAG (OVA-) 対照群の CRH-ir ニューロン数に比べて NAG (OVA-) トルエン曝露群、AG (OVA+) 対照群と AG (OVA+) トルエン曝露群で多い。(OVA-) トルエン曝露群に比べて (OVA+) トルエン曝露群で多い (Fig. 10-A)。

4-3) ACTH-ir 細胞の出現率、数

ACTH-ir 細胞の出現率 (Fig. 10-B) と数 (Fig. 10-C) は、NAG (OVA-) 対照群に比べて (OVA-) トルエン曝露群、AG (OVA+) 対照群と AG (OVA+) トルエン曝露群で多い。ACTH-ir 細胞の出現率は、(OVA-) トルエン曝露群に比べて (OVA+) トルエン曝露群で多い (Fig. 10-B)。

4-4) 半定量的 RT-PCR による下垂体内 ACTH-mRNA

ACTH-mRNA の発現量は、(OVA-) 対照群に比べて (OVA-) トルエン曝露群、AG (OVA+) 対照群と (OVA+) トルエン曝露群で多い。(OVA-) トルエン曝露群に比べて (OVA+) トルエン曝露群で多い (Fig. 11)。

(4) 考察

A (OVA-) 群では、低濃度の長期ホルムアルデヒド曝露により視床下部室旁核の CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir 細胞の出現率と数、下垂体内 ACTH-mRNA 発現量は曝露量依存的に増加し、ホルムアルデヒドがストレスとして作用していることを示した。ACTH-ir 細胞の出現率は、短期間の cold ストレスにより増加する¹⁴⁾。一方、B (OVA+) 群の視床下部 CRH 神経細胞と下垂体の ACTH 細胞は A 群のものと異なる反応を示した。すなわち、B 群の CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir 細胞の出現率と数、下垂体内 ACTH-mRNA の発現量はホルムアルデヒド曝露がなくても増加し、80ppbFA 曝露で最高の増加を示した。このように、アレルギーは、ストレスとして HPA 軸に働き、ホルムアルデヒドはアレルギーの感受性を高めたと考えられ

た。また、B 群での高濃度(2000ppb)ホルムアルデヒド曝露では 80ppb 曝露マウスに比べて、CRH-ir ニューロン数、ACTH-ir 細胞の出現率と数、下垂体内 ACTH-mRNA の発現量は減少している。この現象から、B 群ではアレルギーと高濃度ホルムアルデヒド曝露により HPA 軸が障害を受け、更なるストレス（腹痛、頭痛など）を処理できない状態になっているという仮説が考えられる。すなわち、MCS の一つであるシックハウス症候群とは、アレルギーとホルムアルデヒドの 2 つのストレスが相乗的に作用して、HPA 軸が損傷を受け、更なるストレス（腹痛、頭痛など）に対応できなくなった状態という仮説を立てることができる。

トルエン前処理した C 群の HPA 軸の結果は、A 群の結果と似ている。即ち、卵白アルブミン前処置により惹起したアレルギー性炎症は、ホルムアルデヒド曝露に対する HPA 軸の反応に影響を与えるが、アレルギー炎症を惹起しないトルエン前処置では影響を与えていないと考えられる。

D 群の結果から、トルエンの低濃度曝露は、A～C 群の実験同様ストレスとして HPA 軸に作用していると考えられる。

A～D 群の結果より、本実験系は MCS あるいはマウスにおけるシックハウス症候群モデルとして活用できる可能性があることが示唆された。

本報告中の A と B の結果は Brain Res.¹⁵⁾、C の結果は、J. Vet. Med. Sci.¹⁶⁾に、また、D の結果は J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.¹⁷⁾に掲載された。

（５）参考文献

1. Sorg, BA, Willis, JR, Nowatka, TC, Ulibarri, C, See, RE, Westberg, HH. Proposed animal neurosensitization model for multiple chemical sensitivity in studies with formalin. *Toxicology* 111:135-145, 1996.
2. Sorg, BA, Bailie, TM, Tschirgi, ML, Li, Na, Wu, W-R. Exposure to repeated low-level formaldehyde in rats increases basal corticosterone levels and enhances the corticosterone response to subsequent formaldehyde. *Brain Res* 898:2001, 314-320.
3. Olsen, JH, Dossing, M. Formaldehyde induced symptoms in day care centers. *Am Ind Hyg Assoc J* 43:366-370, 1982.
4. Main, DM, Hogan, TJ. Health effects of low-level exposure to formaldehyde. *J Occup Med* 25:896-900, 1983.
5. Thrasher, JD, Broughton, A, Madison, R. Immuno activation and autoantibodies in humans with long-term inhalation exposure to formaldehyde. *Arch Environ Health* 45:217-223, 1990.
6. Kerns, WD, Pavkov, K, Donofrio, DJ, Gralla, EJ, Swenberg, JA. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res* 43:4382-4392, 1983.
7. Lee, YL, Pai, MC, Chen, JH, Guo, YL. Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occup Med (Lond)*: 53:479-482 (2003).

8. von Euler, G, Ogren, SO, Bondy, SC, McKee, M, Warner, M, Gustafsson, JA, Eneroth, P, Fuxe, K. Subacute exposure to low concentrations of toluene affects dopamine-mediated locomotor activity in the rat. *Toxicology* 67:333-349, 1991.
9. von Euler, G, Ogren, SO, Li, XM, Fuxe, K, Gustafsson, JA. Persistent effects of subchronic toluene exposure on spatial learning and memory, dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 agonist binding in the rat. *Toxicology* 77:223-232, 1993.
10. Filley, CM, Halliday, W, Kleinschmidt-DeMaster, BK. The effect of toluene on the central nervous system. *J Neuropath Exp Neur* 63:1-12, 2004.
11. Menzaghi, F, Heinrichs, SC, Pish, EM, Weiss, F, Koob, GF. The role of limbic and hypothalamic corticotrophin-releasing factor in behavioral responses to stress. *Ann NY Acad Sci* 697:142-154, 1993.
12. Whitnall, MH. Regulation of the hypothalamic corticotrophin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40:573-629, 1993.
13. Seasholtz, A. Regulation of adrenocorticotrophic hormone secretion: lessons from mice deficient in corticotrophin-releasing hormone. *J Clin Invest* 105:1187-1189, 2000.
14. Sasaki, F, Wu, P, Rougeau, D, Unabia, G, Childs, GV. Cytochemical studies of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environmental stress. *Endocrinology* 127:285-297, 1990.
15. Sari, DK, Kuwahara, S, Tsukamoto, Y, Hori, H, Kunugita, N, Arashidani, K, Fujimaki, H, Sasaki, H. Effect of prolonged exposure to low concentrations of formaldehyde on the corticotropin releasing hormone neurons in the hypothalamus and adrenocorticotrophic hormone cells in the pituitary gland in female mice. *Brain Res* 1013:107-116, 2004.
16. Sari, DK, Kuwahara, S, Furuya, M, Tsukamoto, Y, Hori, H, Kunugita, N, Arashidani, K, Fujimaki, H, Sasaki, F. Hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis in mice inhaling prior to low-level long-term exposure to formaldehyde. *J Vet Med Sci* 67:303-309, 2005.
17. Sari, DK, Kuwahara, M, Tsukamoto, Y, Hori, H, Kunugita, N, Arashidani, K, Fujimaki, H, Sasaki, F. Effects of subchronic exposure to low concentration of toluene on the hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis of female mice. *J Jpn Soc Atmos Environ* 41:38-43, 2006.

Table 1. Body weight (g), absolute (mg) and relative weight (adrenal weight/body weight) of the adrenal gland, and volume of pituitary gland of NAG (OVA−) and AG (OVA+) mice.

Group	Subgroup	BW (g)	AW (mg)	AW/BW ($\times 10^{-4}$)	VPG ($\times 10 \mu\text{m}^6$)
<i>Non-allergy</i> (OVA−)	0	27.62 $\pm$ 0.44	5.57 $\pm$ 0.16	2.02 $\pm$ 0.07	752.06 $\pm$ 28.62
	80	28.97 $\pm$ 0.59	5.28 $\pm$ 0.47	1.83 $\pm$ 0.16	782.42 $\pm$ 21.48
	400	28.24 $\pm$ 0.34	5.23 $\pm$ 0.17	1.85 $\pm$ 0.05	805.21 $\pm$ 23.08
	2000	28.50 $\pm$ 0.67	4.91 $\pm$ 0.31	1.74 $\pm$ 0.12	798.78 $\pm$ 33.59
<i>Allergy</i> (OVA+)	0	28.46 $\pm$ 0.45	5.83 $\pm$ 0.27	2.05 $\pm$ 0.09	830.25 $\pm$ 32.19
	80	27.00 $\pm$ 0.47 ^{*#}	6.17 $\pm$ 0.35	2.29 $\pm$ 0.38 [#]	768.03 $\pm$ 14.59
	400	28.78 $\pm$ 0.25	5.68 $\pm$ 0.18	1.98 $\pm$ 0.23	856.82 $\pm$ 39.11
	2000	29.02 $\pm$ 0.33	5.68 $\pm$ 0.39	1.96 $\pm$ 0.14	819.07 $\pm$ 29.45

Data are expressed as mean $\pm$ SEM,

*p<0.05 vs. control (0 subgroup of AG mice),

[#]p<0.05 vs. the corresponding subgroup of NAG mice,

BW: body weight,

AW: adrenal weight,

VPG: volume of anterior pituitary gland.

The number of mice in each subgroup except VPG (n=5) is 10.

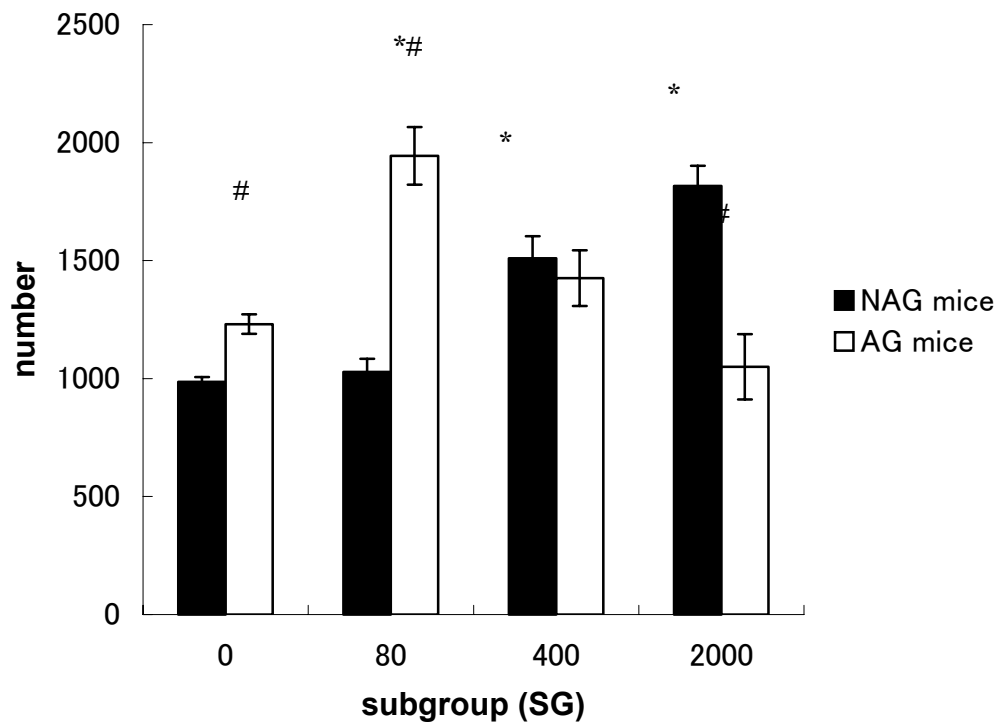


Fig. 1. The number of CRH-ir neurons in the PVN of NAG (OVA⁻) (closed bar) and AG (OVA⁺) (open bar) mice. Values are expressed as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. the 0 subgroup (control) in each group, # $p < 0.05$ vs. the corresponding subgroup of NAG mice. The number of mice in each subgroup is 5.

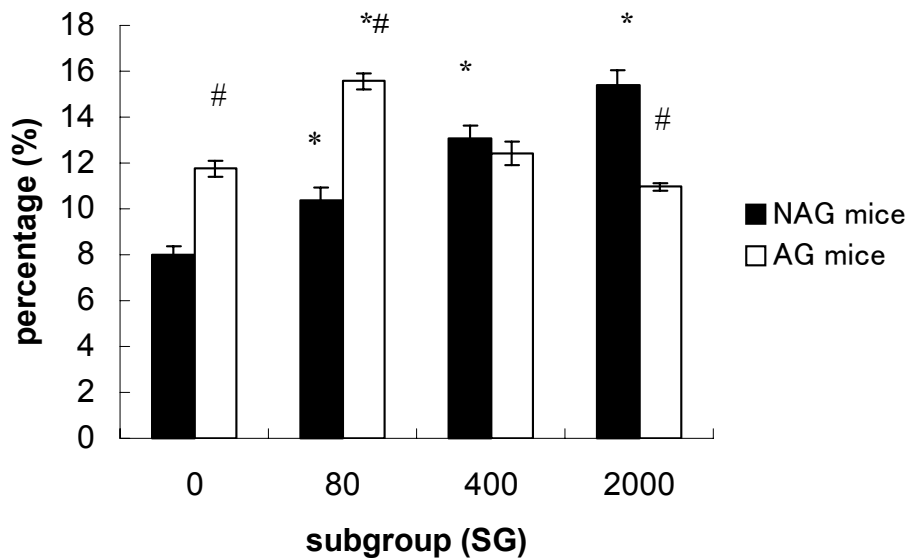


Fig. 2. The percentage of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland of NAG (OVA⁻) (closed bar) and AG (OVA⁺) (open bar) mice. Values are expressed as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. the 0 subgroup (control) in each group, # $p < 0.05$ vs. the corresponding subgroup of NAG mice. The number of mice in each subgroup is 5.

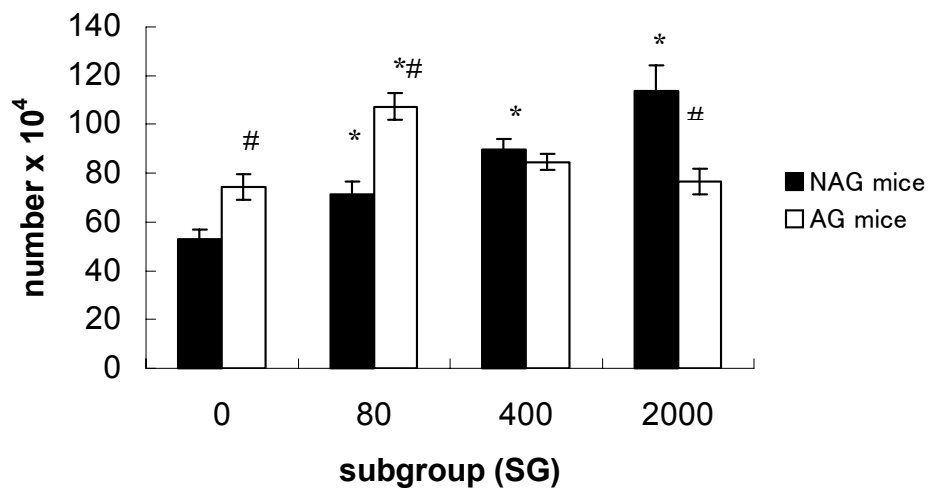


Fig. 3. The numbers of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland of NAG (OVA—) (closed bar) and AG (OVA+) (open bar) mice. Values are expressed as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. the 0 subgroup (control) in each group, # $p < 0.05$ vs. the corresponding subgroup of NAG mice. The number of mice in each subgroup is 5.

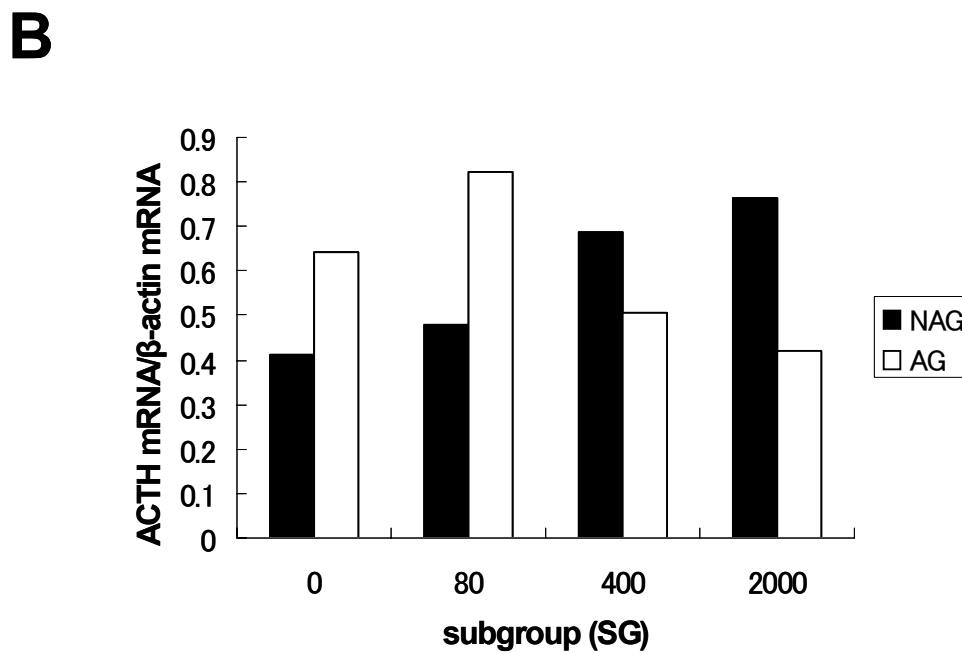
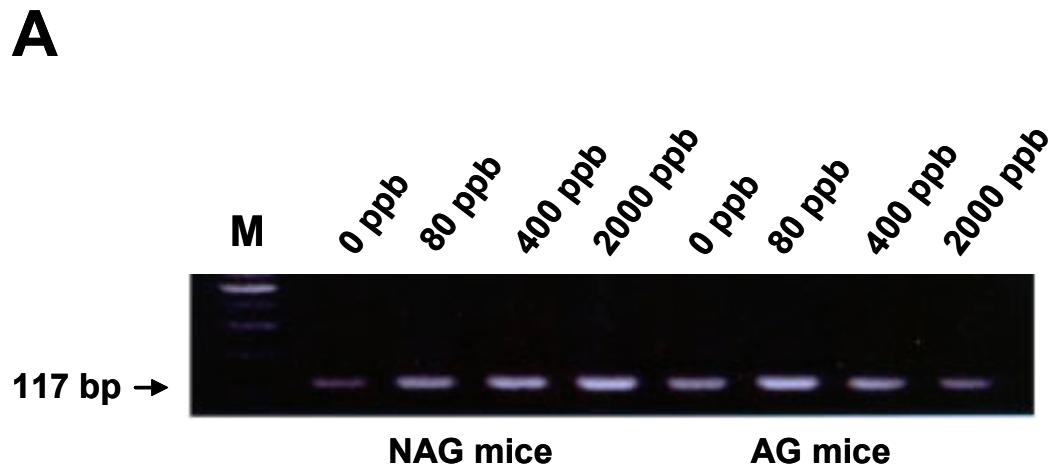


Fig. 4. The expression of ACTH-mRNA in the pituitary gland of NAG (OVA⁻) and AG (OVA⁺) mice using RT-PCR (A) and their intensity relative to those of β -actin mRNA (B). The size of amplification bands of ACTH was 117 bp. M, 100-bp ladder.

Table 2. Body weight, absolute and relative weight (adrenal weight/body weight) of the adrenal gland, and volume of the pituitary gland of mice exposed to toluene prior to inhalation of formaldehyde over 3 months.

subgroup	BW (g)	AW (mg)	AW/BW ($\times 10^{-4}$)	VPG ($\times 10^7 \mu\text{m}^3$)
0	27.8 $\pm$ 0.6	6.5 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.1	92.8 $\pm$ 8.3
80	28.4 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.2*	1.9 $\pm$ 0.1*	79.2 $\pm$ 5.8
400	27.7 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.1	90.4 $\pm$ 2.5
2000	27.1 $\pm$ 0.5 [#]	5.7 $\pm$ 0.2*	2.1 $\pm$ 0.1	78.8 $\pm$ 3.7

The values are expressed as mean $\pm$ SEM,

*p<0.05 vs. control (0 group),

[#]p<0.05 vs. 80 group,

BW: body weight,

AW: adrenal weight,

VPG: volume of anterior pituitary gland,

The number of mice in each group is 10 except for VPG (n=5).

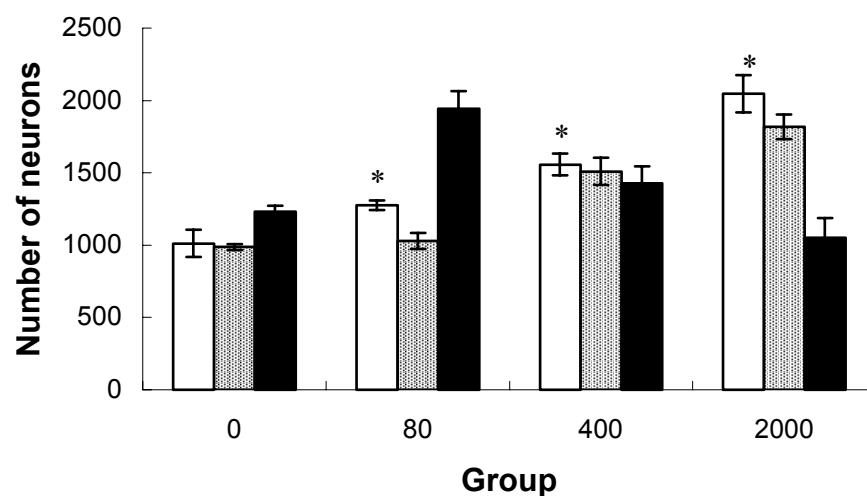


Fig. 5. Number of CRH-ir neurons in the PVN of mice exposed to toluene prior to inhalation of formaldehyde (empty bar), NAG (OVA[−]) mice (gray bar) and AG (OVA⁺) mice (filled bar) (data of non allergy and allergy mice were quoted from Ref. [16]). Mice in C group are designed as 0 (control), 80, 400 and 2000 group mice since they were exposed to formaldehyde at concentration of 0 (air), 80, 400 and 2000 ppb over 3 months. Moreover, allergy mice injected intraperitoneally with 10 μ g ovalbumin (OVA) plus 2 mg alum before formaldehyde inhalation. Values are mean $\pm$ SE (n=5). *p<0.05 vs. the 0 group (control).

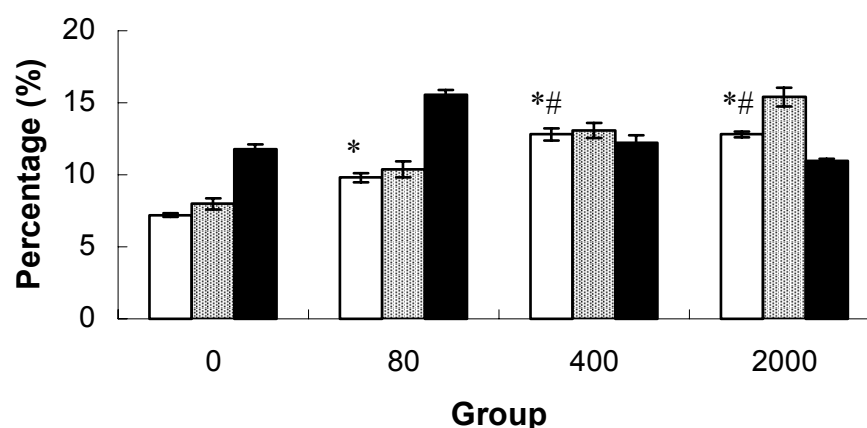


Fig. 6. Percentage of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland of mice exposed to toluene prior to inhalation of formaldehyde over 3 months (empty bar), NAG (OVA[−]) mice (gray bar) and AG (OVA⁺) mice (filled bar) (data of non allergy and allergy mice were quoted from Ref. [16]). Values are mean $\pm$ SE (n=5). *p<0.05 vs. the 0 group (control) and #p<0.05 vs. the 80 group.

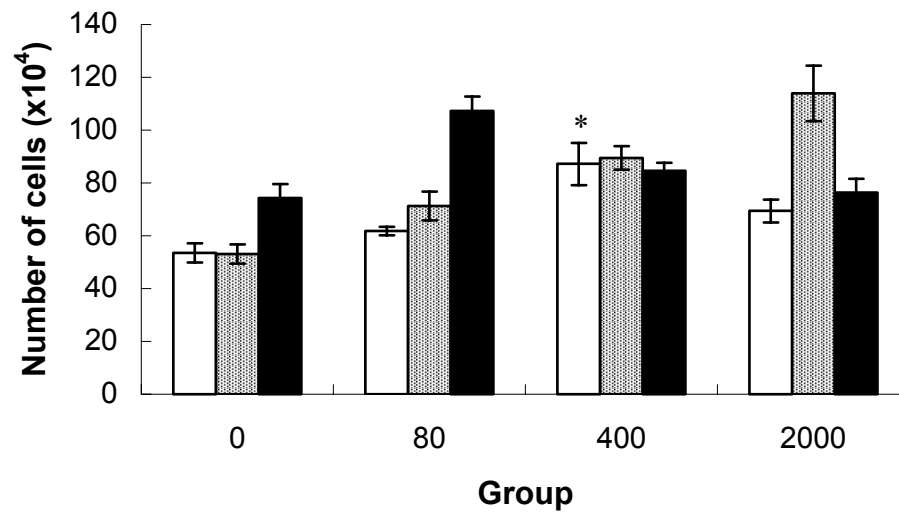


Fig. 7. Number of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland of mice exposed to toluene prior to inhalation of formaldehyde over 3 months (empty bar), NAG (OVA—) mice (gray bar) and AG (OVA+) mice (filled bar) (data of non allergy and allergy mice were quoted from Ref. [16]). Values are mean $\pm$ SE (n=5). *p<0.05 vs. the 0 group (control).

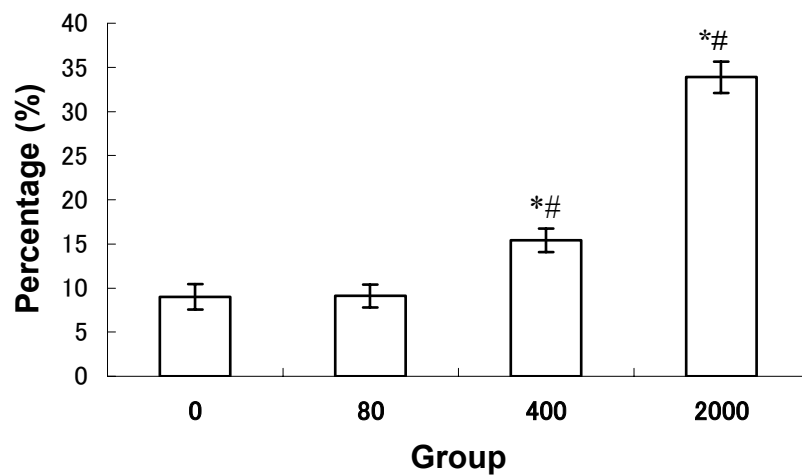


Fig. 8. Percentage of sinusoid area in the anterior pituitary gland of mice exposed to toluene prior to inhalation of formaldehyde over 3 months. The percentage is higher in the 400 and 2000 groups than in the control group. Values are mean $\pm$ SE (n=5). *p<0.05 vs. the 0 group (control) and #p<0.05 vs. the 80 group.

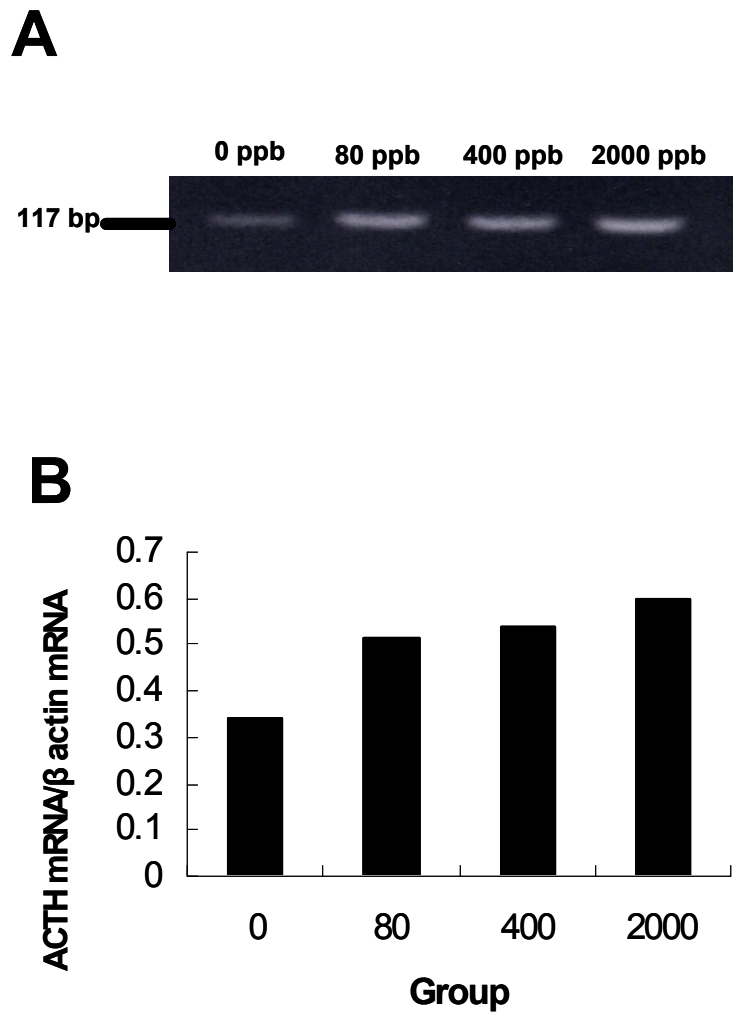


Fig. 9. Expression of ACTH-mRNA in the pituitary gland of mice exposed to toluene prior to inhalation of formaldehyde over 3 months using RT-PCR (A) and the intensity relative to that of β -actin mRNA (B). The size of the amplification bands of ACTH was 117 bp. M, 100-bp ladder. Five pituitaries in each group were mixed and analyzed together.

Table 3. Body weight (g), absolute (mg) and relative weight (adrenal weight/body weight) of the adrenal gland, and volume of pituitary gland of NAG (OAV–) and AG (OVA+) mice.

Groups	Subgroups	BW (g)	AW (mg)	AW/BW (%)	VPG (x10⁶ μm³)
OVA– mice	Control	30.2±0.5	5.9±0.4	19.2±1.7	701.5 ± 5.4
	Toluene	32.0±0.4 ^{*#}	6.4±0.4	19.8±1.0	736.2 ± 2.2
OVA+ mice	Control	30.4±0.5	5.3±0.3	17.8±1.3	703.1 ± 1.7
	Toluene	30.3±0.4 [¶]	6.3±0.4	20.1±1.2	709.5 ±1.7

Data are expressed as mean ± SEM.

*p<0.05 vs. 0 (control) subgroup of NAG mice,

[#]p<0.05 vs. 0 (control) subgroup of AG mice,

[¶]p<0.05 vs. the corresponding subgroup of NAG mice,

BW: body weight,

AW: adrenal weight,

VPG: volume of anterior pituitary gland,

The number of mice in each subgroup is 10 except for VPG (n=5).

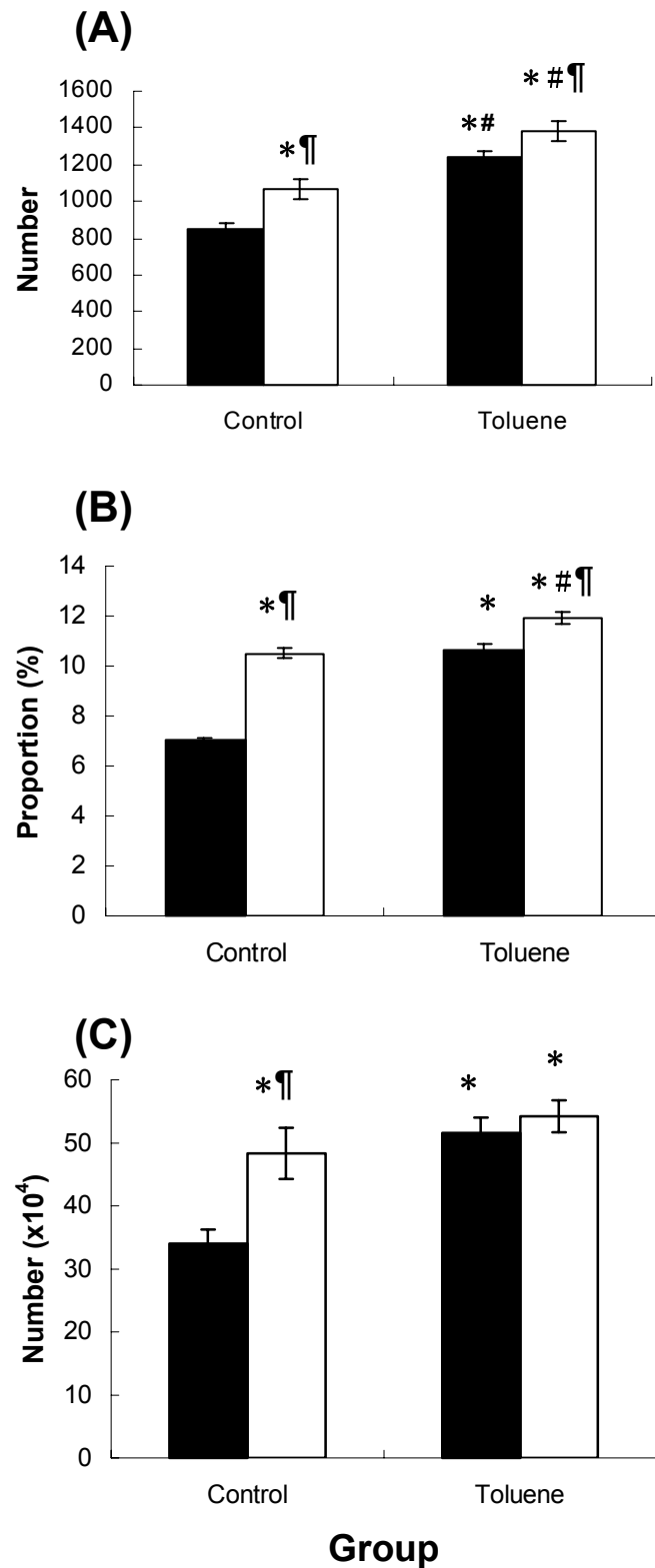


Fig. 10. Number of CRH-ir neurons in the PVN (A), percentage of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland (B) and number of ACTH-ir cells in the anterior pituitary gland (C) of NAG (OVA-) (closed bar) and AG (OVA+) (open bar) mice. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. 0 (control) subgroup of NAG mice, # $p < 0.05$ vs. 0 (control) subgroup of AG mice and ¶ $p < 0.05$ vs. the corresponding subgroup of NAG mice. The number of mice in each subgroup is 5.

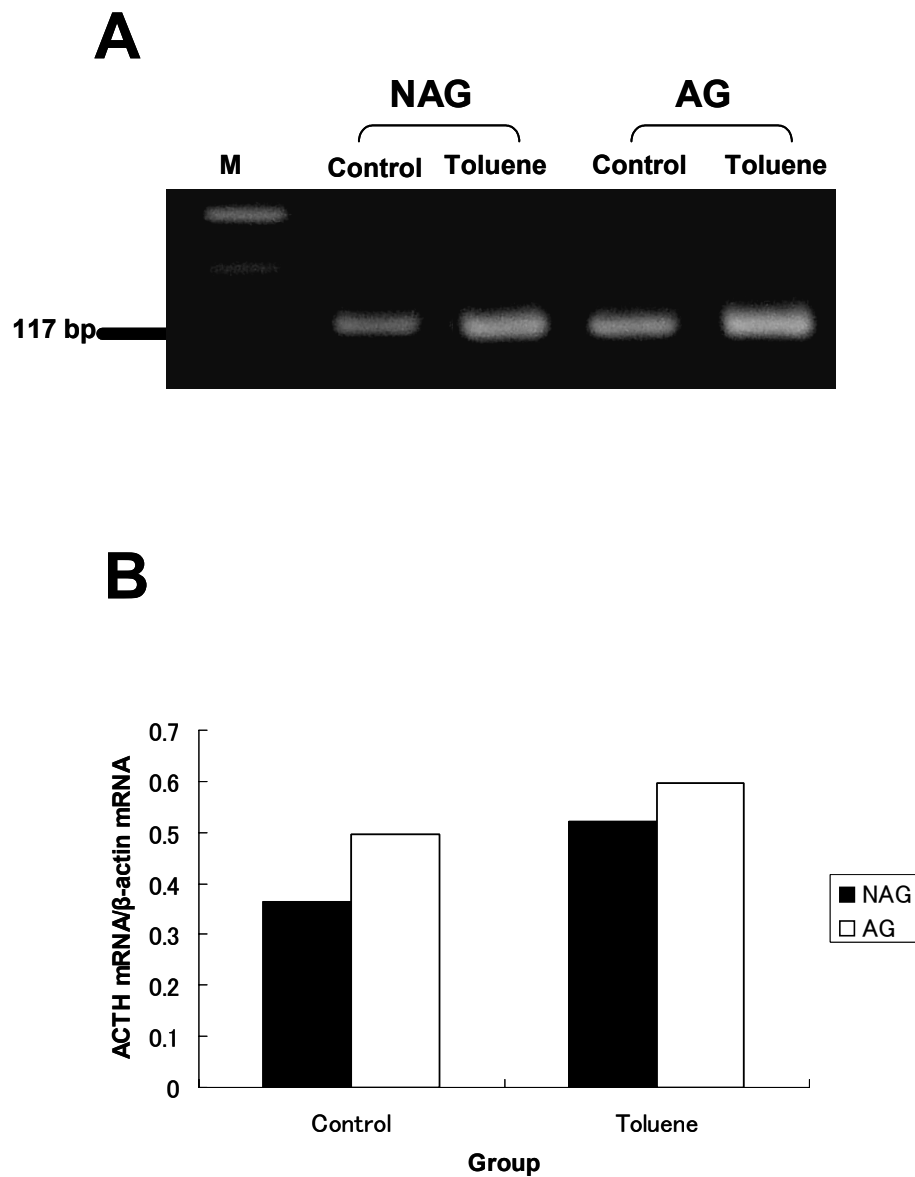


Fig. 11. Expression of ACTH-mRNA in the pituitary gland of NAG (OVA —) and AG (OVA+) mice using RT-PCR (A) and intensity relative to those of β -actin mRNA (B). The size of the amplification bands of ACTH is 117 bp. M, 100-bp ladder.

3. 脳内海馬での情報処理変化の検討

研究協力者 電気生理学的検索

笛田由紀子（産業医科大学産業保健学部）

夏目季代久（九州工業大学大学院生命体工学研究科）

黒河佳香（独立行政法人国立環境研究所）

神経化学的検索

福永浩司（東北大学大学院薬学研究科）

行動学的検索

栗生修司（九州工業大学大学院生命体工学研究科）

形態学的検索

福田孝一（九州大学大学院医学研究科）

免疫学的検討

吉田安宏（産業医科大学医学部）

（１） 過敏症の動物モデル作成における研究班のアプローチ

本態性多種化学物質過敏状態（MCS）と診断された患者共通の中枢神経症状として、頭痛・抑うつ・記憶困難・集中力低下・いらいら感・不安などが以前より報告されている（Miller, 1994; Ashfold and Miller, 1998; Sorg, 1999; ANYAA9 933, 2001）。症状が多種多様な分、メカニズムについても 20 を越える仮説が提唱されている（「室内空気質と健康影響」にある加藤の総説を参照）。『モデル』というからには、多種多様な症状を示す MCS 患者のどのような症状を持つモデルをめざすのかまず議論をし、その中で大脳辺縁系の関与を示唆する仮説に注目した。そして動物を用いた実験で確認できそうな最初の部位として、興奮性の変化に対して脆弱性をもちかつシナプス伝達効率など可塑性が最も詳しく検討されていた海馬の機能を調べることにした（海馬をターゲットに選んだ理由は平成 12 年度報告書に詳細に記載している）。平成 12 年度研究開始当初、高濃度においてすらホルムアルデヒド（FA）曝露動物で海馬神経細胞の機能を検討した報告がまったくなかった。したがって、電気生理学的手法（笛田、夏目、黒河担当）と神経化学的手法（福永担当）を組み合わせることで影響を検討することにした。栗生らの行動試験から得られた 2000 ppb 濃度での長期曝露マウスに関する成果は、情動反応の亢進と回避学習の増加であった。そして、海馬においては、形態学的には顕著な変化はないものの（福田担当）、神経活動の興奮性・抑制系・シナプス伝達の可塑性の変化が観察された。この報告書では、2000 ppb 濃度でのエンドポイントを概説し、量—反応関係について述べ、われわれのメカニズム仮説と従来の仮説との対比を説明した。最後に、本研究課題のために参画した各専門分野の研究者たちが実験中あるいは議論で述べた意見をまとめた。

（２） 2000 ppb のエンドポイントとその量—反応関係について

FA（2000 ppb）長期曝露は成熟雌マウスの不安情動を増強し、回避学習を促進した（2004

年 Society for Neuroscience にて Press Book 用演題として採択)。FA 曝露は一般活動性、空間学習機能、侵害受容には影響しないことから、動物実験においても、MCS 患者の症状のひとつである情動に関する脳機能への影響が示唆された。情動発現には、大脳新皮質と皮質下構造との広い範囲のシグナルコミュニケーションの関与が重要視されている (In: principles of Neuronal Science, 'Emotional states and feelings' by Iversen et al., 2000) なかで、不安情動には主に海馬が関与していると考えられている。

研究開始当初、FA 曝露動物では海馬神経細胞の機能を検討した報告がまったくなかった。したがって、電気生理と神経化学的手法を組み合わせることで影響を検討した。まず 2000 ppb 濃度での影響評価を明確にした。海馬スライスを用いて、興奮性・フィードバック抑制・シナプスの短期増強(STP)・長期増強(LTP)および長期抑圧 (LTD、平成 16 年度の実験) を計測し、細胞内シグナルトランスダクションにおける関連蛋白分子を半定量解析した。その結果、FA 慢性曝露したマウス海馬においては、歯状回で興奮性が亢進し、フィードバック抑制は海馬 CA1 と歯状回で減弱した。この抑制の減弱は、抑制性シナプス伝達物質 γ -アミノ酪酸(GABA)の合成酵素であるアミノ酸脱炭酸酵素(GAD)のサブタイプ GAD67 の低下と一致した (平成 16 年度の実験)。シナプス伝達の可塑性に関しては、STP が減弱した。LTP・LTD (LTD は平成 16 年度の実験) は変化しなかったが、スライスの実験条件 (人工脳脊髄液のカリウム濃度を増加した) を変えると LTP の低下が観察された。海馬 CA1 領野においては、シナプス可塑性と関連している Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) α および β アイソフォームの自己リン酸化反応が亢進していた。STP の低下と CaMKII の自己リン酸化反応の亢進については、曝露群の海馬 CA1 における CaMKII の恒常的活性の上昇が、シナプス伝達の可塑性を発現する能力を頭打ちとした結果として障害したとわれわれは考えている。

曝露濃度を下げた実験では、400 ppb からフィードバック抑制の低下傾向がみられた。条件を修正して測定した LTP の低下については、80、400 ppb でも観察され、量一反応性の linear な関係を示さなかった。また、アレルギーの関与については、400 ppb 濃度で FA 曝露されたアレルギーモデルにおける海馬の LTP や炎症性サイトカインの発現変動の解析をしたがその結果からは明らかにはならなかった。また海馬以外の部位での変化としては、曝露群の大脳皮質でも副腎皮質刺激ホルモンや増殖因子活性化プロテインキナーゼ (ERK) の増加がみられたことから大脳辺縁系以外への FA 曝露の影響も示唆された。しかしながら、2000 ppb で変化したすべての指標について同様の変動を、80、400 ppb 濃度において確認・再現する実験にはいたらなかった。

中毒学と過敏症の違いを『中毒学的濃度レンジにおける閾値の有無あるいは用量反応関係の消失』という観点から考えると、ごく低濃度レベルでも観察された LTP の低下は過敏状態との関係が示唆されると解釈されるかもしれない。さらに、2000 ppb のレベルにおいてすら、今まで報告されていない神経機能変化が見られた事実は、あきらかに FA 曝露による脳内変化を示しており、過敏状態との関連を解き明かす『鍵』を示唆しているのかもしれない。しかしながらいっぽうで、用量反応関係は鋭敏な手法で検討すれば超低濃度でも現れてくるものかもしれないし、脳内で複数因子の関与があれば過敏状態という縦軸に対してあきらかな

閾値としては観察されない可能性も否定できない。さらに、一般的には低濃度になればなるほど個体間における指標値の変動のなかに曝露によって変化した指標値が重なってしまい、曝露によって惹起される事象を対照とする事象と区別して検証することが困難となるため、1群の動物数をもっと増やす必要性も出てくるだろう。このように今回の MCS の動物モデルに関する研究で明らかになった内容は更なる検討が必要なのだと思う。

(3) メカニズムについての仮説

いままでの研究者が報告している中には、『過敏症とは化学物質への不耐の状態であり、それは神経の可塑性と関係があるのではないか』という議論があった (ANYAA9 933, 2001 を参照されたい)。その中でわれわれ研究班に関連した内容としては、Sorg らが ppm オーダーの低濃度 FA 繰り返し曝露が化学ストレスになることを強く示唆したこと (同著 Part II pp: 57-67)、Gilbert が農薬への曝露によって辺縁系関連の行動が発現するまでの仮説を提唱したことだった (同著 Part II pp: 68-91)。

では研究班の結果からどのようなメカニズムが考えられるだろうか。市川らの嗅上皮と嗅球における形態学の所見からは、マウスの脳ではかなり強い刺激として嗅覚が認識されていると解釈できる。嗅覚情報の嗅球からの脳内投射部位は、扁桃体・梨状葉・嗅内野等など、複数の脳内部位へと投射されている。嗅内野とよばれる大脳皮質嗅内野にはさまざまな感覚の情報が集約・統合されている。その統合された神経情報は海馬へと入り、海馬から内側部にある乳頭体・視床その他へと投射される。FA 曝露マウスでは、嗅覚情報が嗅内野でさまざまな感覚情報と集約・統合され、その集約・統合された情報 (興奮性入力) が海馬内に入って増幅され、視床下部の神経活動をストレス反応へと変異させたのかもしれない。一方、市川らが形態変化を検討した扁桃体も、嗅球から直接入力を受け情動発現には重要な役割をすると考えられている。このように海馬を主とした中枢神経系内の複数部位が不安情動反応の変化を生む機構と関連しているのではないだろうか。FA 曝露によるストレス反応の亢進と不安情動の発現はほかの研究でも示唆されている。佐々木らの報告で視床下部のストレス反応が亢進していることが明らかに示された。したがって、実験結果から総合すると、不安情動の亢進やストレス反応にかかわる機構が、過敏状態を引き起こす機構とメカニズムを共有している可能性が考えられる。FA 曝露が、海馬等における神経情報処理機構をも攪乱し、過敏状態になる機構と関連しているのではないかという解釈は、神経可塑性について議論した従来の仮説 (ANYAA9 933, 2001) とは矛盾しない。

MCS のメカニズムについては、患者の症状と実験データから大脳辺縁系の関与を示唆する議論されてきた (Bell, 1994; Miller, 1994; Rossi, 1996; Bell et al., 1999; Sorg, 1999)。さまざまな仮説が提唱されており、なかでも Bell らは大脳辺縁系が関与するキンドリング仮説 (キンドリングとは、初めは何の変化も起こさないような弱い電気刺激を毎日 1 回繰り返し脳の辺縁系に与えることによってほぼ 3 週間後には同レベルの刺激でてんかん発作を起こす現象をいう。キンドリング現象は化学物質の反復投与によっても起こるので、MCS における時間依存的な感受性の亢進を説明する仮説として考えられている) を提唱している。大脳辺縁系キンドリングはてんかんのモデルのひとつである。しかし、FA 曝露によるてんかん発作は観

察されていないし、また、疫学調査でもてんかん患者に MCS が多いという報告もない。むしろ、てんかんと MCS の関係については現在のところ否定的である(Gilbert, ANYAA 9 933, 2001)。しかし、Gilbert らは、てんかん発作の発現には至らないが辺縁系の興奮性の変化が、MCS の発達と発現における不安情動の役割に関係しているのではないかと考察している。われわれの実験結果で観察された海馬興奮性の増加・抑制の減弱は、はからずもこの Gilbert の推論を裏つけることとなったわけである。しかし、動物キンドリングモデルでは通常シナプス伝達増強現象が観察されている。われわれの曝露実験結果では STP は低下、LTP は変化なし（実験条件を変えると低下した）という結果であった。これは矛盾というよりは、『曝露群の海馬 CA1 における CaMKII の恒常的活性の上昇が、シナプス伝達の可塑性を発現する能力を頭打ちとした結果として障害した』と私達は考えている。この点はキンドリングモデルと異なる。

（４）平成１６年度の新たな知見

4-1 横断研究

４年間の研究で変動する指標がみいだされた嗅球の TH ニューロンの増加（市川らの班）、脳下垂体の ACTH 発現量の増加（佐々木らの班）、海馬の神経伝達物質受容体発現量（藤巻らの班）、嗅球の TH 蛋白量解析、抑制の減弱を同一個体で調べることにした。その結果、群間で傾向が一致したのは、歯状回の抑制の減弱と興奮性シナプス伝達受容体のひとつである NMDA 受容体のサブタイプ構成比であった。しかし、個体における相関は明らかにならなかった。

4-2 GABA 系関連蛋白分子の変動

平成 15 年度までの研究で、FA 曝露（2000 ppb）によって海馬 CA1 と歯状回ではフィードバック抑制が減弱することがわかった。１－ブロモプロパンの吸入曝露によってもフィードバック抑制の減弱が用量依存性に観察され、GABA シナプス間隙における GABA 滞在確率の減少したことが原因で減弱したことが示唆された（Fueta et al., 2002, 2004）。福永らは、2000 ppb FA 曝露マウスにおいてアミノ酸脱炭酸酵素(GAD)（抑制性シナプス伝達物質γ-アミノ酪酸(GABA) は GAD によってグルタミン酸から合成される）のサブタイプ GAD67 の低下を見出した。興奮と抑制の攪乱が伝達物質合成に生じたことが示唆された。

4-3 LTD への影響

STP、LTP などシナプス伝達が増強される現象のみでなく、低下する現象（LTD）に関して検討した。一般的に成熟した動物では LTD は捉えにくい報告が多いが、比較的よく用いられる刺激条件（ペアパルスで 1Hz 刺激を 15 分間）で行った。結果は 2000 ppb 曝露群と対照群の LTD には差は認められなかった。

（５）動物モデルに与えられた問いに対する意見

MCS の動物モデルの作成というミッションに関して議論にのぼった主な内容を述べる。

そもそも MCS は頻度が低い。しかも男性よりも女性の頻度が高いという。動物モデル班では 10 週令の雌マウスに曝露を開始したが、性ホルモンレベルはシナプス伝達可塑性・抑制性シナプスへの修飾・受容体蛋白発現調節などの報告もあり、性差の問題、性周期の問題はいつも議論にのぼった。結局、膣スメアによる性周期のモニターはかえって刺激になる可能性が懸念され、4 年めに行われた組み合わせ実験において解剖日にのみ膣スメア観察が実行された。しかし性周期による影響の有無の判定は困難であった。更年期女性に頻度が高いという疫学調査であったが、初めての実験ということもあって性周期をもつ週令の雌をもちいた。疫学調査結果が今も正しいのであれば今後の実験はエストロゲンレベルをコントロールした動物も使用したほうが良いのではないかと思われた。

『過敏な状態』とはいったいどのような状態を想定するのかという議論もあった。低濃度曝露における閾値の有無の議論は、ハザード性がもっとも検討されてきた分野のひとつである『発がん』でも遺伝毒性の有無で閾値の有無を考えるというメカニズムベースになっているようだ。われわれの議論では、『過敏症の証明には組み合わせ実験も必要なのではないか』という提案があった。実際にアレルギーモデルと曝露モデルに関して組み合わせ実験を行ったが過敏状態を実証できなかった。単独モデルでの変動よりも組み合わせモデルでの変動が大きければ過敏状態にアプローチできたかもしれない。あるいは、Bell らの提唱する『時間依存性』を考慮したモデルとして、曝露停止後の再チャレンジにおける感受性の変化をみるという方法で過敏な状態を検討できるのかもしれない。

4. 低濃度長期ホルムアルデヒド及びトルエン曝露の免疫系、及び神経—免疫軸への影響についての検討

研究協力者 藤巻秀和、黒河佳香、山元昭二、掛山正心（独立行政法人国立環境研究所）
櫻田尚樹（産業医科大学）

（１）研究目的

MCSの発症と低濃度化学物質曝露との関連について検索するためには、アレルギー反応とは異なる過敏状態の誘導の有無について調べることは大変重要である。MCS患者の中にはアレルギー疾患の既往歴のある人が60%近く含まれるという報告もみられているので、MCSの発症と免疫系との何らかの関連性が推測された。

化学物質の曝露による過敏状態とアレルギー性炎症モデルでの反応指標（IgE抗体産生、Th2タイプの優位性、肥満細胞活性化等）との違いについて明らかにするために、ホルムアルデヒドのみの曝露群と抗原を腹腔内投与とエアロゾルで感作しながらホルムアルデヒドを曝露したアレルギーモデル群における免疫応答を比較検討した。また、神経—免疫軸における反応のかく乱がMCSの発症に関わることが示唆されていたので、神経栄養因子や神経伝達物質レベルでの変動についても検討した。

（２）研究方法

すでにこれまでの報告書に詳述してあるので、省略。

（３）主な研究結果

3-1 肺における炎症性反応の解析

肺における炎症反応の指標として考えられる肺胞洗浄液中における炎症性細胞の集積とその中のサイトカイン・ケモカイン産生についてホルムアルデヒド曝露について調べた結果、ホルムアルデヒド曝露のみ（抗原無群）では肺胞洗浄液中の炎症性細胞数や proinflammatory サイトカインレベルで変動はみられなかった。しかしながら、アレルギーモデル群の 2000ppb 曝露群では有意な炎症性細胞の増加が見られた。集積した炎症性細胞の分類では肺胞マクロファージと好酸球の数の有意な増加がみられた。

次に、肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン産生について、アレルギーモデルマウスの IL-1 β 産生は濃度依存的な低下を示し 2000ppb 曝露群で有意に低下した。IL-6 と TNF α 産生でも同様に低下の傾向がみられたが、統計学的には差はなかった。炎症性細胞の集積や活性化に関与するケモカイン産生では、MIP-1 α と MCP-1 産生においては抗原の感作の有無に関係なくホルムアルデヒド曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

トルエン曝露の結果では、トルエン曝露のみで肺胞洗浄液中の総細胞数とマクロファージ数は有意に増加したが、好中球とリンパ球などでは差はみられなかった。アレルギーモデルマウスにトルエン曝露を行うと、肺胞洗浄液中での炎症性細胞の集積においては、トルエン曝露による有意な増加は認められなかった。トルエン曝露のみでは肺胞洗浄液中の IFN- γ 産生量

の有意な低下がみられたが、TNF- α では差はみられなかった。

3-2 脾臓でのリンパ球亜集団の変動と Th1/Th2 サイトカイン産生の解析、及び血漿中の伝達因子の解析

リンパ性器官である脾臓と血中におけるリンパ球亜集団のホルムアルデヒド曝露による変動をフローサイトメトリー分析した。その結果、今回用いた曝露濃度では CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞と CD19 陽性 B 細胞の割合において、曝露群とコントロール群との差はみられなかった。Th1/Th2 サイトカイン・ケモカインの産生への影響を脾臓細胞を 48 時間培養してその上清中で調べたが、IL-4、IL-5 及び IFN- γ 産生においては、ホルムアルデヒド曝露による有意な変化はみられなかった。

次にマクロファージ、樹状細胞、抗原提示細胞から主に分泌されるケモカインのうち、Th1 タイプの誘導にかかわるケモカインである MIP-1 α と Th2 タイプの誘導にかかわる MCP-1 について 24 時間培養後の培養上清で調べた。MIP-1 α では抗原刺激による差はみられなかったが、Th2 タイプの誘導にかかわる MCP-1 の産生では、濃度依存的に上昇し 400ppb と 2000ppb 曝露群で有意な増加が認められた。

なお、ホルムアルデヒド曝露のみでは、血漿中の MCP-1 産生に低下が見られ、2000ppb では有意であった。しかしながら、アレルギーモデルマウスでは、低下傾向がみられたのみであった。好中球の走化性にかかわる KC ケモカインの産生を調べると、免疫していないマウスで、ホルムアルデヒド濃度依存的な増加（2000 ppb では有意）がみられた。末梢神経の終末より分泌され NGF により増加し炎症の誘導に関与する Substance P について血漿中で検討した。免疫していないマウスの血漿中では、ホルムアルデヒドの濃度依存的に Substance P の増加が認められた。しかしながら、免疫したマウスへのホルムアルデヒド曝露では、曝露による低下傾向が認められた。

トルエン曝露による脾臓でのサイトカイン mRNA の発現について、リアルタイム PCR で検討した。その結果、抗原感作なし群では対照群とトルエン曝露とで変化は認めなかったが、抗原感作したアレルギーモデルマウスでは IL-12mRNA の顕著な低下がみられ、IL-4 も低下傾向を示した。

3-3 血中抗体価の変動解析

全身の免疫系への影響指標としての血漿中の抗原特異的抗体価と総抗体価を ELISA 法によって測定した結果では、総 IgE 抗体価においてホルムアルデヒド曝露のみの群では増加傾向がみられたが、抗原感作群へのホルムアルデヒド曝露では有意な差はみられなかった。抗原特異的 IgE 抗体価、IgG1 抗体価、IgG2a 抗体価においては再現性のある有意な差は認めなかった。

トルエン曝露したマウス血漿中の OVA 特異的な抗体価を測定すると、抗 OVA IgG2a で有意な増加がみられたが、IgE、IgG1 レベルでは差はみられなかった。血漿中の総抗体価においては、トルエン曝露による IgE 抗体価で有意な増加がみられた。

3-4 脳内サイトカインと神経栄養因子の変動

脳における炎症性サイトカイン等の産生への影響を調べるために、ホルモン分泌の調節機能をもつ下垂体、記憶にかかわる海馬、情報の受け取りに重要な線条体を取り出しそれぞれの領域における産生量を測定した。ホルムアルデヒドのみの曝露、あるいは抗原感作とホルムアルデヒド曝露によるそれぞれの領域での産生において、IL-6、TNF α 、IL-1 β 、IL-12p40、TGF β のいずれにおいても曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

脳における神経栄養因子産生への影響を調べるために下垂体、海馬、線条体の組織でのNGF産生についてホルムアルデヒドのみの曝露、あるいはアレルギーモデルにホルムアルデヒド曝露したマウスで検討した。その結果、抗原吸入感作しホルムアルデヒド曝露したマウスの海馬において400ppbで有意な増加を認めた。下垂体と線条体では海馬と比べると低い産生量を示し曝露群とコントロール群との間に変化はみられなかった。ホルムアルデヒド曝露のみのマウスでは、下垂体や線条体と同様海馬においても差はみられなかった。NGFと同様な働きをもつBDNFの産生量についても下垂体、海馬、線条体で検討した。BDNF産生量はホルムアルデヒドのみを曝露したマウス、あるいは抗原感作とホルムアルデヒド曝露したマウスでも下垂体と線条体での産生量は非常に低く、また海馬においても曝露群と対照群とで差はみられなかった。

そこで、低濃度ホルムアルデヒド曝露と抗原感作による海馬でのNGF mRNAについて検討した。蛋白レベルの結果と同様に、対照群と比べて、80と400ppb曝露群での顕著な発現増強が見られた。2000ppbでは対照群と同程度の発現であった。

海馬を含む前額断切片についてNGFの免疫組織化学的検討を行った。対照群の海馬ではCA1領域からCA3領域にかけて、また歯状回の細胞においてNGF陽性反応が認められた。この発現パターンは、神経細胞を特異的に染色するニッスル染色の発現パターンと酷似していることから、NGFの発現は神経細胞に特に強く見られることが確認された。一方400ppb曝露-OVA(+)群では、対照群と比較して明らかなNGF発現増強が認められた。

3-5 神経—免疫軸での神経伝達物質受容体解析

RT-PCRによる半定量では、海馬と扁桃体で比較した。ドーパミン受容体D1受容体mRNAは、トルエン曝露により有意な上昇がみられた。D2受容体mRNAは、ホルムアルデヒド曝露により対照群と比較して有意な上昇が認められた。NMDA型グルタミン酸受容体サブユニット ϵ 1 mRNAは、OVA刺激による有意な上昇がみられ、ホルムアルデヒド曝露により発現が上昇し、すなわちOVA刺激とホルムアルデヒド曝露の相加効果が見られた。 ϵ 2 mRNAは、ホルムアルデヒド曝露では有意な低下がみられたのに対し、アレルギーモデルでは顕著に上昇した。扁桃体では、アレルギーモデルマウスへのホルムアルデヒド曝露で ϵ 1、 ϵ 2の増加、D1の増加が認められた。D2には変化は認められなかった。

C3Hマウスの海馬を含む前額断切片についてNMDAR2Aの免疫組織化学的検討を行った。

400ppbホルムアルデヒド曝露したアレルギーモデルマウス海馬のNMDAR2Aは、対照群に比べて強く発現する傾向が認められた。

3-6 肥満細胞欠損マウスを用いた研究結果

1 肺胞洗浄液中での炎症性細胞の変動については、+/+マウス（肥満細胞が正常に存在している）では対照群と比べホルムアルデヒド曝露群で肺胞マクロファージの数に顕著な増加がみられた。W/W^v マウス（肥満細胞が欠損している）では、肺胞マクロファージの数には影響がみられないものの、好酸球とリンパ球においてホルムアルデヒド曝露による有意な増加が認められた。

2 脾臓細胞における Th2 タイプのサイトカインである IL-4, IL-5, IL-10 の産生では、ホルムアルデヒド曝露群と対照群とで有意な差はみられなかった。Th1 タイプのサイトカインである IFN- γ 産生量の比較でもホルムアルデヒド曝露の影響はみられなかった。

3 抗原特異的抗体価の変動について、血漿中での抗 OVA IgE 抗体価、抗 OVA IgG1 抗体価については、両系統でまったく曝露の影響は認められていない。抗 OVA IgG2a 抗体価においては、+/+ マウスでは曝露の影響は見られず、W/W^v マウスにおいてはホルムアルデヒド曝露群の方がやや増加傾向を示したが、有意差はみられなかった。

4 血漿中でのサイトカインの変動では、好酸球の活性化因子であり、アレルギー反応の増悪に関連する IL-5 については、+/+ マウスではホルムアルデヒド曝露による低下傾向がみられ、W/W^v マウスにおいては逆にホルムアルデヒド曝露群の方がやや増加傾向を示したが、ともに有意な差はみられなかった。KC ケモカインと単球、活性化した T 細胞、未熟樹状細胞などのケモカインである Th2 タイプの反応に関連する MCP-1 を測定した結果、KC 産生では+/+ マウスでの変動はなく、W/W^v マウスではホルムアルデヒド曝露による増加傾向がみられた。MCP-1 産生では、ホルムアルデヒド曝露による有意な差はみられなかったが、W/W^v マウスではホルムアルデヒド曝露による増加の傾向が認められた。

（4）考察

アレルギー反応とは異なる過敏状態の誘導の有無について調べることを当初の目的に研究を開始した。本研究で用いた 80, 400, 2000ppb の低濃度のホルムアルデヒド曝露のみでは、呼吸器、胸腺、脾臓、血液中の免疫指標に顕著な変化はみられなかった。しかしながら、抗原の吸入感作により免疫系を活性化した状態のアレルギー性炎症モデルマウスにホルムアルデヒドを曝露するといくつかの指標において変動が認められた。2000ppb 曝露群で抗原の吸入感作を行うことにより炎症性細胞の集積が肺胞洗浄液中でみられ、400ppb と 2000ppb 曝露マウスの脾臓細胞からの MCP-1 産生の増加もみられた¹⁾。また、IL-1 β の肺胞洗浄液中の低下も認められた。これらは、いずれも濃度—依存性を示した。しかしながら、これまでに報告されたホルムアルデヒド曝露による I 型アレルギー反応が亢進する作用²⁾ については IgE 抗体レベル、Th2 タイプのサイトカイン産生レベルでは認められなかった。この理由として、ホルムアルデヒドの曝露期間、曝露様式、抗原感作条件、系統差などの違いが関与している可能性が考えられる。今回われわれが用いた C3H マウスは、環境化学、免疫学、薬物学では通常用いられ、IgE 産生系も応答性は低くない系統である。

本研究で、OVA 抗原感作したマウスに低濃度ホルムアルデヒドを曝露することで、脳内の NGF

産生が増強することを明らかにした。また、OVA抗原単独あるいはホルムアルデヒド曝露単独ではこのNGF増強は顕れないことから、免疫刺激とホルムアルデヒド曝露が複合的に作用することで、脳においてはじめて影響が顕れることが示唆された。さらに詳細に解析するために、NGF mRNAの発現を海馬で調べ、メッセージと蛋白レベルでの増強が確認できた³⁾。このNGF増強について免疫組織化学的手法を用いて再検証したところ、400ppb ホルムアルデヒド曝露とOVA刺激により、海馬においてNGF陽性反応の増強が確認できた。化学物質曝露が及ぼす影響を調べる際に、海馬のNGF発現は極めて鋭敏かつ信頼性の高い指標になる可能性が示唆された。

NGF は、末梢の交感神経の発生や中枢神経系のコリン作動性ニューロンの発生と維持、中枢神経組織の損傷修復、また、神経、免疫、内分泌間での相互作用の調節にも関与していると考えられている。ところが、BDNF においてはNGF のような増強はみられなかったので、栄養因子に共通した影響ではないと考えられる。NGF については、最近、線維芽細胞やケラチノサイトのみならずT細胞やB細胞などのリンパ球、マクロファージ、肥満細胞、好酸球なども産生することが報告されている⁴⁾。NGF は、IL-6 産生を亢進し、TNF α 産生は抑制するとの報告もみられ、サイトカインの制御機構にも関与していることが示された。OVA を抗原として使用したアレルギー性喘息モデルマウスにおいて IL-4 や IL-5 産生の増加や IgE 産生の亢進と共に血清中、肺胞洗浄液中の NGF の増加が報告されている^{5) 6)}。また、NGF はサブスタンス P の産生を増強し、肥満細胞を活性化することにより炎症に関与し、さらに痛覚過敏や喘息にかかわる気道平滑筋の過敏反応にも関連があるという。

これまでの低濃度ホルムアルデヒドを曝露することでみられた免疫系、あるいは脳神経系の変化が化学物質特異的か否かを検討するために、低濃度トルエン曝露をおこない比較検討した。トルエンの12週間曝露は肺における炎症性細胞、中でもマクロファージ数の増加においては有意な差がみられ、サイトカインとしてのIFN- γ における変動が観察された。しかしながら、アレルギーモデルマウスへのトルエン曝露においては、アレルギー反応にかかわる抗原特異的IgE抗体やIL-4サイトカインでの増加はみられずアレルギー反応の増強効果はみられなかった。また、脳内海馬でのNGF産生においてもホルムアルデヒド曝露で観察されたような増加は認められなかった。今回の濃度のトルエン曝露では、ホルムアルデヒド曝露と同様な過敏状態は認められない。

NGF の発現増強は、脳が慢性的あるいは亜慢性的に変化している可能性を示している。また、NGF の発現は、*c-fos* の発現により調節を受けており、*c-fos* の発現はNMDA やドーパミン受容体の働きにより誘導されることが報告されている^{7, 8)}。そこで次に、神経伝達物質(グルタミン酸およびドーパミン)受容体 mRNA の発現量を調べたところ、400ppb ホルムアルデヒド曝露及び抗原感作により、海馬においてNMDA型グルタミン酸受容体のサブユニットやドーパミン D1 受容体 mRNA の増加が認められた。また、扁桃体では ϵ 1 mRNA、 ϵ 2 mRNA、D1 受容体 mRNA の増加が認められた。

海馬は記憶形成の部位であり、またNMDA型受容体は記憶形成・保持に重要な働きをもつことが示唆されており、このサブユニット構成が海馬において変化したことは、脳の記憶形成機構に変化が生じた可能性を示唆している。また扁桃体は情動の中心的な部位であり、 ϵ 1、 ϵ 2、D1の増加は、情動機能の変化の可能性を示唆すると考えられる。

今回の研究で、低濃度ホルムアルデヒド曝露により海馬の神経伝達物質受容体 mRNA の発現が大きく変動することが確認された。また、トルエン曝露の影響と OVA 刺激による変動について調べたところ、興味深い結果が得られた。トルエン曝露により D1 受容体 mRNA の発現量はホルムアルデヒド曝露よりも大きな変化が見られたが、他の D2 受容体、 $\epsilon 1$ 及び $\epsilon 2$ サブユニットの発現量はトルエン曝露の影響がみられなかった。以上のことから、ホルムアルデヒド曝露による D2、 $\epsilon 1$ 及び $\epsilon 2$ の変化はホルムアルデヒド曝露特異的である可能性が考えられる。神経伝達物質 mRNA の発現変動は、その細胞が蛋白質発現量を変化させようとした能動的な変化を反映していると考えられる。NMDA 受容体は神経系における記憶形成に主要な役割をもつと考えられており、Pa11 (2002)⁹は、MCS における化学物質に対する感受性亢進に NMDA 受容体が関与するのではいかという仮説を提唱している。今回得られた、免疫系刺激と低濃度ホルムアルデヒド曝露による海馬 NMDA 受容体サブユニット mRNA 量の変化はこの仮説を強く支持するものと考えられる。

これまでの神経伝達物質の研究から、トルエン曝露はホルムアルデヒド曝露とは異なる過敏な状態に関与する可能性が考えられるが、どちらの曝露の場合も抗原 OVA 刺激が加わることでより過敏な状態を誘導しやすいことを示唆している。

NGF はサブスタンス P の産生を増強し、肥満細胞を活性化することにより炎症に関与し、さらに痛覚過敏や喘息にかかわる気道平滑筋の過敏反応にも関連があるという報告もみられる¹⁰。しかしながら、アレルギー反応の発症に重要な肥満細胞への影響に関して、鼻粘膜や肺における肥満細胞の数に変化がみられなかったこと、肥満細胞欠損マウスと正常対照マウスとで曝露による差がみられなかったことから、肥満細胞への影響はあまりみられないと思われる。また、抗原刺激とホルムアルデヒド 2000ppb 曝露による肥満細胞欠損マウスへの影響についての解析でくしゃみ様症状に増加がみられなかったことから、C3H マウスの行動変化としてみられたくしゃみ様症状の増加に肥満細胞はあまり積極的には関与していないことが示唆された。

(5) まとめ

低濃度ホルムアルデヒド曝露により、アレルギー反応の誘導にかかわる炎症性反応の指標の増強は認められなかった。ただし、海馬内における一部の神経伝達物質の mRNA レベルでは動きがみられた。アレルギーモデルに低濃度ホルムアルデヒド曝露を併用すると、2000 ppb レベルでは炎症性の反応指標の動きに有意な変化がみられた。しかしながら、これらの変化はアレルギー反応の増悪作用とは異なっていた。特に、これまで明らかになっていなかった神経栄養因子や神経伝達物質において非常に低い曝露濃度に依存しない動きが見られたことは、脳内の他の領域でみられている反応の異常と関連して過敏な状態の誘導に関わっている可能性を示唆していると考えられる。

(6) 参考文献

1. Fujimaki H, Kurokawa Y, Kunugita N, Kikuchi M, Sato F, Arashidani K. Toxicology 2004, 197,1-13.

- 2 . Tarkowski M, Gorski P. *Int Arch Allergy Immunol* 1995,106,422-424.
- 3 . Fujimaki H, Kurokawa Y, Takeyama M, Kunugita N, Fueta Y, Fukuda T, Hori H, Arashidani K. *Neuroimmunomodulation* 2004,11,373-375.
- 4 . Stanisz A M, Stanisz J A. *Annals of The New York Academy of Sciences* Vol.917 pp268-272 ,2000.
- 5 . Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H. *Eur J Immunol* 1998,28,3240-3251,1998.
- 6 . Aoe, L., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Manni, L. *Allergy* 1997, 52, 883-894.
- 7 . Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., Rüther, U., Wagner, E. F., Thoenen, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*1990,87,3899-3903.
- 8 . Morgan, J. I., Curran, T. *Annu. Rev. Neurosci.* 1991, 14, 421-451.
- 9 . Pall ML. *FASEB J.* 2002 16, 1407-17.
- 10 . Donnerer, J., Schuligoi, R., Stein, C. *Neurosci.* 1992, 49,693-698.

5. ホルムアルデヒド曝露後の自発運動量の観察、およびホルムアルデヒドあるいはトルエン吸入曝露によるマウスのくしゃみ様症状の定量

研究協力者 檜田尚樹、笛田由紀子、嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

（１）研究目的

MCS の動物モデルとして行動毒性モデルが検索手段のひとつとして検討されている。ここでは、アンビュロメーターを用いて、曝露期間内での自発運動活性の一種である移所運動活性の変化と 3 ヶ月曝露終了時の中枢刺激薬による感受性亢進の有無について検討した。

また、ホルムアルデヒド曝露により、濃度依存的にくしゃみ様症状の増加が観察されたので、この症状がホルムアルデヒド特異的な現象なのかトルエン曝露群との比較から検討した。くしゃみの機序の解明を目指してホルムアルデヒド曝露終了後にカプサイシンを点鼻してくしゃみの誘導の差異を比較した。

（２）研究方法

1. 移所運動活性の測定： 曝露開始 1 ヶ月、2 ヶ月の時点で無刺激の自発運動活性を、3 ヶ月終了時点において中枢刺激薬として antidepressant の bupropion hydrochloride (10mg/kg) の皮下投与を行い移所運動活性を、それぞれ群大式アンビュロメーターを用いて測定した。なお、測定は明期の午前 10 時頃から午後 4 時頃までの時間に行った。アンビュロメーターはマウスを入れるバケツ型の容器の底の中心に釘を立て、中のマウスが移動することでバケツが傾くのをマイクロスイッチで検知して数値化する簡単な構造で、動物の自発運動活性のうち移所運動活性を評価する機器である。

2. くしゃみの定量法： 2 ヶ月、および 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。

さらに 3 ヶ月曝露終了時点の観察においては、無髄神経線維である C 線維よりサブスタンス P やタキキニンなどの神経ペプチドを放出し咳嗽刺激を引き起こすことが知られておりカプサイシンを 10mM, 10 μ l を点鼻し、点鼻 10 分後から 15 分間のくしゃみの誘導の差異を観察した。

（３）研究結果

1. 移所運動活性： 図 1 に曝露 1 ヶ月時点における、測定器にセットされた時点から最初の 1 時間の移所運動活性を示す。各群間に相違は認めなかった。

同様に図 2 には曝露 2 ヶ月時点での移所運動活性を示す。最初の 1 時間の合計カウントは、分散分析の結果、群間において差を認め、2000ppb だけがコントロール群より有意に高いカウント数を示した。図 3 に 3 ヶ月曝露終了時点での移所運動活性の変化を示す。今回はマウスを測定機器に入れて最初の 30 分間の順応時間をおいた後に、bupropion (10mg/kg) を皮下投与し引き続き 1 時間の行動量の変化を観察した。その結果、最初の 30 分間の順応期間中の

自発運動活性は先の 2 ヶ月時点と同様に 2000ppb 群において高い値を示した。bupropion 刺激後はいずれの群も運動量の増加を認めたが、その経時変化はいずれの群でも同様であった。図 4 に bupropion 刺激後 1 時間のカウント合計を示しているが、多重比較検定の結果、2000ppb 群のみが 0ppb コントロール群より高値を示した。またルームコントロールにおいたマウスは 0ppb コントロール群とほぼ同様の反応を示しとくに相違を認めなかった。

2. くしゃみの変化：

1) **ホルムアルデヒド曝露**：曝露 2 ヶ月時での C3H/HeN マウスのくしゃみの回数を図 5 に示す。この時点ですでに、曝露濃度依存的なくしゃみの増加が観察された。曝露終了時点でのくしゃみの回数は図 6 に示すように、回数はさらに増加し濃度依存性をきれいに認めた。加えて OVA の感作により、非感作群に比べ有意な増加を認めた（平成 13 年度）。これらの結果は、平成 14 年度においても図 7 に示すように繰り返し同様に観察された。一方、淡白抗原である OVA で免疫した群と異なり、ホルムアルデヒド曝露開始の前にトルエンの前曝露を 500ppm、昼間に 6 時間、連続 3 日間吸入曝露で実施した群においては、ホルムアルデヒド曝露単独群と相違を認めなかった（図 8：平成 14 年度）。

2) **トルエン曝露**：トルエン単独 50ppm12 週間曝露時のくしゃみの回数を図 9 にホルムアルデヒド 2000ppb 群と一緒に示す。2000ppb ホルムアルデヒド曝露群は他の 4 群いずれに対しても有意にくしゃみの増加を認めた。しかし、ホルムアルデヒド曝露群をのぞいた 4 群間に関しては、群間に差を認めなかった。すなわちトルエン曝露はマウスにくしゃみを誘発することはなかった。

3) **カプサイシン点鼻の影響**：OVA で免疫感作した群においては、これまでの観察同様にホルムアルデヒド曝露によるくしゃみの誘発が増幅されている傾向が示された。これらマウスに、ごく微量のカプサイシンを点鼻したところ、無処置コントロールマウスでは有意なくしゃみの誘発が引き起こされたが、ホルムアルデヒド曝露群、および OVA 感作群ではくしゃみの有意な増加は認めなかった（図 10）。

(4) 考察

昨年度までの観察で、ホルムアルデヒド曝露により比較的鋭敏に観察される指標としてくしゃみが見出されたが、今年の観察でも再現性よく観察された。一方、12 週間曝露実験を行ったトルエンによつては 50ppm とホルムアルデヒドに比較しては高い濃度においてもくしゃみの誘発は観察されず、化学物質による特異性が見出された。

ホルムアルデヒドにより誘発されるくしゃみは、その後のカプサイシン刺激では増幅されなかった。このことは、2000ppb という比較的低濃度のホルムアルデヒドの長期的な曝露が、C 線維に対する刺激として働き、その結果サブスタンス P などの分泌が促されくしゃみを誘発しているが、さらにカプサイシン刺激を加えてもコントロール状態と異なり C 繊維よりのさらなる神経ペプチドの分泌を促すことがなかったものと考えられる。

図 1 最初の60分間のカウント合計(曝露1ヶ月)

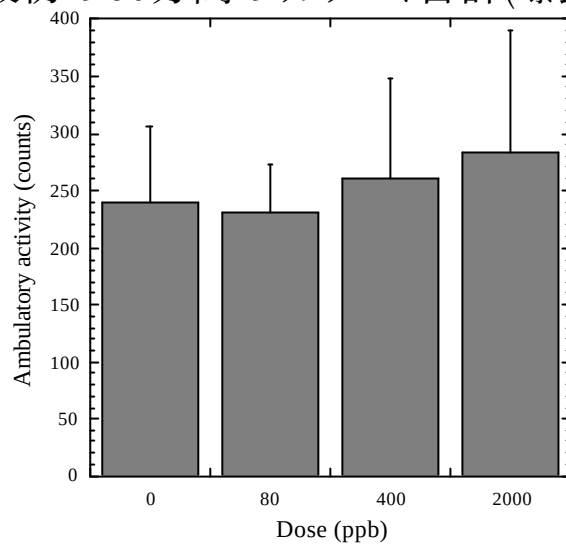


図 2 最初の60分間のカウント合計(曝露2ヶ月)

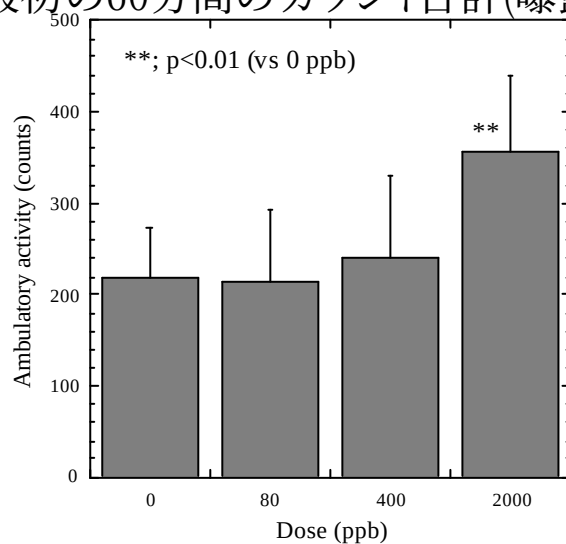


図 3 Bupropion投与前30分間のカウント合計

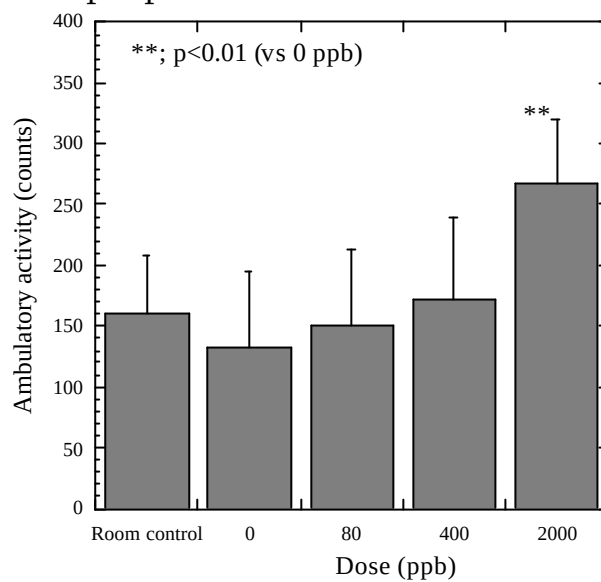


図 4 Bupropion投与後40分間のカウント合計

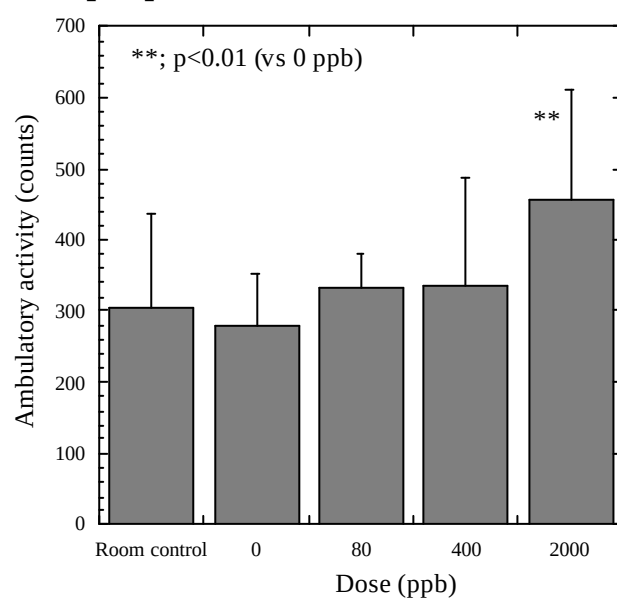


図5 曝露2ヶ月時点でのくしゃみ回数

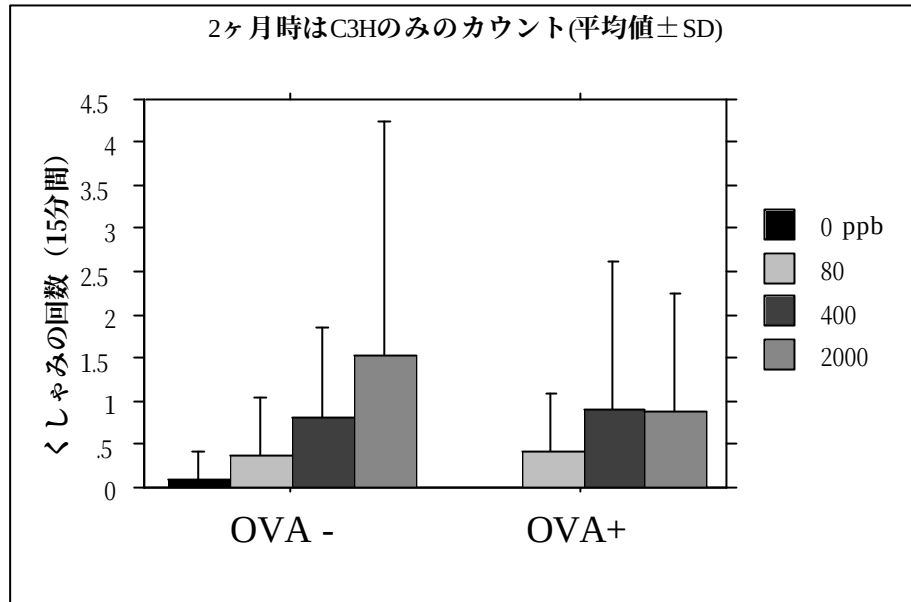


図6 曝露終了時点でのくしゃみの回数
(C3H/HeNのみについてOVAと濃度の関係)

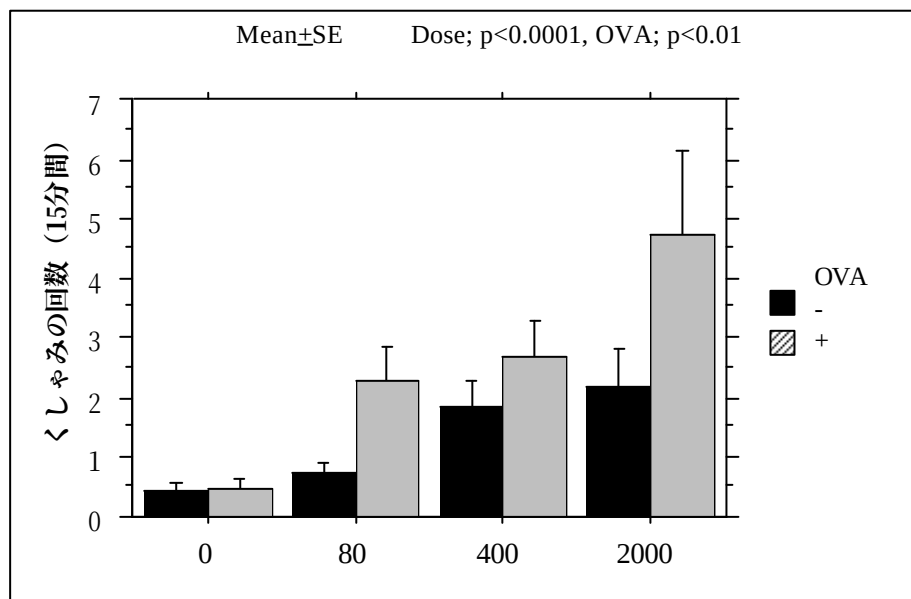


図7 OVA感作処理マウスの曝露終了時点でのくしゃみの回数

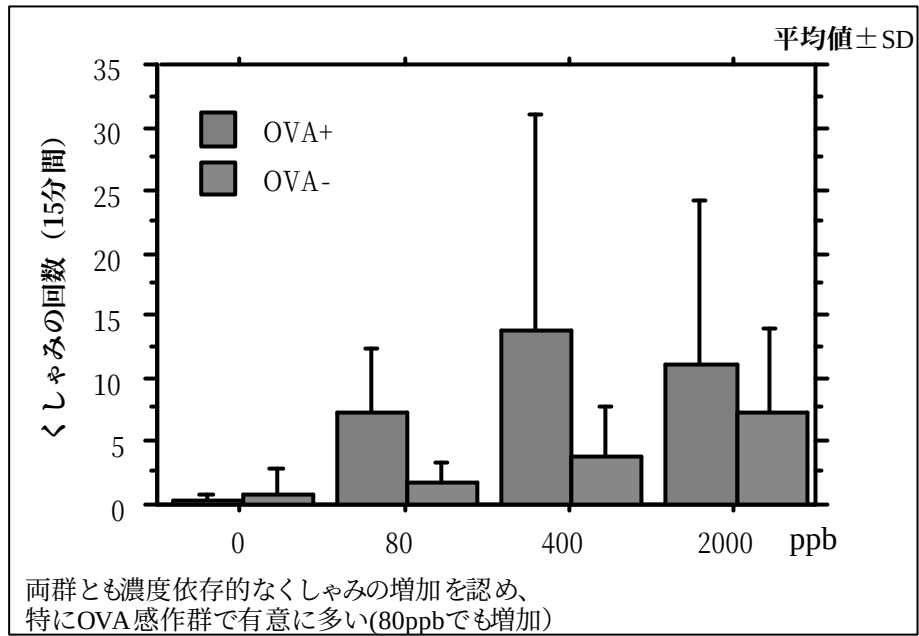


図8 トルエン前処理マウスの曝露終了時点でのくしゃみの回数

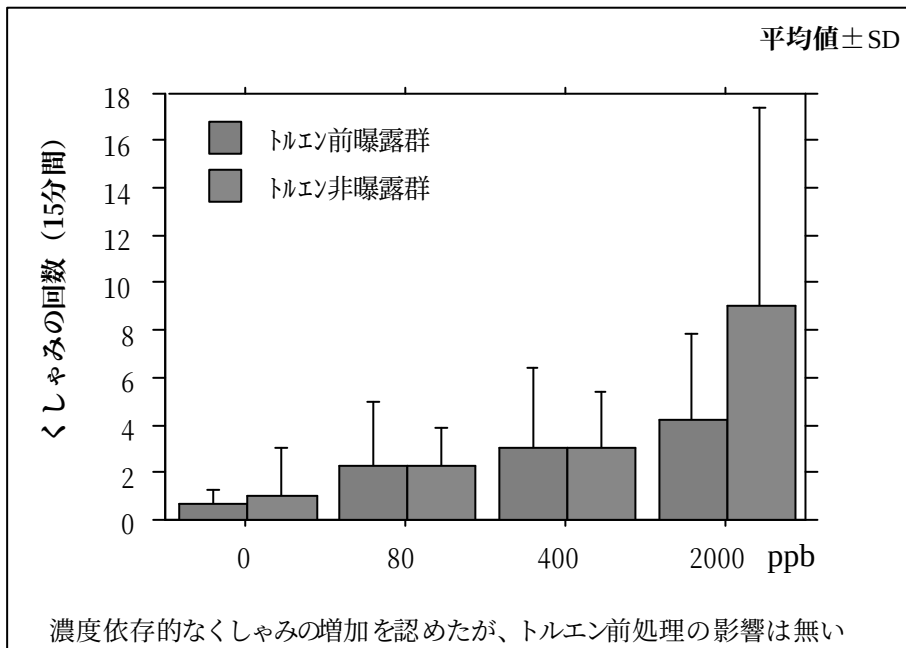


図9 くしゃみ (トルエン)

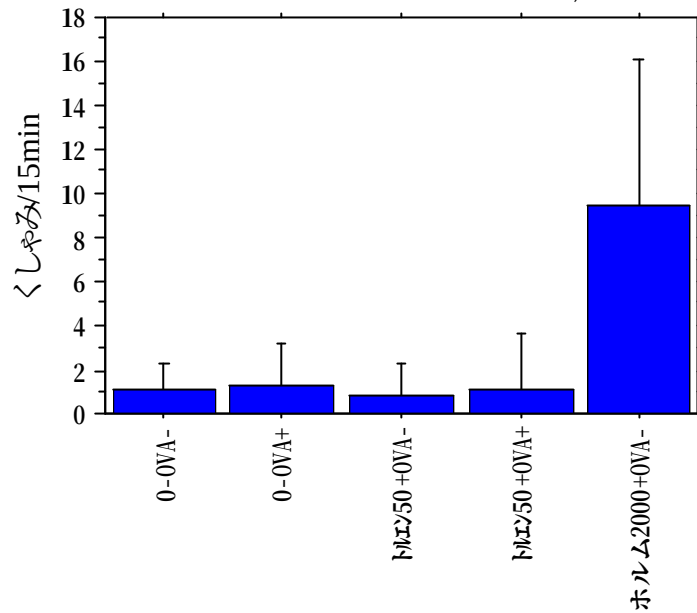
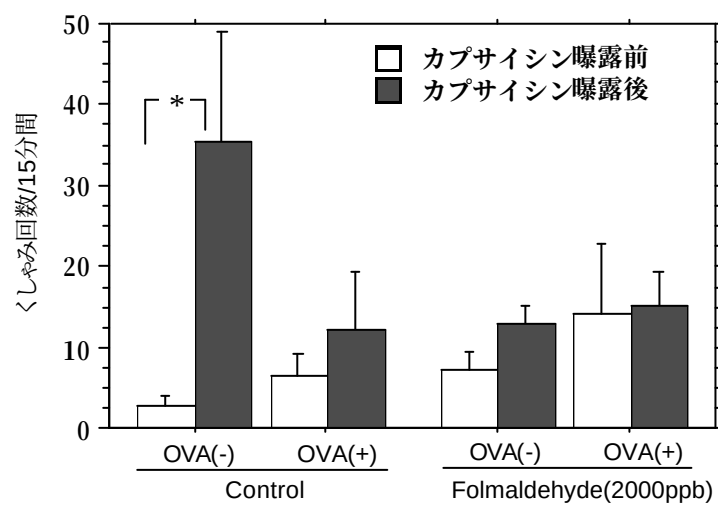


図10 カプサイシン点鼻によるくしゃみの影響



6. その他の影響

6-1) 化学分析による曝露指標

研究協力者 樺田尚樹、嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

（1）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。また、トルエン曝露により曝露指標としてトルエンの代謝物である尿中馬尿酸を測定して曝露の確認をおこなった。

（2）研究方法

ホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体の定量法：

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（図 1）。

測定法の一つとしては、図 2 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℃、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℃ 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（図 3）。さらに Dimedone (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione) による誘導体形成を行い、HPLC-蛍光分析法も試みた（図 4）。

尿中馬尿酸の定量法：

図 6 に示すように体内に吸収されたトルエンは、比較的短時間で代謝され水溶性の馬尿酸となり尿中に排泄される。そこで 10 週曝露終了直後および 11 週目の曝露開始前にマウス自然排尿をプールして測定サンプルとした。さらに 12 週最終曝露時に、曝露開始前（前日の曝露終了後 18 時間後）と曝露終了 30 分以内の自然排尿を各個体別に採取し測定サンプルとした。

各サンプルを 50% メタノールで 40 倍希釈し、高速液体クロマトグラフィ HPLC にて分離定量した。同時に尿中クレアチニン濃度を測定し、尿中馬尿酸濃度はクレアチニン補正值として評価した。

(3) 研究結果

ホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体の定量法：

第1の cyclohexane-1,3-dione を用いた反応系における測定の結果、図2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3に示した方法できれいに分離できることが確認された。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、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。

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。しかしこの方法でも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。

尿中馬尿酸の定量法：

トルエンの尿中代謝産物である馬尿酸濃度は、10 週、12 週いずれも曝露直後は約 6 g/g creatinine を示し、一方前日の曝露終了から約 18 時間たった曝露開始直前の尿では約 1 g/g creatinine 前後であった (図7)。

(4) 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。種々の反応試薬を用いた測定系において検討した結果、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。一方、トルエンに関しては、産業現場でも幅広く使用され比較的高濃度での毒性は広く知られ、曝露指標としての尿中代謝産物・馬尿酸の測定もトルエン作業従事者には実施されている。今回、マウス尿中の馬尿酸を測定すると曝露直後には有意に高い濃度を示し、16 時間後の翌日曝露直前の尿では低値に復していた。トルエンの代謝は図6, 8に示すように大半が尿中に馬尿酸として代謝され排泄されることがわかっている。今回の実験でも曝露指標として尿中馬尿酸の増加が観察され、有効な経気道曝露が行われたことを示すとともに、速やかに代謝されていることが示された。

図1 ヘモグロビン付加体の測定方法

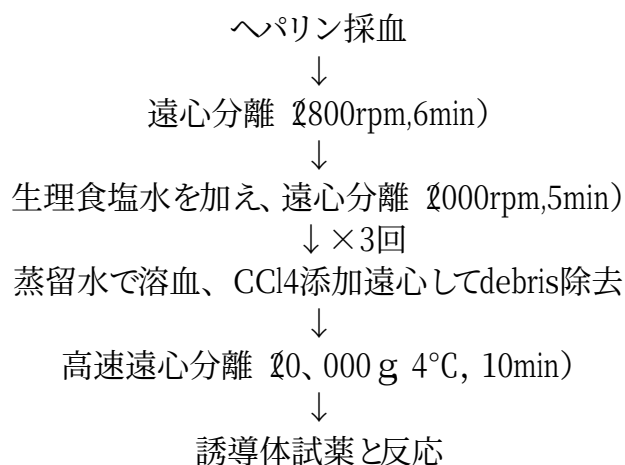


図2 HPLCによるヘモグロビン付加体の測定

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 10 g

濃塩酸 3.2 ml

水 30 ml

試料：反応試薬=1:1で混合、90°C、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

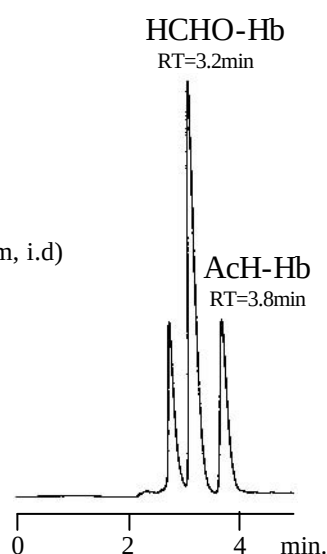
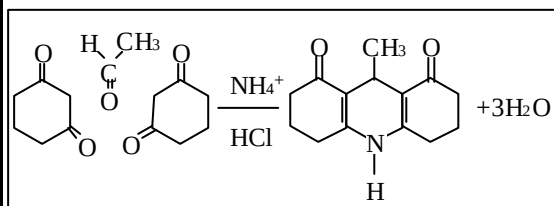


図3 HPLCによるヘモグロビン付加体の測定2

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

60°C、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

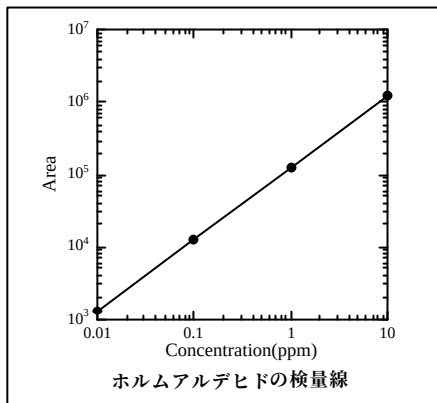
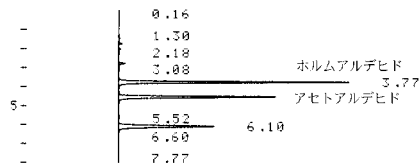
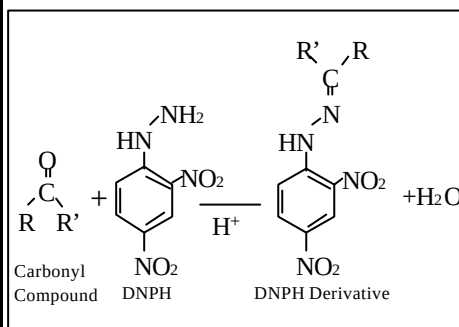


図4 HCHO-Hb測定方法 Dimedone)

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°C、10min)
↓
HPLC
反応試薬 5,5-dimethyl-1,3cyclohexanedione 0.15g
酢酸アンモニウム 12.5 g
酢酸 0.2ml
蒸留水で50mlにメスアップ

- HPLC条件：Wakosil-(II)5C18 250mm×0.4mm,I.D.)
- 励起波長 395nm, 測定蛍光波長 460nm
- 移動相：氷／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

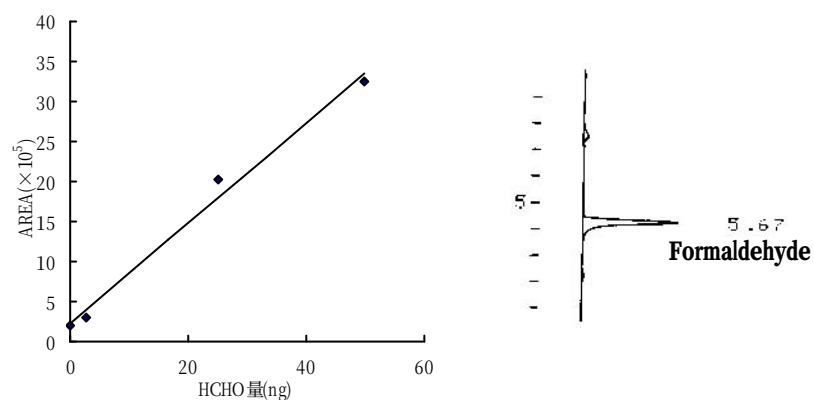
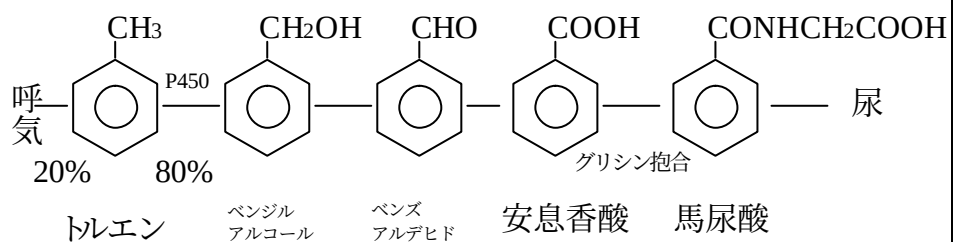


図6 トルエン代謝



安息香酸 :あんず、梅肉エキス、清涼飲料水などに含まれているので馬尿酸増加に注意(ヒトの場合)

図7 マウス尿中馬尿酸濃度

(トルエン曝露 :50 ppm)

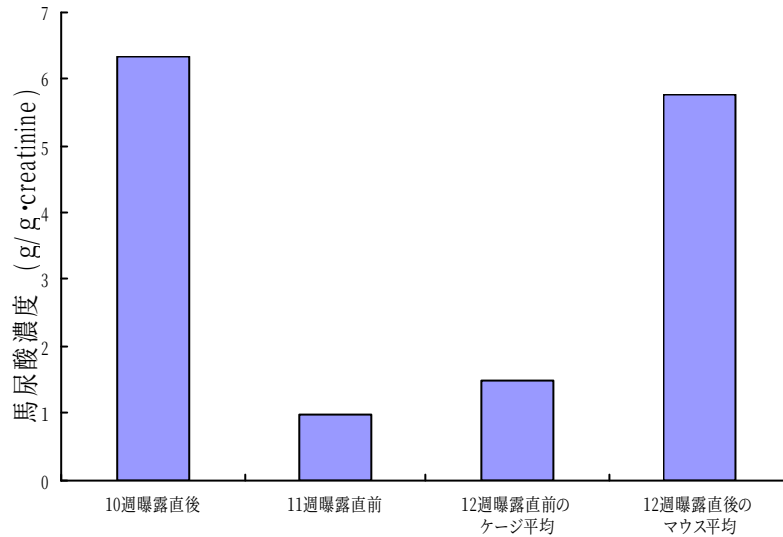


図8 トルエン 体内動態)

吸入曝露

吸入量の86～96%が吸収され、5時間以内に吸入量の15～20%が呼気中に未変化で排出

肺から完全にトルエンが除去されるのは24時間かかる

P450によりベンジルアルコールとo-クレゾール、p-クレゾールに代謝される。ベンジルアルコールは、アルコール脱水素酵素(ADH)、アルデヒド脱水素酵素の代謝を受け、安息香酸、最終的に馬尿酸になって尿中に排出

90%以上が馬尿酸に代謝

生物学的半減期は数時間 (1～2時間)、馬尿酸は24時間以内に全て排出

6-2) 低濃度ホルムアルデヒドおよびトルエン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、樺田尚樹、嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

（１）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。今回、マウスを用いて、低濃度ホルムアルデヒド（最大2000ppb）およびトルエン 50ppm 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、OVA 感作アレルギーモデルを作成したが、これらについても吸入曝露の影響について同様に検討した。

（２）研究方法

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 磷酸緩衝液（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、標本作製した。染色はHE染色とGiemsa染色、Toluidin blue染色を施した。

（３）研究結果

3-1 ホルムアルデヒド曝露による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4Pointいずれにおいても、光顕的にOVA+・OVA-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4Pointにおいて、鼻腔粘膜上皮基底膜直下に限って肥満細胞を観察した。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（図2～5）。

3-2 ホルムアルデヒド曝露による下気道～肺の変化と炎症細胞の動態

喉頭続く気管・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し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 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、腫瘍性変化等はみられなかった（写真3）。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。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。

3-3 トルエン曝露による上気道粘膜上皮の変化と炎症性細胞の動態

鼻腔では、呼吸上皮の細胞質内に HE 染色でエオジンに好染した小体が出現する好酸性変化（写真4）が、各群5匹中、対照群の2匹、トルエン単独曝露群の2匹、OVA 単独曝露群の5匹、OVA・トルエン重複曝露群の5匹に観察された。好酸性変化を示す部分の PAS 反応は陰性であった。その他に、トルエン単独曝露群では鼻道の粘膜に組織学的な変化は確認されなかったが、OVA 単独曝露群と OVA・トルエン重複曝露群では、呼吸上皮の粘膜下に少数の好酸球の浸潤が確認された（写真5）。好酸球の浸潤は、OVA 単独曝露群と OVA・トルエンの重複曝露群で同程度であった。また、OVA を曝露した2つの群において、呼吸上皮領域に PAS 反応にて陽性を示す粘液物質を含有した杯細胞が多数観察されたが、これはトルエン単独曝露群でも頻繁に出現し、かなり出現頻度は下がるものの対照群にも同様の陽性像が観察された（写真6）。これら杯細胞の過形成には、個体差があった。Toluidin blue 染色にて、肥満細胞の上皮内への浸潤を検索したが、すべての群において、肥満細胞は上皮下組織に分布しており、扁平上皮、呼吸上皮、嗅上皮のいずれの上皮内にも肥満細胞の浸潤はなかった。

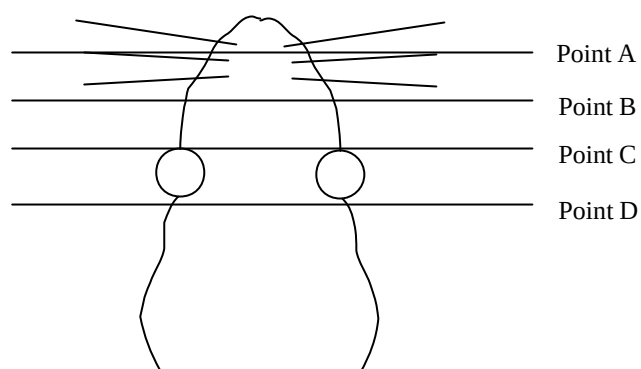
3-4 トルエン曝露による下気道～肺の変化と炎症細胞の動態

気管・肺の組織においても、トルエンの単独曝露群と対照群との間に組織学的な差はみられなかった（写真7）。OVA 単独曝露群と OVA・トルエン重複曝露群では、気管支から末梢の終末細気管支領域の上皮に著明な杯細胞の増生（写真8）を認めた。Toluidin blue 染色にて、頭部と同様に気管・気管支上皮内への肥満細胞の浸潤を検索した結果、OVA を曝露した2つの群に肥満細胞の上皮内浸潤がみられたが、トルエン曝露群ではみられなかった。OVA 単独曝露群と OVA・トルエン重複曝露群との間で、気管支の杯細胞の増生、炎症細胞の浸潤、上皮内への肥満細胞の浸潤所見に差はなかった。

（4）結論

今回の低濃度ホルムアルデヒド（最大 2000ppb）およびトルエン 50ppm 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顕的に確認されなかった。

図1 頭部の切片作成部位



鼻腔粘膜上皮基底膜直下の肥満細胞数

□ OVA+, □ OVA-

図2 Point A, Dose; np, OVA; np

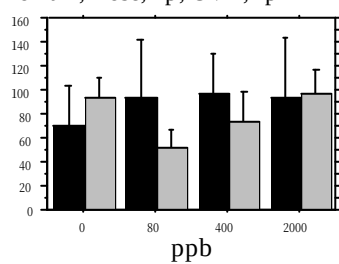


図3 Point B, Dose; np, OVA; p<0.001

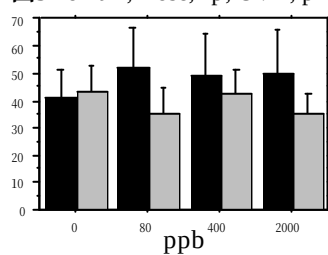


図4 Point C, Dose; np, OVA; p<0.01

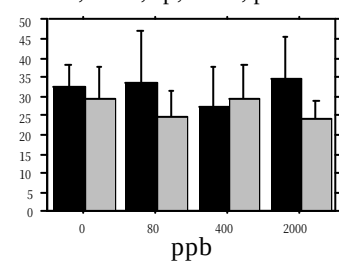
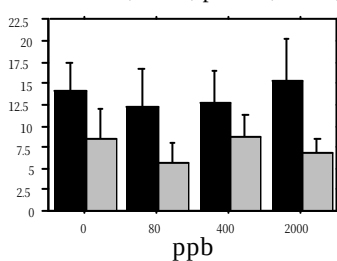


図5 Point D, Dose; p<0.05, OVA; p<0.001



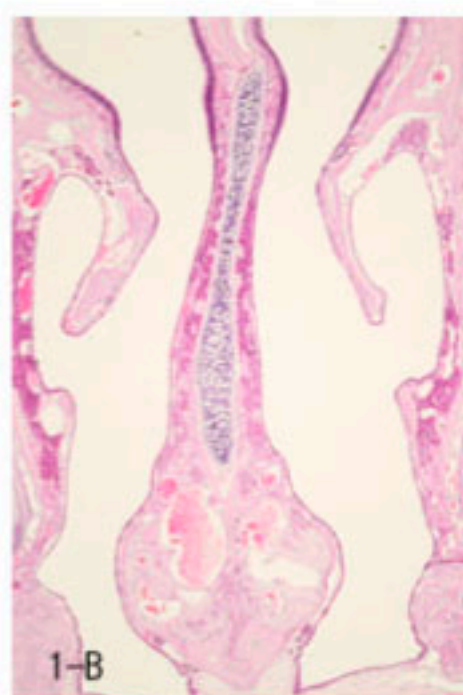
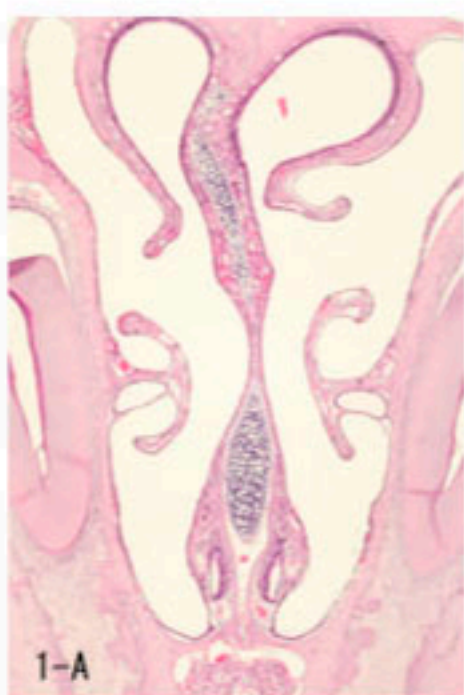


写真1 頭部 PointA,B,C,D の各鼻腔組織
(0ppb,OVA-) HE 染色 ×8

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。

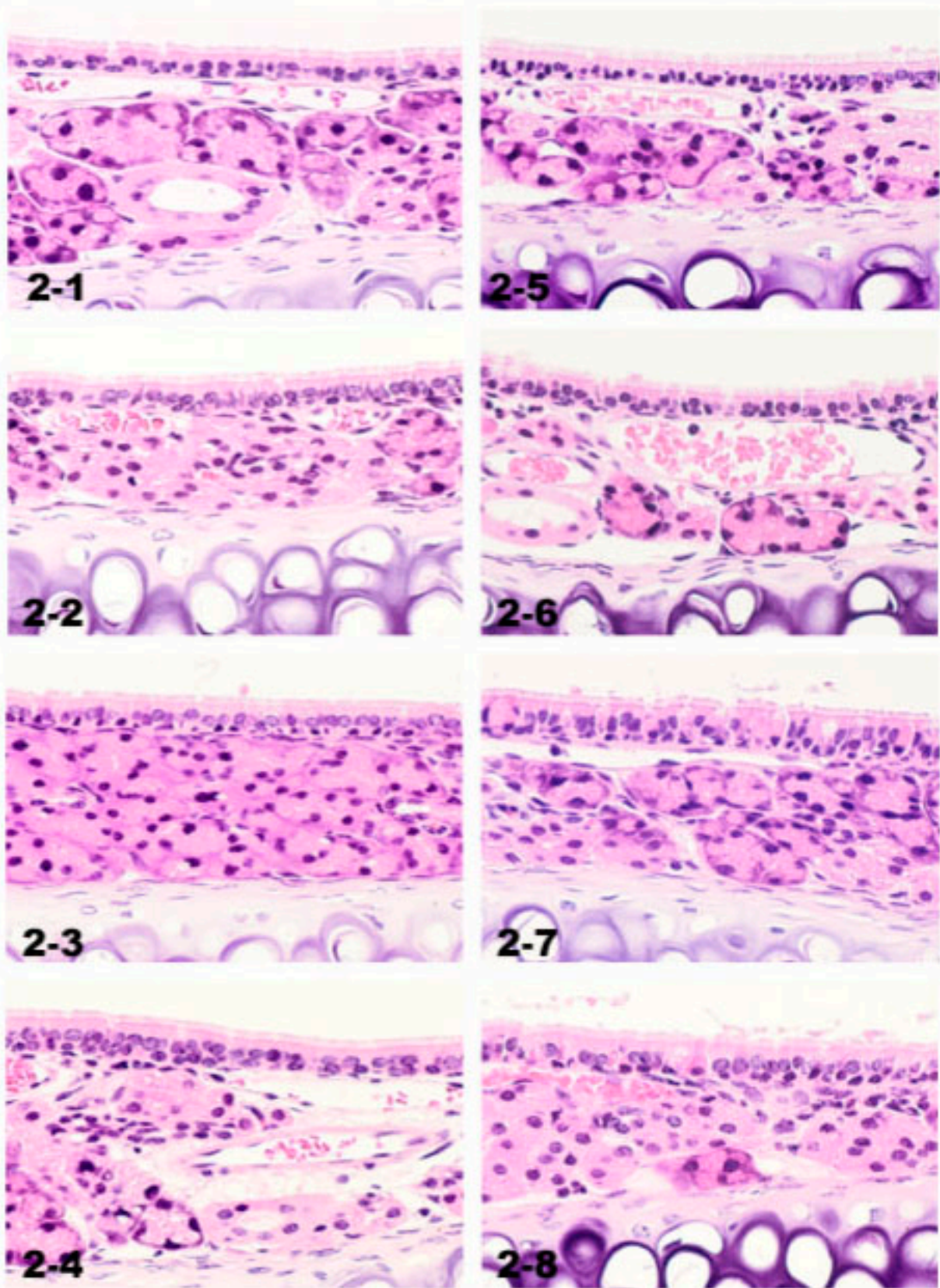


写真2 鼻中隔呼吸上皮

(PointB) HE 染色 40×3.3

いずれも呼吸上皮が覆っており、組織像に差はみられない

2-1 : 0ppb.OVA-

2-5 : 0ppb.OVA+

2-2 : 80ppb.OVA-

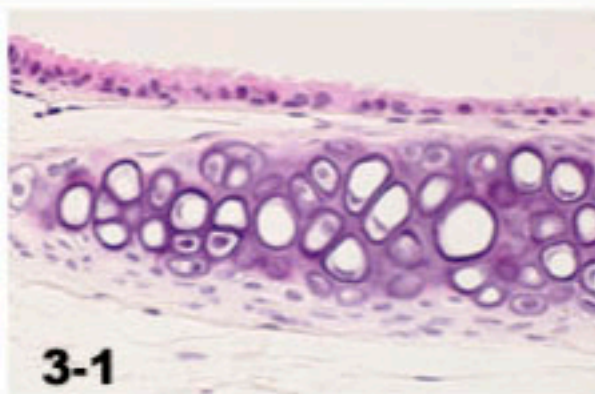
2-6 : 80ppb.OVA+

2-3 : 400ppb.OVA-

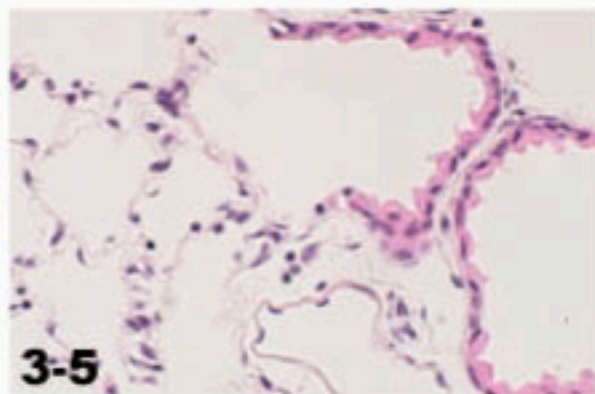
2-7 : 400ppb.OVA+

2-4 : 2000ppb.OVA-

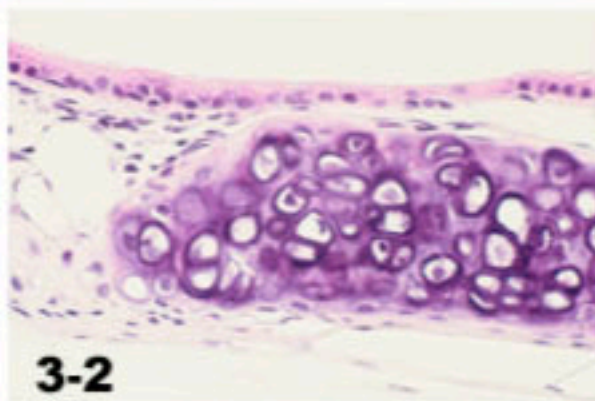
2-8 : 2000ppb.OVA+



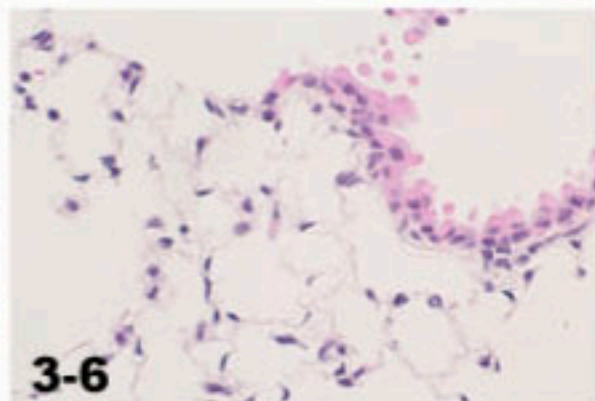
3-1



3-5



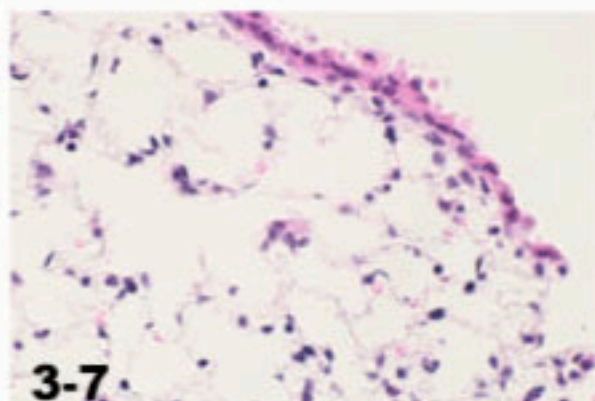
3-2



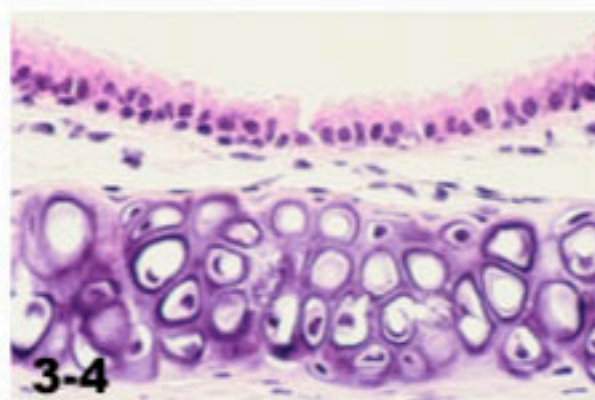
3-6



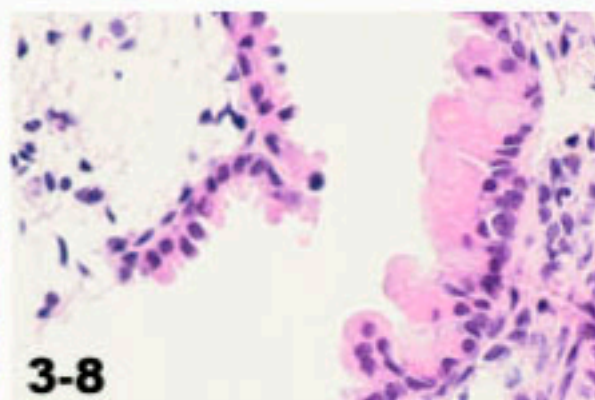
3-3



3-7



3-4



3-8

写真3 気管上皮（左）と肺（右）

HE染色 40×2.5

明らかな上皮の剥離、炎症細胞の浸潤、扁平上皮化生や腫瘍等はみられない

3-1 : 0ppb.OVA-

3-5 : 0ppb.OVA-

3-2 : 2000ppb.OVA-

3-6 : 2000ppb.OVA-

3-3 : 0ppb.OVA+

3-7 : 0ppb.OVA+

3-4 : 2000ppb.OVA+

3-8 : 2000ppb.OVA+

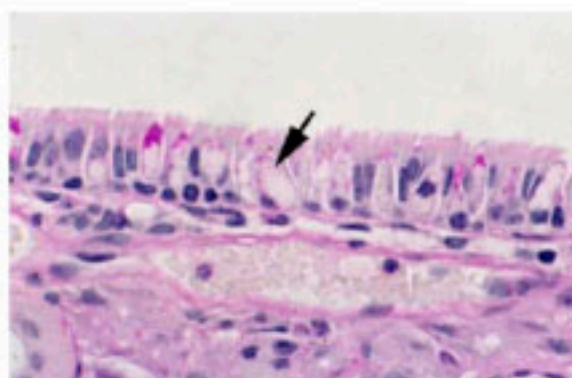
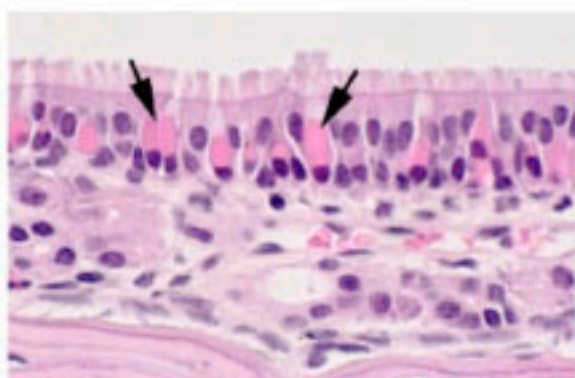


写真4 鼻中隔呼吸上皮の好酸性変化 (OVA 単独曝露群, point B)
 左: 呼吸上皮の細胞質内に好酸性小体 (矢印) がみられる。HE 染色 40×4
 右: 好酸性小体 (矢印) はPAS 反応で陰性を示している。PAS 反応 40×4

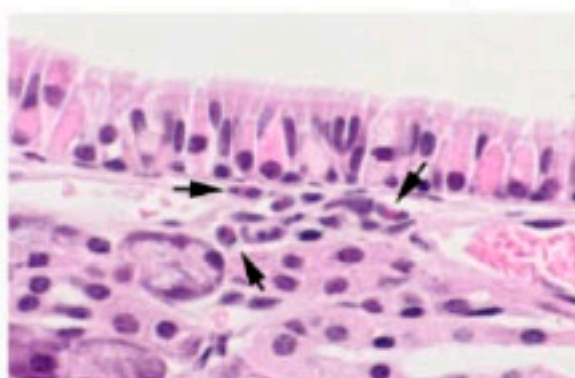


写真5 鼻中隔呼吸上皮下の好酸球浸潤像
 (OVA 単独曝露群, point B)
 呼吸上皮下の間質に好酸球 (矢印)
 の浸潤がみられる。
 HE 染色 40×4

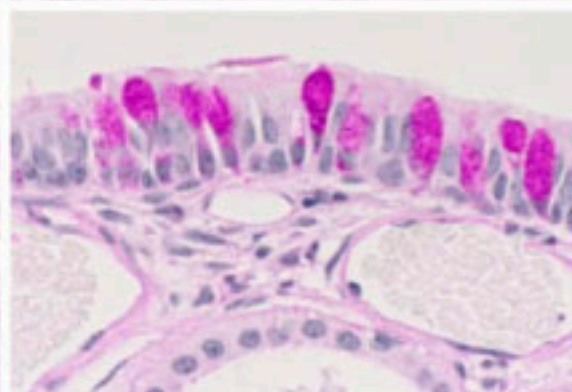
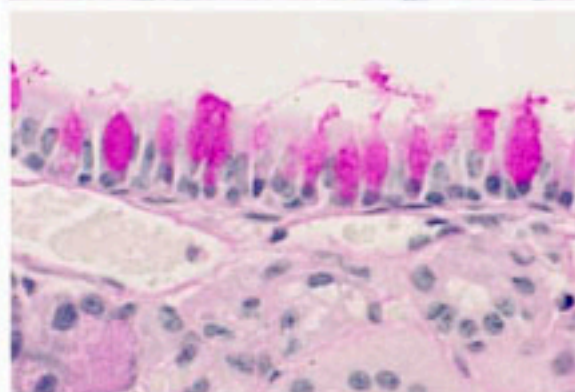
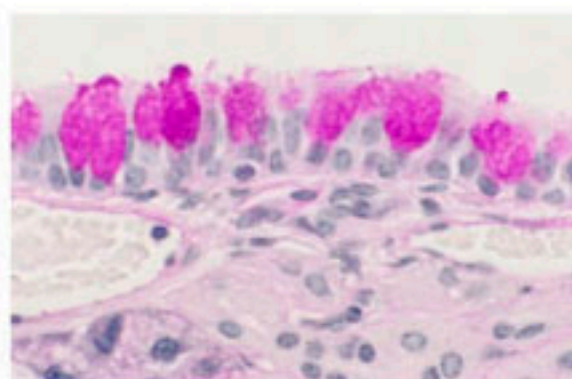
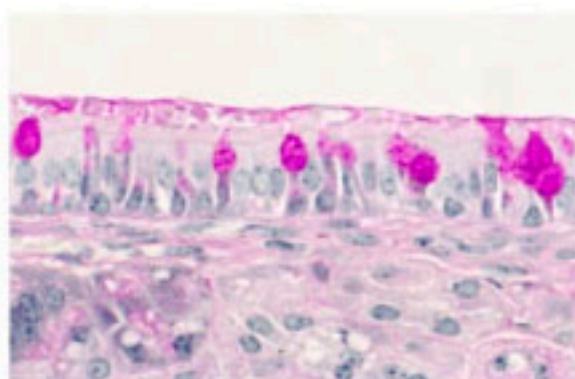


写真6 鼻中隔呼吸上皮の杯細胞過形成
 左上: 対照群, point B
 左下: OVA 単独曝露群, point B
 対照群の一部でも杯細胞の粘液産生がみられるが、曝露群では一様に著明な
 粘液産生を示す杯細胞の増加がみられる。 PAS 反応 40×4
 右上: トルエン単独曝露群, point B
 右下: OVA + トルエン重複曝露群, point B

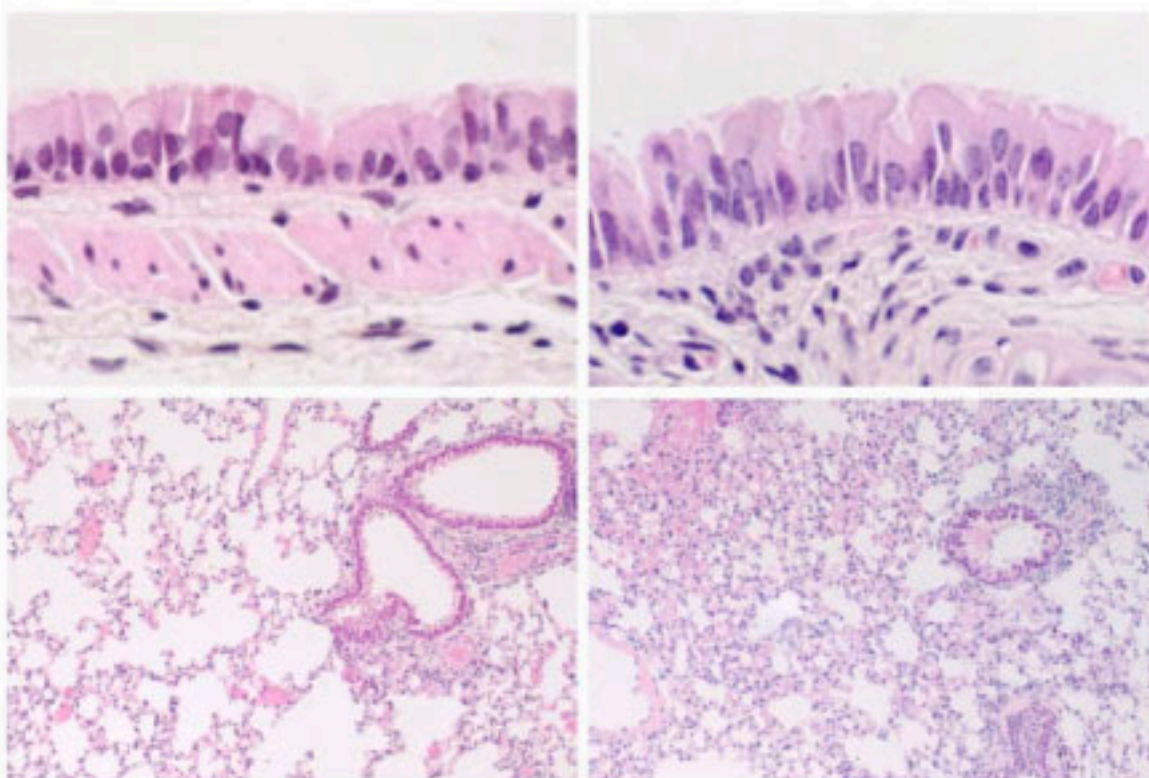


写真 7 気管・肺の組織像

左上：対照群，気管上皮，

左下：対照群，肺，

対照群とトルエン単独曝露群との間に組織学的な差はみられない。

HE 染色 上：40×4 下：10×2.5

右上：トルエン単独曝露群，気管上皮，

右下：トルエン単独曝露群，肺，

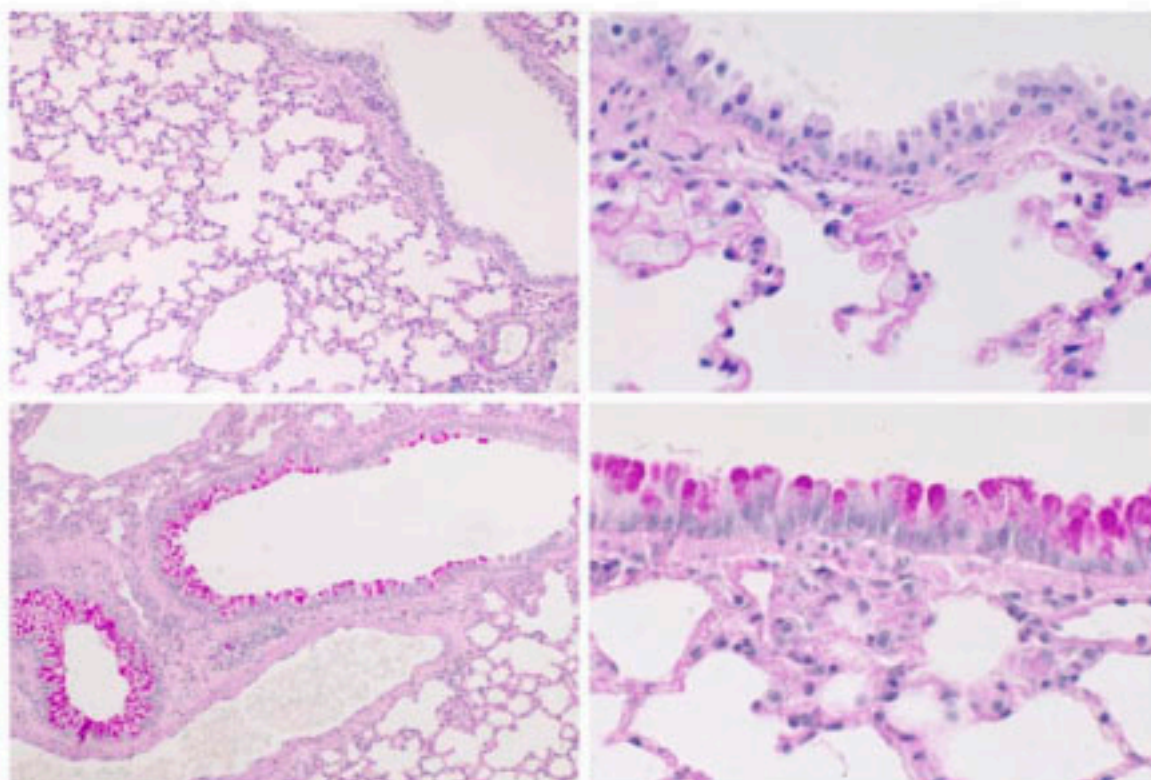


写真 8 気管支上皮の杯細胞過形成

左上：トルエン単独曝露群，

左下：OVA 単独曝露群，

トルエン単独曝露群では末梢の気管支上皮に杯細胞はみられないが、OVA 単独曝露群は PAS 反応で赤紫色に染まる杯細胞の著明な増加がみられる。

PAS 反応 左：10×2.5 右：40×4

右上：トルエン単独曝露群の拡大，

右下：OVA 単独曝露群の拡大，

付録：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）

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、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。

マウスは、ホルムアルデヒド2000ppb曝露群、400ppb曝露群、80ppb曝露群、トルエン50ppm曝露群およびコントロール群の5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)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2)。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、一日16時間曝露中の濃度変化を連続モニタリングにより実施した。その結果、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。

また日々のチャンバー内濃度評価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、2台のチャンバーを用いた2000ppb曝露ではそれぞれ 1982 ± 37 ppb、 1988 ± 48 ppb、また400ppb曝露では 391 ± 12 ppb、80ppb曝露では 80 ± 2 ppbであった(図3、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、直接空気で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) トルエンガス曝露方法

トルエンガス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2)。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る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 ± 1.4 、 50.3 ± 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、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。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)。

以上、まとめると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。これらのマウスを前出項目の実験に供し各検討を行った。

図1 吸入曝露装置の概略図

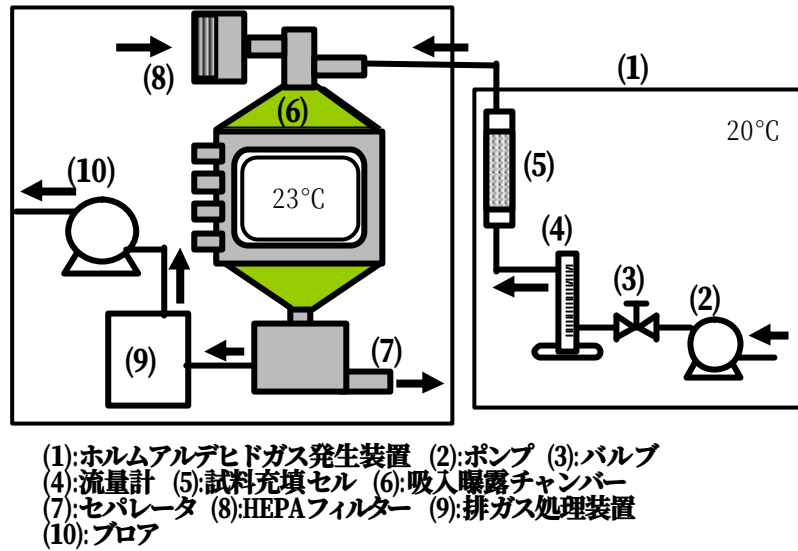


図2 曝露タイムスケジュール

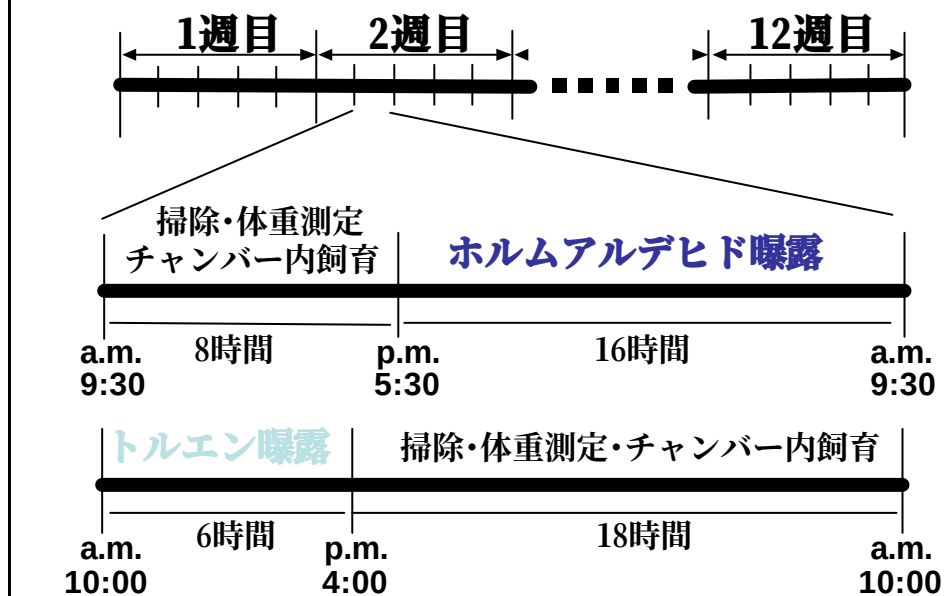


図3 チャンバー内ホルムアルデヒド濃度

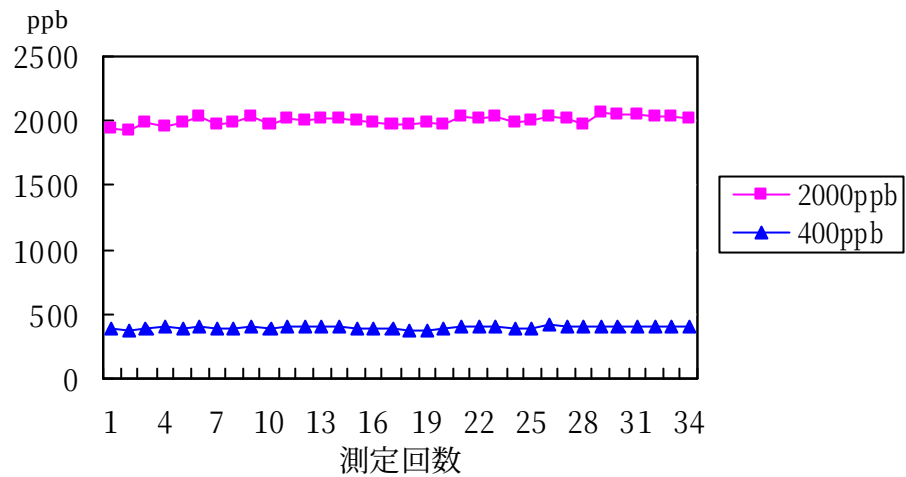


図4 チャンバー内ホルムアルデヒド濃度

設定値	実測値 (Mean±SD ppb)
80ppb	79.5±2.2
400ppb	391.2±12.3
2000ppb-1	1982.2±36.7
2000ppb-2	1987.5±48.4

図5 トルエン吸入曝露装置の概略図

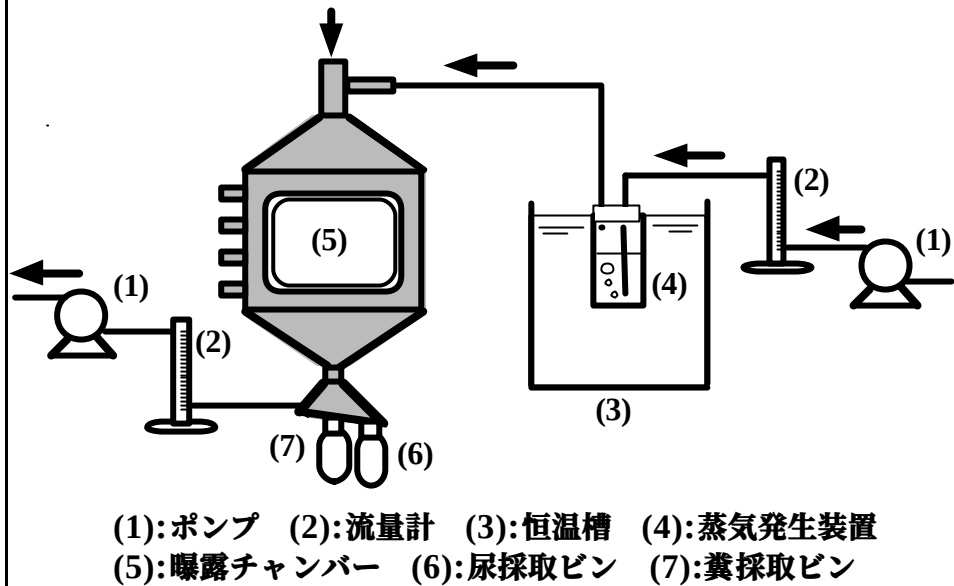


図6 チャンバー内トルエン濃度の測定結果

実測値
Chamber A; 51.0 ± 1.4 ppm
Chamber B; 50.3 ± 1.8 ppm
設定値; 50ppm)

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

第 3 章 微量化学物質の測定に関する研究

目 次

I. 目的	99
II. 対象物質及び分析法	99
A. テトラフルオロエチレン.....	99
1. 分析法（第1報）	100
(1) 分析法の概要	100
(2) 試薬・器具	100
(3) 分析法	100
(4) 注解	104
2. 解説	106
3. 参考法（第2報）	112
(1) 分析法	112
(2) 解説	118
B. 2-(1-メチルエトキシ)-エタノール	120
1. 分析法.....	121
(1) 分析法の概要	121
(2) 試薬・器具	121
(3) 分析法	121
(4) 注解	124
2. 解説	126

I. 目的

本態性多種化学物質過敏状態（いわゆる化学物質過敏症）は、極微量の化学物質によって体の不調を訴える病態をさし、現在、原因や病態が未解明な化学物質についての調査結果が集約され、解明が推進されつつあるところである。

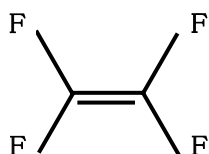
しかしながら、毒性の未解明のものもあり、それらについては極微量ではあっても、その環境残留量を把握しておくことが必要である。

そのため、新たに化学物質過敏症の原因として疑われる化学物質が明らかになった際には、可及的速やかに極微量分析できる分析手法の開発に着手しておくことが危機管理の観点から、必要不可欠である。よって、物理化学的性状が典型的なテトラフルオロエチレン及び 2-(1-メチルエトキシ)-エタノールについての分析手法の開発を行った。

II. 対等物質及び分析法

A. テトラフルオロエチレン (Tetrafluoroethylene)

対象物質及び構造式



CAS 番号 116-14-3

【物理化学的性状】

分子量	100.02	比重	1.3676
融点 (°C)	-142.5 °C	水溶解度 (mg/L)	159 (25°C)
沸点 (°C)	-78.4 ~ -76.3 °C	LogPow	1.21 (計算値) 出展：SRC
蒸気圧 (kPa)	3266 (25°C)	発火点	187.8 °C
蒸気密度	(空気=1)： 3.87	爆発限界	50 vol% (上限) 10 vol% (下限)

【毒性、用途 等】

毒性情報 : ラット (経気道吸入、4 時間 LC50) 40000ppm
 マウス (経気道吸入、4 時間 LC50) 143 g/m³
 モルモット (経気道吸入、4 時間 LC50) 116 g/m³
許容濃度 : ACGIH TWA 2ppm 8.3 mg/ m³
用途 : 合成樹脂、合成中間体

1. 分析法（第1報）

（1）分析法の概要

テトラフルオロエチレンは沸点が低く、常温吸着法での採取では、破過が起こりやすいため、大気試料の採取はキャニスターで行う。

キャニスター中の試料を、沸点が低いテトラフルオロエチレン分析用に濃縮条件を最適化した装置に導入し、容器採取－低温濃縮－ガスクロマトグラフ質量分析法で分析する。

（2）試薬・器具

a. 試薬

純水 : 住友精化製 VOC 測定用水
窒素ガス : 住友精化製高純度窒素ガス
テトラフルオロエチレン標準原ガス : 住友精化製（10 p p m）

b. 器具

キャニスター : SUMMA キャニスター
キャニスター洗浄装置 : ジェールサイエンス社製キャニスターオートクリーニングシステム
マスフローコントローラー : 流量可変型パッシブキャニスターサンプラー

（3）分析法

a. 試料の採取及び保存

真空にした 6 L キャニスターにマスフローコントローラーを接続し、3.3ml/min の流量で 24 時間大気を吸引し、4.8L 程度の大気を採取し、搬送する。

試験室に到着後、減圧採取した試料に、すみやかに純水 100 μ l を入れ、窒素ガスを用いて 130kPa 程度に加圧して、希釈倍率を正確に計り保存する。

b. 試料の前処理

加圧した試料を、テクマー社製 AUTO-CAN（低温濃縮装置）に接続し、低温濃縮－加熱脱着－クライオフォーカスを行って、ガスクロマトグラフ質量分析装置に導入する。

c. 空試験ガスの調製

真空にした 6 L キャニスターに純水を 100 μ L 添加後、窒素ガスを用いて 200kPa 程度に加圧したものを空試験ガスとする。

d. 標準ガスの調製

容積を正確に計った 6 L キャニスターを真空にし、純水を 100 μ L 添加した後、

テトラフルオロエチレン標準原ガスを、200kPa で設定した濃度の標準ガスとなるように適量注入する。

この後窒素ガスで 200kPa に加圧希釈して濃度既知の標準ガスを調製する。

e. 測定

e-1. 低温濃縮及び脱着操作概要

一次トラップ管（テナックス TA）を-190℃に冷却した後、サーマルマスフローコントローラーなどを用いて、試料ガスをトラップ管に正確に濃縮する。

このトラップ管にドライガスを流しドライパージを行った後、200℃に加熱して吸着された試料ガスを追い出し、-190℃に冷却したクライオフォーカスチューブ（内径 0.53mm キャピラリーカラム素管）に再濃縮する。

このクライオフォーカスチューブをすばやく 200℃まで加熱し、クライオフォーカスされた試料ガスをGC/MSに導入する。

e-2. 測定条件

GC/MS 条件

使用機種	島津製作所製GCMS-QP5000		
使用カラム	クロムパック社製 CP-PoraBOND Q (25m×0.32mm×5μm)		
カラム温度	35℃ (5min) →30℃/min →320℃		
注入方法	テクマー社製AUTOCAN		
注入口温度	95℃		
キャリアガス	ヘリウム (20kPa)		
インターフェイス温度	230℃		
イオン化電圧	70eV		
検出モード	SIM		
モニターイオン	定量用イオン	:	100
	参照イオン	:	81

低温濃縮装置設定条件

使用機種	テクマー社製AUTO-CAN
ライン温度	150℃
バルブ温度	150℃
MCS ライン温度	40℃
トラップスタンバイ温度	50℃
クライオスタンバイ温度	130℃
MFC スタンバイ流量	20ml/min
トラップクール温度	-190℃
MFC トランスファー流量	40ml/min
ドライパージ時間	10min
ドライパージ温度	-65℃
ドライパージ流量	20ml/min
ディソーププレヒート温度	-65℃
トラップディソープ時間	6 min
トラップディソープ温度	200℃
クライオクール温度	-190℃
クライオインジェクト時間	5min
クライオインジェクト温度	200℃
トラップベイク時間	10min
トラップベイク温度	200℃
MCS ベイク温度	280℃

e-3. 検量線

(2)-d. 標準ガスの調製に従って作成した 1.0ppb 標準ガスの濃縮量を可変して、
(2)-b. 試料の前処理に準じて分析し、得られたテトラフルオロエチレンのピーク面積と絶対量から、検量線を作成する。(注1)

e-4. 定量

試料を採取した 6 L キャニスターに純水を 100 μ L 添加後、窒素ガスを用いて 130kPa 程度に加圧希釈し、正確に希釈率を計った後、希釈前の試料として 500ml に相当するガス量を【試料の前処理】に準じて分析する。

分析して得られたピーク面積から、上記で作成した検量線を用いて定量する。

e-5. 濃度の算出

大気試料のテトラフルオロエチレンの濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) は次式から算出する。

試料濃縮量がサーマルマスフローコントローラー等で制御されている場合には、自動補正されるため、次式の内、気圧と温度の補正は不要である。

$$C (\mu\text{g}/\text{m}^3) = \frac{n \times (A_s - A_t)}{v \times 293 / (273 + t) \times P / 101.3}$$

C : 20℃における大気中の各測定物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

n : 希釈倍率

A_s : 濃縮した試料中の各測定対象物質の重量 (pg)

A_t : 各測定対象物質のトラベルブランク値 (pg)

操作ブランクと同等とみなせる場合は操作ブランク値を用いる。

v : 分析に供した試料量 (mL)

t : 試料分析時における温度 (℃)

P : 試料分析時における大気圧 (kPa)

e-6. 装置検出下限値 (IDL)

本分析に用いた低温濃縮装置付き GCMS の IDL を下表に示す (注 2)。

物質	IDL (pg)	試料量 (ml)	IDL 試料換算値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
テトラフルオロエチレン	22.0	500ml	0.044

e-7. 測定方法の検出下限値 (MDL)、定量下限値 (MQL)

環境大気に標準品を添加して求めた本測定方法における検出下限値及び定量下限値を下表に示す (注 3)。

物質	試料量 (ml)	検出下限値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	定量下限値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
テトラフルオロエチレン	500ml	0.079	0.203

(4) 注 解

(注1) 検量線の作成

標準ガスの濃縮量を可変して検量線を作成することが難しい装置の場合は、段階的に濃度の違う標準ガスを作成し、その一定量を濃縮して検量線を作成しても良い。

(注2) 装置検出下限値(IDL)

装置検出下限値(IDL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」平成17年3月環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課に準じ、表1のとおり算出した。

表1. 装置検出下限(IDL)の算出

物質名	テトラフルオロエチレン
試料濃縮量(Ml)	500
注入量(pg)	208
結果1	202
結果2	213
結果3	213
結果4	201
結果5	204
結果6	199
結果7	207
平均値	206
標準偏差	5.66
IDL ^{*1}	22
IDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} ^{*2}	0.044
CV(%)	2.8

$$\text{※ IDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

*1: IDL=標準偏差 $\times 1.9432 \times 2$

*2: IDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)}=IDL $\times 1/\text{大気濃縮量(mL)}$

(注3) 測定方法の検出下限値(MDL)

測定方法の検出下限値(MDL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」平成17年3月環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課に準じて、表2のとおり算出した。

表2. 装置検出下限(MDL)の算出

物質名	テトラフルオロエチレン
試料濃縮量(Ml)	500
注入量(pg)	203
試料換算濃度($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.406
操作ブランク平均($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0
無添加平均($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0
結果1($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.44
結果2($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.43
結果3($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.42
結果4($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.40
結果5($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.39
結果6($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.42
結果7($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.40
平均値	0.41
標準偏差($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.020
MDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} ^{*1}	0.079
MQL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} ^{*2}	0.413
S/N ^{*3}	6.8
CV(%)	4.9

$$\text{※ MDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

*1: MDL=標準偏差 $\times 1.9432 \times 2$

*2: MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

*3: 装置ブランクをノイズとして

① 操作ブランク平均：

試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均値

② 無添加平均：

MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

2. 解説

a. 分析法

a-1. 分析フローチャート

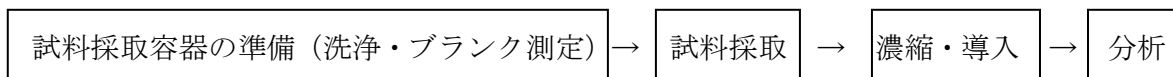


図1 分析フローチャート

a-2. 分析法の検討

・ 検量線

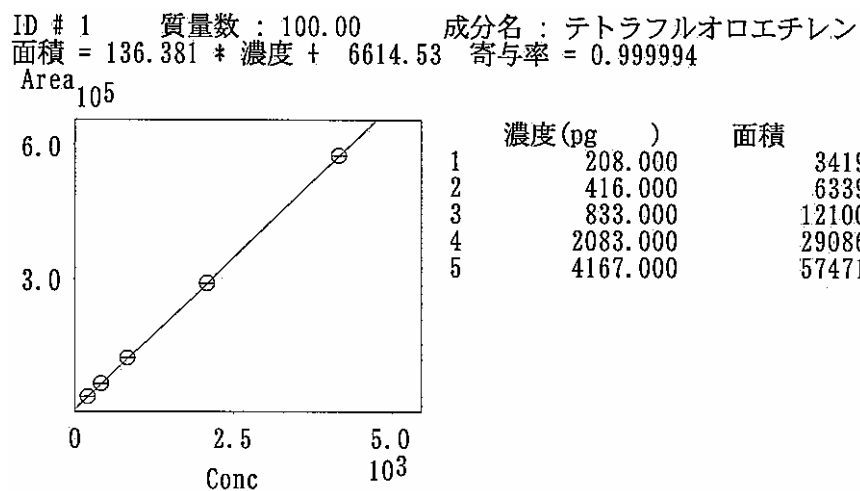


図2 検量線

・ 検量線のクロマトグラム

テトラフルオロエチレン絶対量 0.208ng のクロマトグラム
 (大気 500ml の濃縮により、大気中濃度として $0.416 \mu\text{g}/\text{m}^3$ となる)

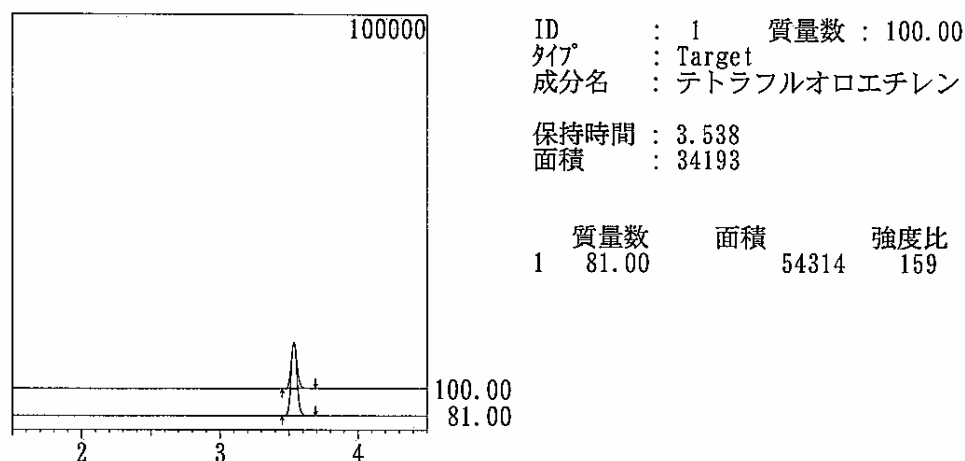


図3 SIM クロマトグラム (0.208ng 注入時)

・マススペクトル

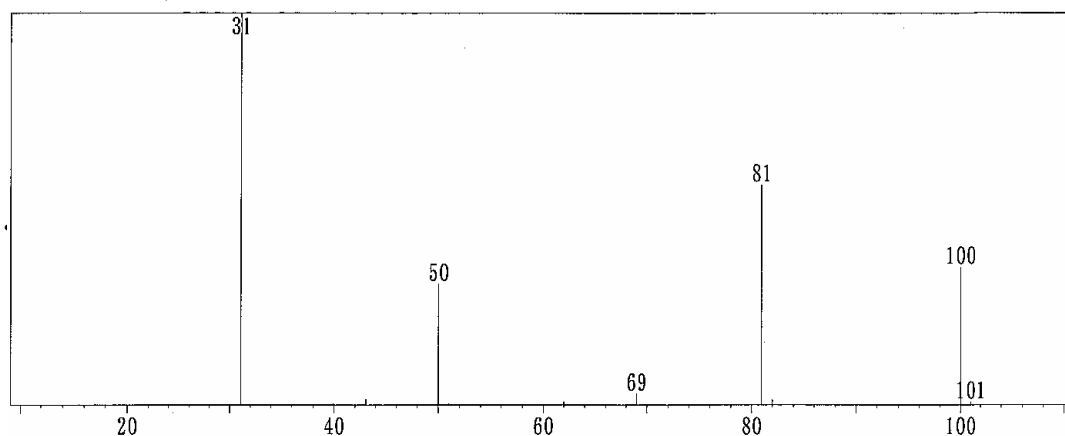


図4 マススペクトル

・破過容量の確認

低温濃縮装置の一次トラップ管に用いたテナックス TA は、テトラフルオロエチレンに対する破過容量が小さいので、ガスクロマトグラフを利用して、破過容量と絶対温度の逆数の直線関係から破過容量予測を行うことが出来なかった。このため、次の試験で破過容量の確認を行った。

装置の最低冷却温度（ -190°C ）でテナックス TA を冷却し、濃縮量を変えて検量線を作成し、1000ml まで良好な直線性を示したことから、1000ml まで破過が起きていないことを確かめた。

そして、テナックス TA の低温濃縮温度を -30°C 、 -100°C 、 -190°C に変えて、1ppb のテトラフルオロエチレン 1000ml 濃縮し、ピーク面積の変化から低温濃縮温度での破過を確認した。

この結果、 -190°C の時のピーク面積を 100 % とすると、各温度のピーク面積は下記のようになった。

表3. 破過容量の確認

	-30°C	-100°C	-190°C
テトラフルオロエチレン回収 (%)	0	84.7	100

このように、1000ml の濃縮で、 -30°C では全てが破過し、 -100°C では 2 割程度の破過が起こった。

このことから、一次トラップ（テナックス TA）の低温濃縮温度は、 -190°C とした。

・添加回収試験

本法により大気試料をキャニスターに採取し、テトラフルオロエチレンが検出されなかった大気試料に、試料中ガス濃度として $1.35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ となるように標準ガスを添加し、添加回収試験を行った。

この結果7試料の平均回収率は97.0%となり、良好な添加回収率が得られた。

表4. 添加回収試験結果

物質名	テトラフルオロエチレン
試料濃縮量(mL)	500
注入量(pg)	675
結果 1	686
結果 2	672
結果 3	668
結果 4	666
結果 5	641
結果 6	623
結果 7	625
平均値	654
標準偏差	24.9
CV(%)	3.8
濃度換算平均値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1.31
設定濃度($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1.35
回収率(%)	97.0

・添加回収試験のクロマトグラム

テトラフルオロエチレン絶対量 0.686ng のクロマトグラム

(大気 500ml の濃縮により、大気中濃度として $1.36 \mu\text{g}/\text{m}^3$ となる)

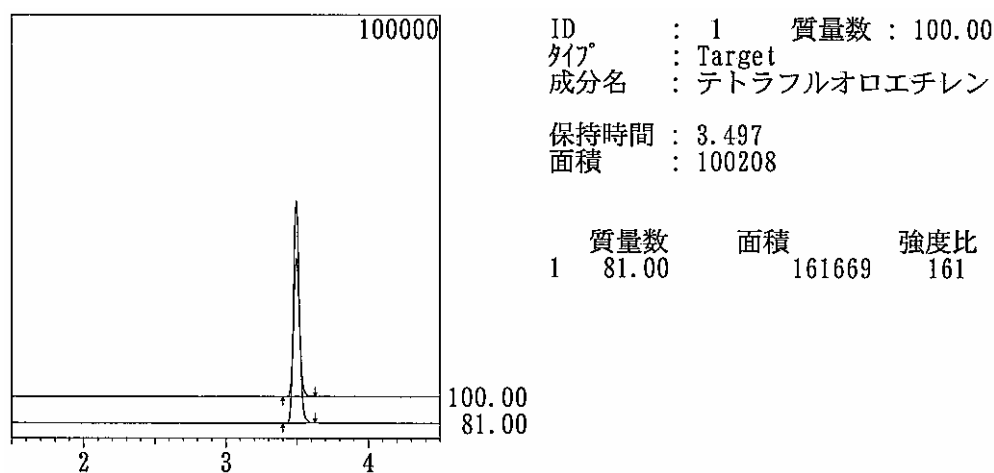


図5 SIM クロマトグラム (0.686ng)

・試料の保存性

本法により、大気試料をキャニスターに採取してテトラフルオロエチレンが検出されなかった大気試料に、標準ガスを添加し試料の保存性を調べた結果、キャニスター内で7日間安定であった。

(初期値 : $1.72 \mu\text{g}/\text{m}^3$)

表5. 保存性試験結果 (単位 : %)

経過日数	残留率
2日後	100.9
3日後	97.0
6日後	99.6
7日後	101.6

a-3. 環境大気の測定例

本法で京都市内の大気を測定した結果、テトラフルオロエチレン濃度は装置ブランク程度でMDL以下となり、環境大気から検出されなかった。

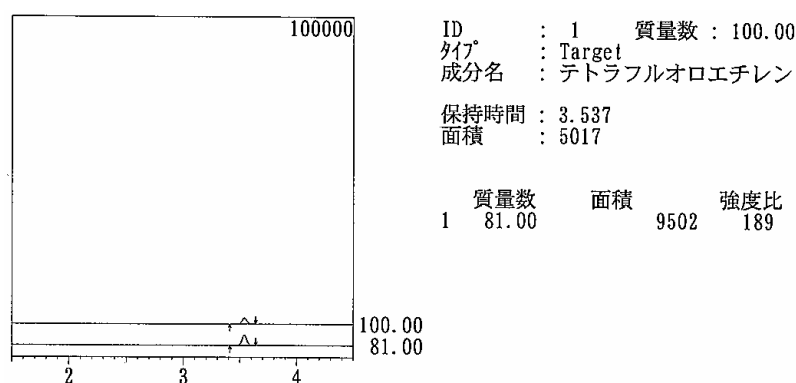


図6 大気試料のSIMクロマトグラム

b. 評価

本分析法により、大気中のテトラフルオロエチレンを定量下限値 $0.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ として測定することが可能である。

c. 参考文献

「有害大気汚染物質測定の実際」 (初版) 平成9年6月25日

編集 : 有害大気汚染物質測定の実際編集委員会

発行 : 幸田 正孝

発行所 : (財) 日本環境衛生センター

Tetrafluoroethylene

Objective: An air sampling, cleanup and analytical methodology procedure was developed for the determination of Tetrafluoroethylene in environmental air sample using Canisters and analyzed by GC/MS (SIM) with cryogenic trapping system method.

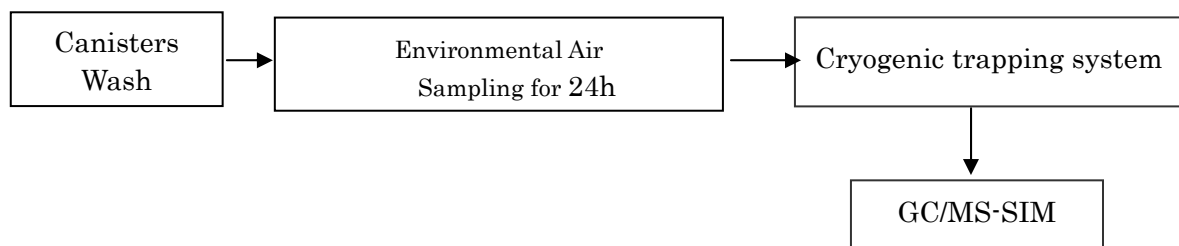


Figure 1. Showing flow chart Tetrafluoroethylene in environmental air sample

物質名	分析フローチャート	備考
テトラフルオロ エチレン	試料採取容器の準備 → 試料採取 → 濃縮・導入 ↓ 分析	装置： 低温濃縮- GC/MS-SIM カラム： CP-PoraBOND Q (25m×0.32mm ×5μm) 定量下限値： 0.4μg/m ³

3. 参考法（第2報）

低温濃縮装置の一次トラップ管に、テナックス TA を用いて、テトラフルオロエチレンを濃縮するには、 -190°C に冷却することが必要であるが、この温度までの冷却が不可能な装置、または冷却温度の問題で、良好な分析が行えない装置については、一次トラップ管、クライオフォーカス部分に、破過容量の大きな吸着剤を用いて、冷却温度を上げた次の方法でも測定が可能である。

この方法を参考法（第2法）として以下に示す。

（1）分析法

a. 分析法の概要

テトラフルオロエチレンは沸点が低く、常温吸着法での採取では、破過が起りやすいため、大気試料の採取はキャニスターで行う。

これにより採取した試料を、テトラフルオロエチレンに対する破過容量が大きいカーボキセン1000を一次トラップとした低温濃縮装置に導入し、容器採取－低温濃縮－ガスクロマトグラフ質量分析法で分析する。

b. 試薬・器具

b-1. 試薬

第1法と同じ

一次トラップ吸着剤 : スペルコ製カーボキセン1000

b-2. 器具

第1法と同じ

c. 分析法

c-1. 試料の採取及び保存

第1法と同じ

c-2. 試料の前処理

第1法と同じ

c-3. 空試験ガスの調製

第1法と同じ

c-4. 標準ガスの調製

第1法と同じ

c-5. 測定

〔低温濃縮及び脱着操作概要〕

一次トラップ管（カーボキセン1000）（注1）を -30°C に冷却した後、サーマルマスフローコントローラーなどを用いて試料ガスをトラップ管に正確に濃縮する。

このトラップ管にドライガスを流しドライパージを行った後、275℃に加熱して吸着された試料ガスを追い出し、-190℃に冷却したクライオフォーカスチューブ（内径 0.32mm クロムパック社製 CP-PoraBOND Q(注2)）に再濃縮する。

このクライオフォーカスチューブをすばやく 200℃まで加熱し、クライオフォーカスされた試料ガスを GC/MS に導入する。

[測定条件]

GC/MS 条件

使用機種	島津製作所製 GCMS-QP5000		
使用カラム	クロムパック社製 CP-PoraBOND Q (25m×0.32mm×5μm)		
カラム温度	35℃ (5min) →30℃/min →320℃		
注入方法	テクマー社製 AUTO-CAN		
注入口温度	95℃		
キャリアガス	ヘリウム (20kPa)		
インターフェイス温度	230℃		
イオン化電圧	70eV		
検出モード	SIM		
モニターイオン	定量用イオン	:	100
	参照イオン	:	81

低温濃縮装置設定条件

使用機種	テクマー社製 AUTO-CAN
ライン温度	150℃
バルブ温度	150℃
MCS ライン温度	40℃
トラップスタンバイ温度	50℃
クライオスタンバイ温度	130℃
MFC スタンバイ流量	20ml/min
トラップクール温度	-30℃
MFC トランスファー流量	40ml/min
ドライパージ時間	1min
ドライパージ温度	-30℃
ドライパージ流量	20ml/min
ディソーププレヒート温度	-30℃
トラップディソープ時間	6 min
トラップディソープ温度	275℃
クライオクール温度	-190℃
クライオインジェクト時間	5min
クライオインジェクト温度	200℃
トラップベイク時間	10min

トラップベイク温度	280℃
MCS ベイク温度	280℃

[検量線]

第1法と同じ（注3）

[定量]

第1法と同じ

[濃度の算出]

第1法と同じ

[装置検出下限値 (IDL)]

本分析に用いた低温濃縮装置付き GCMS の IDL を下表に示す（注4）。

物質	IDL (pg)	試料量 (ml)	IDL 試料換算値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
テトラフルオロエチレン	22	500ml	0.038

[測定方法の検出下限値 (MDL)、定量下限値 (MQL)]

合成空気に標準品を添加して求めた、本測定方法における検出下限値及び定量下限値を下表に示す（注5）。

物質	試料量 (ml)	検出下限値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	定量下限値 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
テトラフルオロエチレン	500ml	0.038	0.097

d. 注解

(注1) 一次トラップ管の作成

沸点の低いテトラフルオロエチレンを濃縮するため、ブレイクスルーを防ぐ目的で、低温濃縮用一次トラップ管に、吸着力の強いカーボキセン1000を120mg充填する。

これを窒素気流中300℃で一昼夜エージングし、テクマー社製AUTOCAN（低温濃縮装置）に装着する。

(注2) クライオフォーカスチューブ

沸点の低いテトラフルオロエチレンを濃縮するため、ブレイクスルーを防ぐ目的で、クライオフォーカスに用いるチューブは、キャピラリーカラム内面にポリマー系吸着剤をコーティングしたPLOTカラム（クロムパック社製CP-PoraBOND Q）を用いる。

分析カラムとしても同カラムを用いているため、分析カラム入口を直接クライオフォーカス部に装着する。

（注３）検量線の作成

標準ガスの濃縮量を可変して検量線を作成することが難しい装置の場合は、段階的に濃度の違う標準ガスを作成し、その一定量を濃縮して検量線を作成しても良い。

（注４）装置検出下限値(IDL)

装置検出下限値(IDL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」平成１７年３月環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課に準じて、次頁のとおり算出した。

装置由来のテトラフルオロエチレンが検出されたため、操作ブランクからも標準偏差を求め、その値の大きい方を装置の標準偏差とし、これをもとに装置検出下限値（IDL）を算出し、 $0.038\mu\text{g}/\text{m}^3$ となった。

表 1. 標準液繰り返し分析による装置検出下限(IDL)の算出

物質名	テトラフルオロエチレン
試料濃縮量(mL)	500
注入量(pg)	208
結果 1	202
結果 2	213
結果 3	213
結果 4	201
結果 5	204
結果 6	199
結果 7	207
平均値	206
標準偏差	4.85
IDL ^{*1}	18.8
IDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} ^{*2}	0.038
CV(%)	2.1

$$\text{※ IDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

*1: IDL=標準偏差 $\times 1.9432 \times 2$

*2: IDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)}=IDL $\times 1/\text{大気濃縮量(mL)}$

表 2. 操作ブランクの繰り返し分析による装置検出下限(IDL)の算出

物質名	テトラフルオロエチレン
試料濃縮量(mL)	500
注入量(pg)	0
結果 1	10.2
結果 2	16.5
結果 3	8.4
結果 4	5.1
結果 5	11.0
結果 6	8.5
結果 7	12.5
平均値	10.3
標準偏差	3.61
IDL ^{*1}	14.0
IDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} ^{*2}	0.028
CV(%)	35

$$\text{※ IDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

*1: IDL=標準偏差 $\times 1.9432 \times 2$

*2: IDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)}=IDL $\times 1/\text{大気濃縮量(mL)}$

(注5) 測定方法の検出下限値(MDL)

「化学物質環境実態調査実施の手引き」平成17年3月環境省総合環境政策局
環境保健部環境安全課に準じて、以下のとおり算出した。

表3. 装置検出下限(MDL)の算出

物質名	テトラフルオロエチレン
試料濃縮量(mL)	500
注入量(pg)	208
結果 1	202
結果 2	213
結果 3	213
結果 4	201
結果 5	204
結果 6	199
結果 7	207
平均値	206
標準偏差	4.85
MDL ^{*1}	18.8
MDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} ^{*2}	0.038
MQL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} ^{*3}	0.097
CV(%)	2.1

$$\text{※ MDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

*1: MDL=標準偏差 $\times 1.9432 \times 2$

*2: MDL{試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)}=IDL $\times 1/\text{大気濃縮量(mL)}$

*3: MQL = $\sigma_{n-1} \times 1.0$

(2) 解説

a. 分析法

a-1. 分析フローチャート

第1法と同じ

a-2. 分析法の検討

・検量線

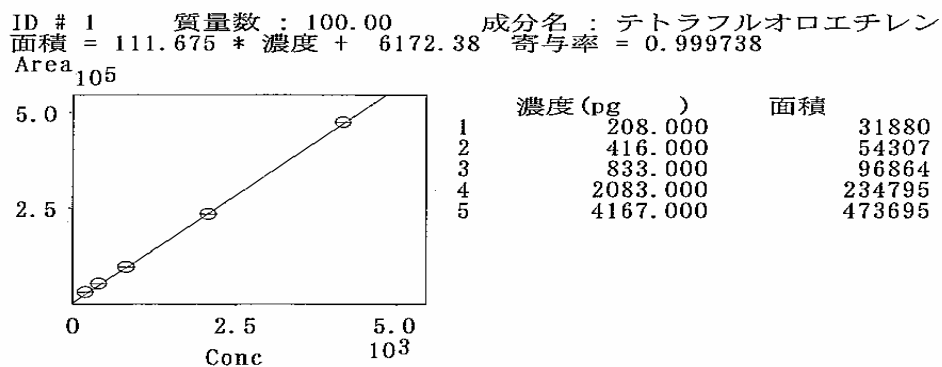


図1 検量線

・検量線のクロマトグラム

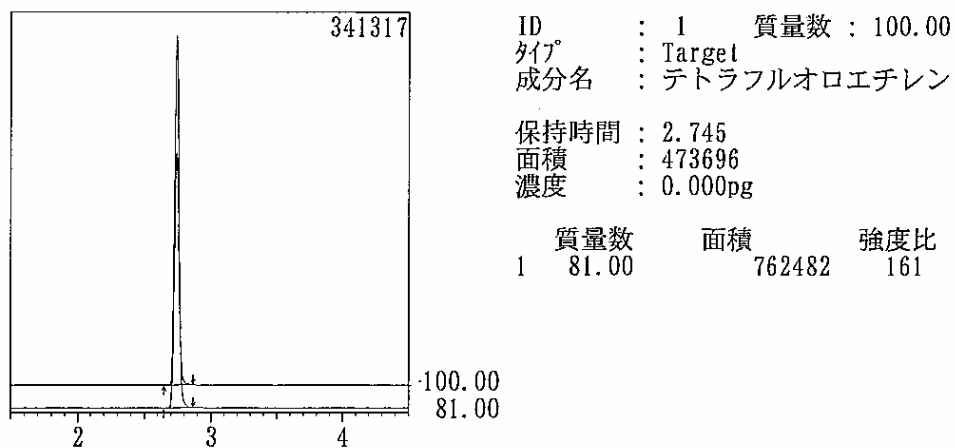


図2 SIM クロマトグラム (4.17ng 注入時)

・マススペクトル

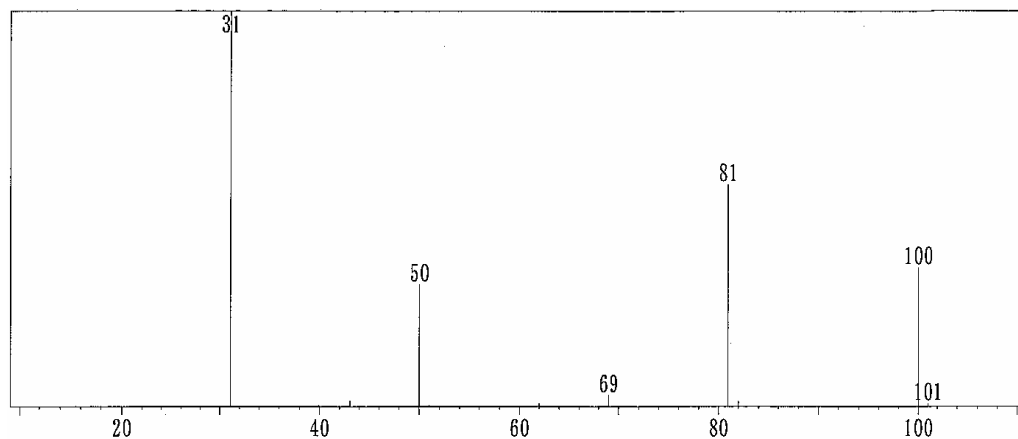


図3 マススペクトル

・破過容量測定結果

低温濃縮装置の一次トラップ管に、カーボキセン 1000 (120mg) を充填したものを、そのままガスクロマトグラフの分離管とし、破過容量の対数と絶対温度の逆数との直線関係を利用して、破過容量を予測した結果を下記に示す。

このように吸着力の強いカーボキセン 1000 を用いても、テトラフルオロエチレンの沸点が低いため、20℃の常温採取では 1 L 程度の採取によって、破過が起こる。

	20℃	0℃	-30℃
テトラフルオロエチレン破過容量	0.82L	2.9L	29L

表4. 破過容量測定結果

・添加回収試験

本法により大気試料をキャニスターに採取してテトラフルオロエチレンが検出されなかった大気 3 試料に、標準ガスを希釈後ガス中で $4.17 \mu\text{g}/\text{m}^3$ となるように添加し、添加回収試験を行った。

この結果、3 試料の平均回収率は、92.4%となり、良好な添加回収率が得られた。

表5. 添加回収試験結果

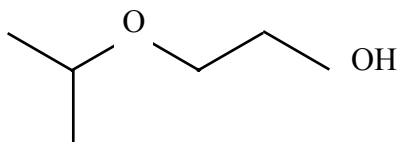
物質名	テトラフルオロエチレン
試料濃縮量(mL)	500
注入量(pg)	2083
結果 1	1832
結果 2	2029
結果 3	1916
平均値	1926
標準偏差	98.7
CV(%)	5.1
濃度換算平均値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	3.85
設定濃度($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	4.17
回収率(%)	92.4

B. 2- (1-メチルエトキシ) -エタノール

(別名 : 2-イソプロポキシエタノール、エチレングリコールモノイソプロピルエーテル)

2-(1-methylethoxy)-ethanol

【対象物質の構造】



CAS 番号 : 109-59-1

【物理化学的性状】

分子量	融点 (°C)	沸点 (°C)	蒸気圧(kPa)
104.15	-60	144 (990 hPa)	0.8 (20°C)

蒸気密度	比重	LogPow	引火点 (°C)
(空気=1) : 3.6	0.904 (20°C)	0.05 (実測値)	47

(出典) 和光純薬「MSDS」、SRC

【毒性、用途 等】

毒性情報 : ラット (腹腔内注射 LD50) 800 mg/kg
ラット (経気道吸入、4 時間 LC50) 3100 mg/m³
ラット (経口 LD50) 5660 mg/kg
マウス (経口 LD50) 4900 mg/kg
マウス (腹腔内注射 LD50) 1860 mg/kg
マウス (経気道吸入、7 時間 LC50) 1930 ppm
許容濃度 : ACGIH TWA 25 ppm
用途 : 合成中間体

1. 分 析 法

(1) 分析法の概要

TenaxTA を充填した捕集管を用い、大気試料を常温固体吸着-加熱脱着-ガスクロマトグラフ質量分析法で分析する。

(2) 試薬・器具

a. 試薬

2-(1-メチルエトキシ)-エタノール	: 和光純薬工業株式会社 (99.0%)
メタノール	: フタル酸エステル試験用
吸着剤	: ジーエルサイエンス株式会社 TenaxTA(60/80mesh)
石英ウール	
ヘリウム	: ジャパンエアガシズ社製超高純度ヘリウムガス
合成空気	: ジャパンエアガシズ社製混合ガス
窒素ガス	: カインドガス社製高純度窒素ガス

b. 試薬の安定性・毒性

光により変質する揮発性物質。蒸気吸入、皮膚吸収されるおそれがある。引火しやすい液体で蒸気は空気と爆発性混合ガスをつくり、引火爆発の危険があるため取り扱いには十分注意する。

c. 器具

メスフラスコ	
捕集管	: 内径 4 mm、長さ 90 mm
サーマルマスフローコントローラ (試料採取用ポンプ)	: ジーエルサイエンス株式会社

(3) 分析法

a. 試料採取及び保存

環境省「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

内径 4 mm、長さ 90 mm の捕集管に TenaxTA (60/80mesh) を 170 mg 充填し、その両端を石英ウールで軽く押さえる(注 1)。この捕集管を空焼き洗浄 (エージング) 後(注 2)、両端を金属製のキャップで密閉し、試料採取に用いる。

また、採取には 10 mL/min で 24 時間精度よく吸引可能なポンプ等を使用する。試料採取前後の捕集管は活性炭等を入れた密閉容器に入れ輸送・保存する。

b. 標準液の調製

2-(1-メチルエトキシ)-エタノールを正確に秤取り、メタノールに溶解し、標準原液とする。この標準原液をメタノールで順次希釈し、標準液を作成する。

c. 測定

捕集管を装置に取り付け、内部をヘリウムで置換した後、280℃で加熱しながら、ヘリウムを流し(60mL/min×10 分間)、捕集管内の 2-(1-メチルエトキシ)-エタノールを加熱脱離させる。同時に加熱脱離させた 2-(1-メチルエトキシ)-エタノールを-20℃に保った二次吸着管(TenaxTA)に吸着させる。

その後、二次吸着管部を 200℃で 10 分間、急速加熱し、2-(1-メチルエトキシ)-エタノールを脱離し、GC/MS に導入する。

c-1. GC/MS 分析条件

GC/MS 機器	: 島津製作所製 GCMS-QP2010
カラム	: RESTEK 製「Rtx-1」 (60 m×0.32 mmID×1 μm) 液相 100% dimethyl polysiloxane
昇温条件	: 40℃(2min)→30℃/min→100℃→3℃/min→120℃ →30℃/min→240℃(5 min)
注入方法	: スプリット(20:1) 島津製作所製 TDTs-2010(加熱脱着装置)
キャリアーガス	: He
インターフェース温度	: 240℃
イオン源温度	: 240℃
検出モード	: SIM
モニターイオン	: (定量用):89 (確認用):59

c-2. 加熱脱着装置 設定条件

使用機種	: 島津製作所製 TDTs-2010
バルブ保温	: 280℃
トラップ冷却	: -20℃
トラップ加熱	: 200℃ 10 min (待機値 50℃)
インターフェース加熱	: 200℃ (待機値 100℃)
ブロック	: 280℃
ライン	: 280℃
サンプル	: 60 mL/min (10 min)
ページ	: 0 min
フラッシュ	: 0 min
待機時間	: 5 min

c-3. 検量線

標準溶液 1 μ L を He、N₂ 等の不活性ガスを流しながら捕集管に添加し、標準物質の添加量と 2-(1-メチルエトキシ)-エタノールのピーク面積を用いて検量線を作成する。

c-4. 定量

試料採取した捕集管を、加熱脱着装置に取り付け、GC/MS に導入し、ピーク面積より捕集管内の 2-(1-メチルエトキシ)-エタノール濃度を測定する。

c-5. 濃度の算出

$$C \text{ (}\mu\text{g/m}^3\text{)} = \frac{As - At}{v \times 293 / (273 + t) \times P / 101.3} \quad *$$

C : 20℃における大気中の測定物質の濃度 ($\mu\text{g/m}^3$)

As : 試料中の測定対象物質の重量 (ng)

At : 測定対象物質のトラベルブランク値 (ng)

操作ブランクと同等とみなせる場合は操作ブランク値を用いる。

v : 試料採取量 (L)

t : 試料採取時における平均気温 (℃)

P : 試料採取時における平均大気圧 (kPa)

※ サーマルマスフローコントローラを使用する場合、温度・気圧の補正は不要

c-6. 装置検出下限 (IDL)

本分析に用いた GC/MS の IDL を下表に示す (注 3)。

物質	IDL (ng)	採取量 (L)	IDL 試料換算値 ($\mu\text{g/m}^3$)
2-(1-メチルエトキシ)-エタノール	0.10	14.4	0.007

[測定方法の検出下限 (MDL)、定量下限(MQL)]

本測定法における検出下限及び定量下限を以下に示す (注 4)。

物質	採取量 (L)	検出下限値 ($\mu\text{g/m}^3$)	定量下限値 ($\mu\text{g/m}^3$)
2-(1-メチルエトキシ)-エタノール	14.4	0.011	0.029

(4) 注 解

(注 1)

内径と長さ、充填剤の量が異なる捕集管を用いる場合には、破過容量を確認してから使用する。

(注 2)

吸着剤を充填した捕集管は、He、N₂ 等の不活性ガスを流しながら 280℃で一昼夜程度エージングし、ブランクがないことを確認して使用する。数本同時にエージングする場合は、10%程度の割合で捕集管のブランクを確認し、ブランクがなければ同ロットの捕集管を試料採取に使用する。ブランクが確認された場合は全ての捕集管を再度エージング後、ブランク確認を行い、測定に使用する。

(注 3)

IDL (装置検出下限値) は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月)に従って、表 1 のとおり算出した。

表 1. 装置検出下限(IDL)の算出

物質名	2-(1-メチルエトキシ)-エタノール
試料量 (L)	14.4 (全量分析)
注入濃度(μg /mL)	1.413
装置 (捕集管) 注入量(μL)	1
結果 1	1.345
結果 2	1.348
結果 3	1.347
結果 4	1.371
結果 5	1.399
結果 6	1.403
結果 7	1.345
平均値	1.365
標準偏差	0.0260
IDL ^{*1}	0.10
IDL {試料換算値(μg /m ³)} ^{*2}	0.0070
CV (%)	1.90

$$\text{※ IDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

* 1 : IDL=標準偏差×1.9432×2

* 2 : IDL {試料換算値(μg /m³)} =IDL×1 /大気捕集量 (L)

・ 大気捕集量=14.4 L (10 mL/min×24 時間)

(注4)

測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成17年3月)に従って、表2のとおり算出した。

表2. 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出

物質名	2-(1-メチルエトキシ)-エタノール
試料量 (L)	14.4 (全量分析)
注入濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.582
装置 (捕集管) 注入量(μL)	1
結果 1	0.582
結果 2	0.498
結果 3	0.593
結果 4	0.544
結果 5	0.511
結果 6	0.583
結果 7	0.605
平均値	0.559
標準偏差	0.0421
MDL ^{*1}	0.1636
MDL {試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)}	0.011 ^{*2}
MQL {試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)}	0.029 ^{*3}
CV (%)	7.52

$$\text{※ MDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

$$\text{※ MQL} = \sigma_{n-1} \times 10$$

* 1 : MDL=標準偏差 $\times 1.9432 \times 2$

* 2 : MDL {試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} = MDL $\times 1$ / 大気捕集量 (L)

・ 大気捕集量=14.4 L (10 mL/min $\times 24$ 時間)

* 3 : MQL {試料換算値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)} = 標準偏差 $\times 10 \times 1$ / 大気捕集量 (L)

2. 解 説

a. 分析法

a-1. フローチャート

分析のフローチャート及び加熱脱離～機器への導入を図 1、図 2 に示す。

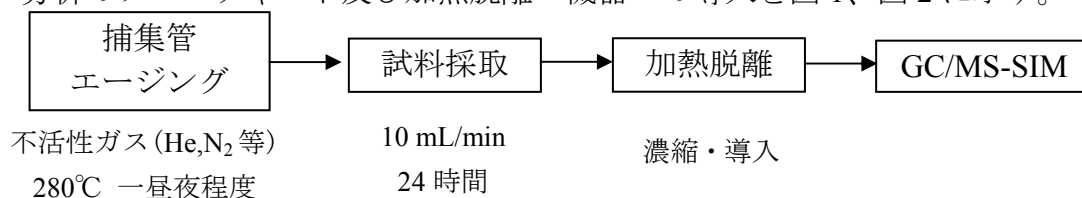


図 1. 分析フロー

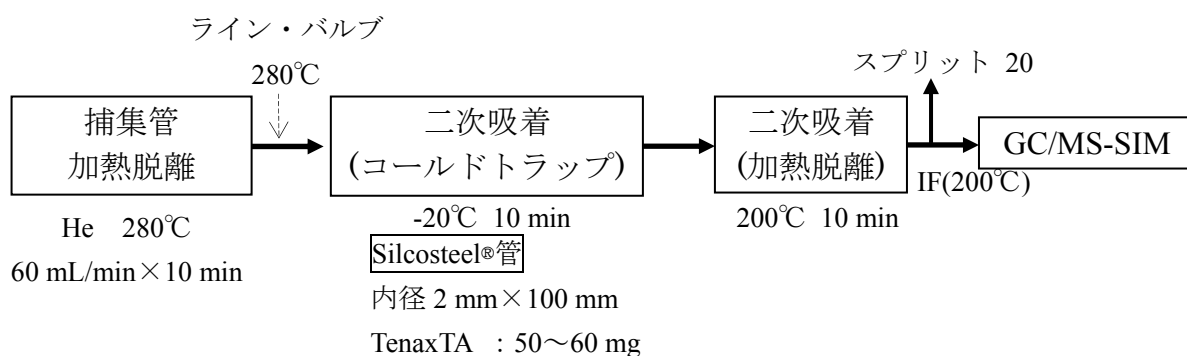


図 2. 加熱脱離～機器への導入

a-2. 検量線及びマススペクトル

検量線及びマススペクトル図等を以下に示す。

ID#:1 m/z:89.00 化合物名:2-(1-methylethoxy)ethanol
 $f(x)=12705.787410 \cdot x - 947.110758$
 相関係数(R)=0.999981 寄与率(R²)=0.999961
 平均RF:12497.09 RFSD:257.78 RFRSD:2.06
 検量線:直線
 原点:通さない
 重み付け法:なし
 絶対検量線法

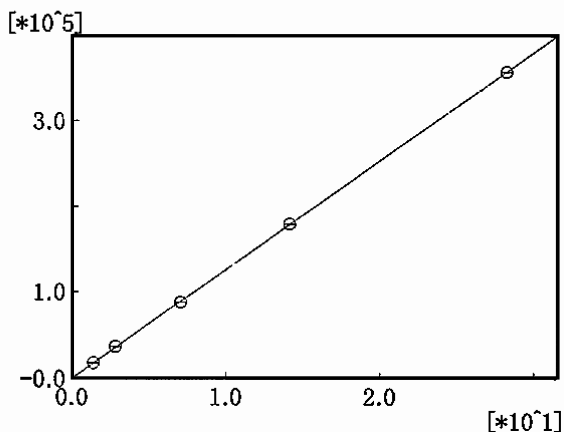


図 3. 検量線

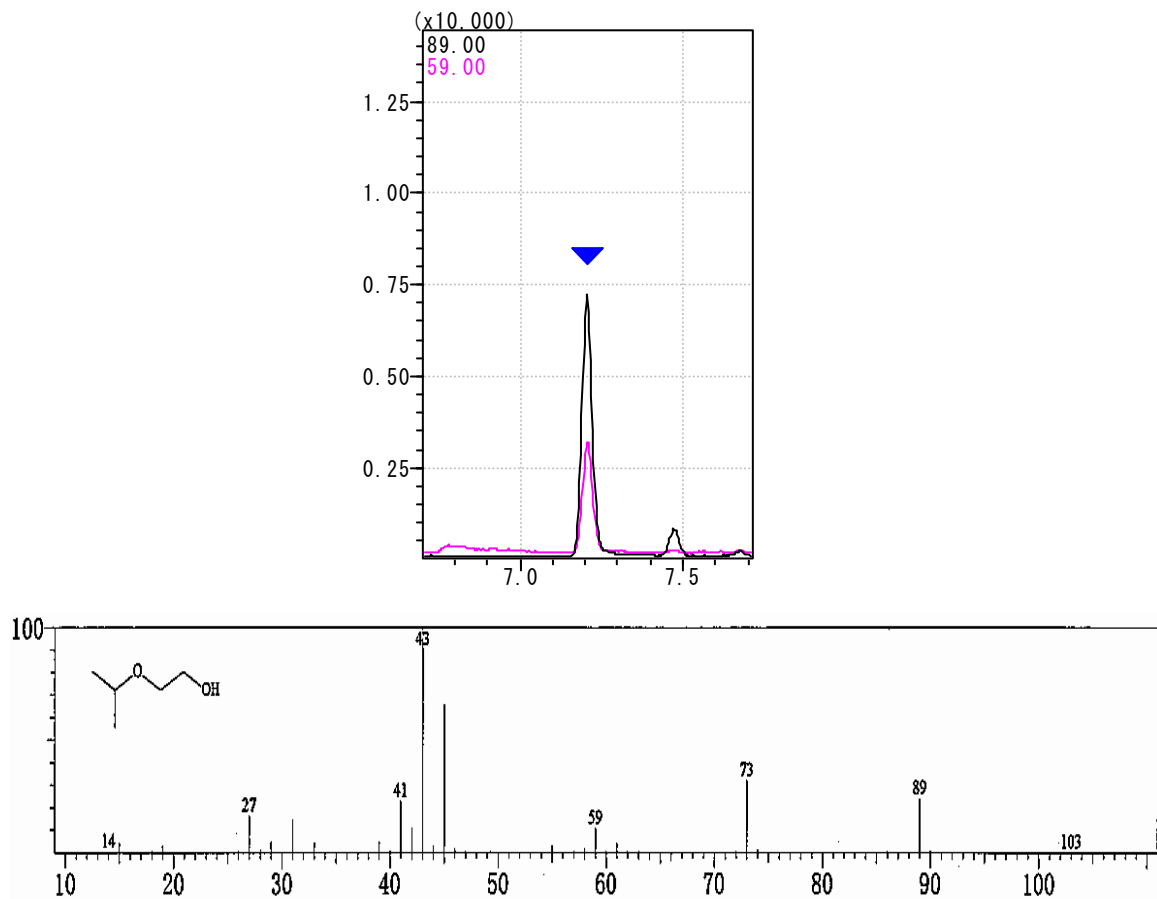


図 4. クロマトグラムとマススペクトル

a-3. 添加回収実験結果

大気（京都市）への標準物質添加回収実験結果を表 3 に示す。

表 3. 添加回収実験結果

試料名	試料量 (L)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	回収率 (%)	変動係数 (%)
大気*	14.4	無添加	5	N.D.	-	-
	14.4	5.820	5	0.415	103	1.9

*：実験時 平均気温 10.7℃ 平均湿度 75.0%

a-4. 捕集管の破過容量測定

本法により使用した捕集管における、2-(1-メチルエトキシ)-エタノールの破過容量測定結果を表4及び図5に示す。本法の捕集管を用いた場合、規定量(14.4L)は十分に試料採取に耐えうる採取量である。ただし、捕集管の破過容量は捕集管の内径や長さ、吸着剤の充填量で異なるため、その都度、確認が必要である。

捕集管 [内径] 4 mm [長さ] 90 mm

[充填剤] TenaxTA (60/80mesh) [充填量] 170 mg

方法 ① 本法の捕集管を下図のように GC-FID に取り付ける。



② 保持容量の対数と捕集管温度（絶対温度）の逆数は比例するので温度を変えて測定(5点)し、外挿により破過容量を求めた。

表 4. 破過容量測定結果

温度 (°C)	破過容量 (L)	温度 (°C)	破過容量 (L)
0	1408	20	130
5	752	25	75
10	411	30	45
15	229	35	27

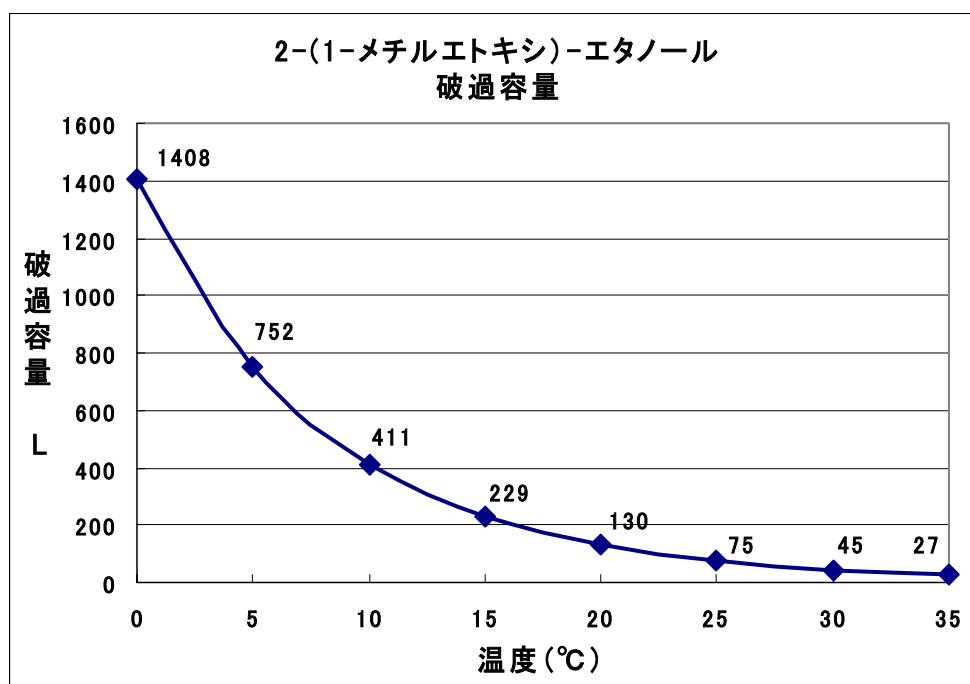


図 5. 破過容量測定結果

a-5. 保存性の確認

エージングした捕集管を活性炭入りの密閉容器内で一定期間保管し、ブランクを確認することで試料採取前の捕集管の保存性を確認した。同様に 2-(1-メチルエトキシ)-エタノール標準品を 14.13 ng(0.98 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 相当)添加した捕集管も準備し、一定期間保管することで試料採取後の捕集管での保存性を確認した(各 2 検体実施)。その結果を表 5 に示す。試料採取前後で捕集管は 20 日間安定であった。

表 5. 保存性の確認

添加なし($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		添加あり回収率(%)	
初期値	<0.1	初期値	100
1 日後	<0.1	1 日後	103
3 日後	<0.1	3 日後	102
5 日後	<0.1	5 日後	100
7 日後	<0.1	7 日後	98
20 日後	<0.1	20 日後	105

a-6. 湿度の影響確認

捕集管に 2-(1-メチルエトキシ)-エタノール標準品を 14.13 ng (0.98 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 相当)添加し、湿度をそれぞれ 0、50、90%(at22°C)に制御した合成空気を 14.4 L 通気させ、その回収率を確認した (各 3 検体実施)。結果は表 6 のとおりであった。本法において、高湿度条件下でも、湿度(水分)の影響を受けることなく、試料採取可能であることが確認できた。

表 6. 湿度の影響

湿度(at 22°C) (%)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0	98	98
	94	
	103	
50	103	102
	104	
	99	
90	101	103
	104	
	104	

a-7. 環境試料分析例

大気（京都市）からは検出されなかった。

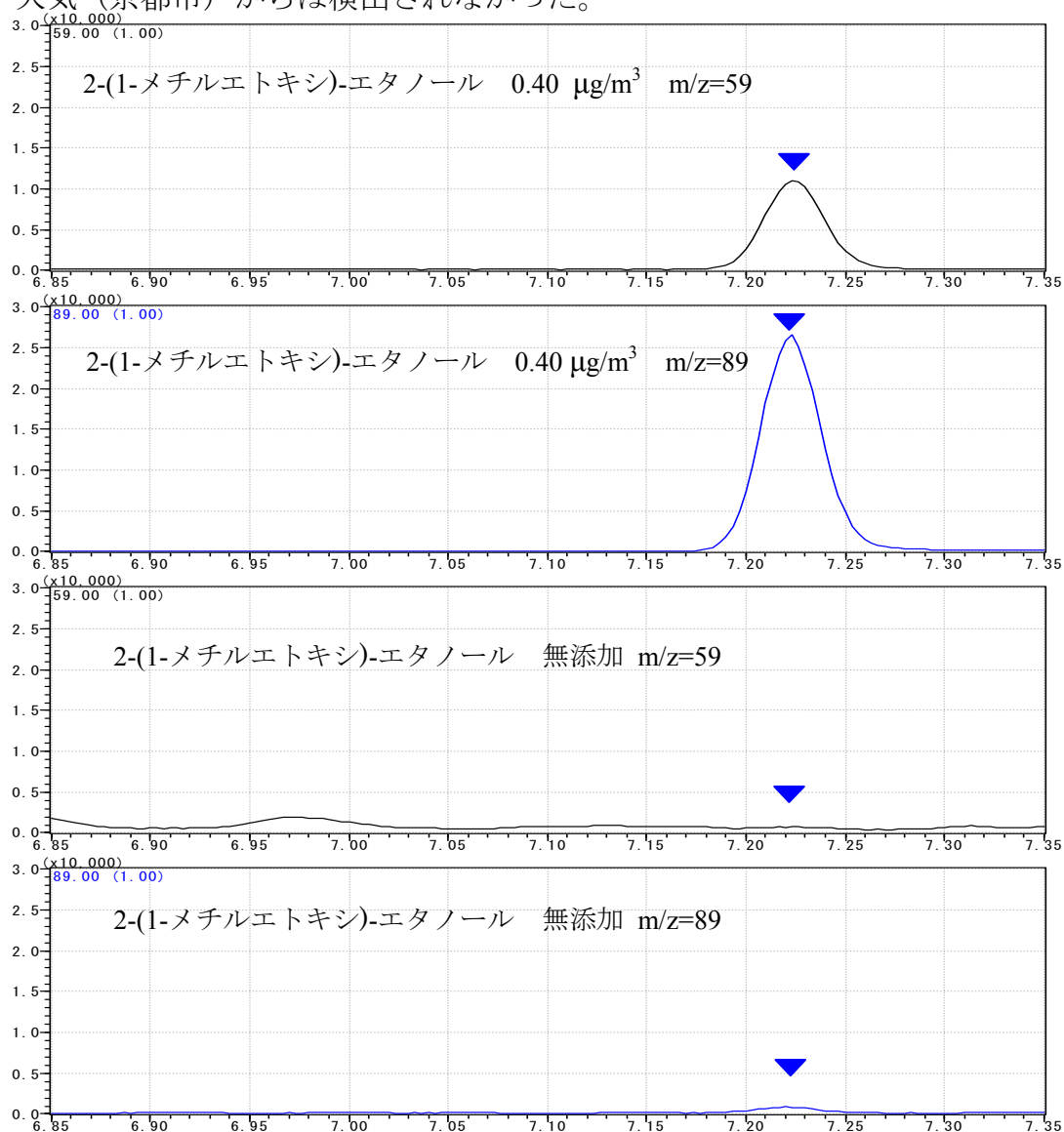


図 6. 京都市環境大気試料クロマトグラム

b. 評価

本法により、大気中 2-(1-メチルエトキシ)-エタノールは、 $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ レベルで定量が可能である。

c. 試料採取及び試料の輸送

試料採取前（エージング後）の捕集管及び試料採取後の捕集管は活性炭等の入った密閉容器にて輸送・保管する。

d. 参考文献

「有害大気汚染物質測定の実際」 （初版）平成 9 年 6 月 25 日

編集 ：有害大気汚染物質測定の実際編集委員会

発行 ：幸田 正孝

発行所：(財)日本環境衛生センター

2-(1-methylethoxy)-ethanol

Summary

Environmental air sampling, cleanup and analytical methodology procedure was developed for 2-(1-methylethoxy)-ethanol. Briefly, Tenax-TA air sample kit was conditioned with pure helium or nitrogen stream for overnight with 280°C. After conditioning, the sampling was done with the rate of 10 mL/min for 24-h. The sample kit was then subjected to thermal desorption and analyzed by GC/MS-SIM.

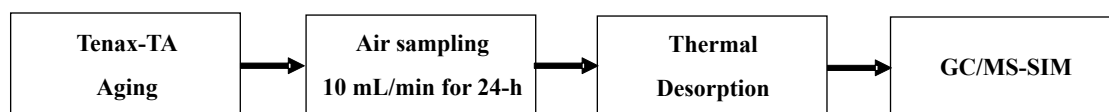
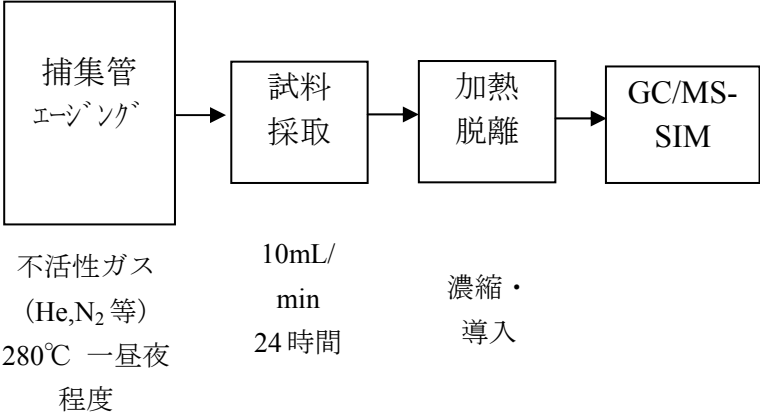


Figure 1. Flow chart illustrate sampling, cleanup and analytical method of 2-(1-methylethoxy)-ethanol

物質名	分析フローチャート	備考
2-（1-メチル エトキシ）- エタノール	 <pre> graph LR A[捕集管 エージング] --> B[試料 採取] B --> C[加熱 脱離] C --> D[GC/MS- SIM] </pre> 不活性ガス (He, N₂ 等) 280℃ 一昼夜 程度 10mL/ min 24時間 濃縮・ 導入	装置： 加熱脱着- GC/MS-SIM カラム： Rtx-1 (60m× 0.32mmID×1μm) 定量下限値： 0.1 μg/m³