

的とする。

## 1) 実態調査

### B. 研究方法

宮城県、福島県、及び鳥取県の3県で、防蟻処理を施した築2年以内の1戸建て住宅とした(18件)。

サンプリング機器を組み立てる紙ホルダーにガラス繊維ろ紙と、エムポアディスクを挿入する。このサンプリング装置を床下と室内に設置し、流量 3000(ml/min)で 24(h)、試料空気の捕集を行った。

・分析方法 (引用文献 2 を参照。)

捕集後のディスクをろ紙ホルダーから取り出し、スピッツ管に挿入し、アセトンで溶出する。次に、GC-MS にその溶出溶液を注入して分析を行った。

## 2) 化学物質発生に関する実験室実験

### B. 研究方法

防蟻剤と、防虫剤を本実験の対象とした。それぞれの薬剤を、スモールチェンバーに導入し、発生ガスをガラス繊維ろ紙、エンポアディスク、活性炭チューブに捕集した。

・分析方法

有機リン系化合物については、1)と同様の分析を行い、VOC に関しては捕集の終了したチャコールチューブを GC-FID に導入し、分析を行った。

### C. 研究結果

以下の物質について、室内及び床下の濃度測定を行った。

- ①TBP：トリブチルホスフェート
- ②TCEP：トリス（2-クロロエチル）ホスフェート
- ③DZ：ダイアジノン
- ④TICPP：トリス（ $\beta$ -イソクロロピル）ホスフェート
- ⑤CPME：クロロピリホスメチル
- ⑥MPP：フェンチオン
- ⑦MEP：フェニトロチオン
- ⑧CP：クロロピリホス
- ⑨TBEP：トリス（2-ブトキシエチル）ホスフェート
- ⑩TEHP：トリス（2-エチルヘキシル）ホスフェート
- ⑪PP：ピリダフェンチオン
- ⑫TCP：トリクレジルホスフェート

防蟻剤として、以前は有機塩素系化学物質のひとつであるクロルデンが使用されていたが、化審法により禁止になった。その後、クロルピリフォスに代表される有機リン系の化学物質が使用されるようになった。他の有機リン系の注目すべき化学物質としてはピリダフェンチオン S-421、ホキシム、フェニトロチオンが挙げられる。

CP (クロルピリフォス) や CPME (クロルピリホスメチル) はあまり検出されずに、リン酸エステル系の TCEP, TBP, TBEP, TICPP が、比較的高い頻度で検出された。また、農業由来であろう MPP, MEP も検出された。尚、表中の空欄は、いずれも N.D. を示すものである。

### 3) チェンバー実験による揮発性有機化合物 (VOC) の測定

#### B. 研究方法

シロアリ防除・駆除を目的とした防蟻剤と、タンス等に設置する防虫剤を本実験の対象とした。尚、本防蟻・防虫剤は一般の量販店にて購入した。

#### C. 研究結果

##### ① 蟻剤における有機リン系化学物質の発生

市販の2種類の防蟻剤に関して、チェンバー実験を行い、各種の汚染物質の濃度を測定した。いずれの実験においても、ガス状のCP (クロルピリフォス) を検出した。

##### ② 防蟻剤における VOC の発生

市販されている防蟻剤 A、防蟻剤 B、及び防虫剤 A を用い、3回ずつ実験を行った。

VOC 分類別発生量と TVOC 発生量を求め比較した。

防蟻剤に関しては、20 数種類の VOC が検出され、検出された物質を単位時間当りの発生量 (ng/h) としてまとめた。

##### ③ 防虫剤における VOC の発生

・防虫剤 A について

防虫剤 A (成分: p-ジクロロベンゼン + 防かび剤とのカタログ表示) の、1回目では 19 種類、2回目では 14 種類、3回目では 12 種類の VOC が検出され、そのうち、共通して検出されたものを (物質名: 発生量  $\mu\text{g/h}$ ) 以下に示す。脂肪族炭化水素で n-ウンデカン: 1.27~11.1、n-ドデカン: 1.55~11.8、n-テトラデカン: 1.58~4.07、芳香族炭化水素で m,p-キシレン: 1.04~2.45、1,2,4-トリメチルベンゼン: 0.371~5.53、1,2,3-トリメチルベンゼン: 0.107~3.61、ハロゲン化炭化水素で p-ジクロロベンゼン: 4210~8230 あった。(7種類)

主成分が p-ジクロロベンゼンの防虫剤については、VOC 組成比で (VOC/TVOC) は、90% 程度の割合で検出された。

#### D. 考察

室内での防蟻、防虫剤関連物質の発生メカニズムを理論的に検討した。室内濃度 C は、床下構成部材、及び土壌からの発生量 M と床下の換気性状 (床下換気量  $Q_1$ )、室換気量  $Q_2$  より、主として構成され、 $Q_1$  は、床下換気口の配置、数、隣接する建築物等に影響を受けるものと考えられる。

よって、設計段階での床下換気量  $Q_1$  及び室換気量  $Q_2$  の確保や、施工段階での発生量 M の抑制により、室内濃度の低減化が図れるものと考えられる。

## E. まとめ

①今回の実態測定においては、有機リン系の汚染物はほとんど検出されなかった。原因としては、2住戸を除いて、測定対象住戸が築後2年以内と新しく、防蟻処理剤の成分に施工業者が配慮したことによるものと考えられる。

従って、本測定結果は、更に古い時期に防蟻処理を行った住戸の汚染の実態を反映しているとは限らないと考えられる。

また、業者に対する聞き取り調査から、福島での調査対象住戸で用いられた防蟻剤は、同一製品であることが判明している。

②チェンバー実験の結果から、近年、生産・販売されている防蟻剤について、有機リン系化学物質の発生について資料を得ることができた。

③VOCの発生に関しての資料を得ることができた。VOCについては、クレオソートとクロルピリフォスを用いた防虫剤では、クロルピリフォスと約26種類のVOCについて定量的に把握できた。防蟻剤からの汚染物発生量を得ることにより、防蟻剤に由来した室内濃度予測が可能となる。本研究では一部の有機リン系の汚染物と約26種のVOC濃度の予測が可能となる定量が得られたことになる。

### ④今後の課題

- ・ 築後一年から二年以内の住戸に関して、有機リン系の汚染物質はほとんど検出されなかった。
- ・ しかし、チェンバー実験の結果からは多種多様のVOCを測定する可能性が示唆された。防蟻処理を施した住宅でのVOC濃度の測定も重要である。
- ・ 本実態調査結果は、更に古い時期に防蟻処理を行った住戸の汚染の実態を反映しているとは限らない。防蟻処理を二年以上前に行った住宅の調査が必要である。

## V. 室内空気中の化学物質の測定方法の開発に関する研究

### A. 研究目的

HCHOのガイドライン制定に伴うサンプリング法や測定法に関する標準的な方法は現在、制定されていない。そこで、本研究においてはISO原案、EPA-method等を参考にHCHOのサンプリング法及び測定法の標準化を図る。

### B. 研究方法

本研究においては居住環境内におけるHCHOのサンプリング法や測定法の標準化に際し、ISO-16000-2、16000-3案及び既往研究等を参考に実験を行い、我が国における室内HCHOのサンプリング法及び測定方法の標準化案を提案する。

### C. 研究結果

#### 1)ホルムアルデヒドのサンプリング方法の検討

ISO案(16000-2)及び既往研究等を参考に検討した。

## ①測定法の分類

室内のHCHO濃度を測定する方法は、大きく分けると手分析法と連続分析法に大別される。手分析法はサンプリングから分析まで全て手動で行う方式である。一方、連続分析法は全て自動で行う方式である。この手分析法には短時間測定用としてアクティブサンプリング法（ポンプ法）や検知管法等がある。一方、長時間測定用としてはパッシブサンプリング法やアクティブサンプリング法がある。測定方法には短時間測定法、長時間測定法、連続測定法、予備的測定法等がある。

## ②測定目的

室内測定を行う際にはガイドライン値に適合しているか否かの判定、住宅改善効果の判定、日常生活における平均濃度の判定等の目的を明確に掲げる必要がある。

## ③サンプリング時間及び頻度

サンプリング時間は測定目的によって異なる。例えば、ガイドライン値に適合しているか否かを判定する場合は、住宅内のHCHO濃度が平衡に到達した後、短時間測定（30分サンプリング）測定を行えば良い。一方、長時間平均値を求める場合は一般的には24時間サンプリングが行われている。また、サンプリングの頻度はサンプリングの目的と測定誤差に依存する。例えば、室内濃度が $120\mu\text{g}/\text{m}^3$ （標準偏差 $5\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）の場合、定量のための信頼区間、すなわち、10%の信頼区間（ $\pm 12\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）で測定する場合、3測定が必要である。

④その他、サンプリング位置、結果の報告にも種々の項目を書き込む必要がある。

## ⑥室内HCHO濃度の平衡到達時間

ISO原案(16000-2 Indoor air Parts-2, Sampling strategy for form-aldehyde)では、対象室内の窓、扉等を開けて強制換気を行う。その後、開口部を閉鎖し8時間放置する。密閉状態で30分間サンプリングを行う。もし部屋が強制換気システム、暖房システムを持っており、日常生活がこの状態で行われている場合、測定の前、3時間稼働させてからサンプリングを行う。

また、室内HCHO濃度は湿度、温度、換気によって大きく影響を受ける。換気回数が0.5回程度の場合、平衡到達時間は約8時間である。0.5回以下になると平衡に達する時間は15時間以上になってくる。

我が国の住宅における実測例では、室内HCHO濃度の平衡到達時間は換気回数のみでなく、住宅の新旧、建材及び家具のエイジング状態によっても平衡到達時間が異なり、平衡到達時間は約1.5-90時間の範囲で変動している。

## ⑦各機関のサンプリング案

### \*短時間サンプリング

#### i) ECA案 (European Concerted Action)

- ・1日で測定する場合

自然換気 + 機械換気を15分実施、開口部閉鎖5時間後にサンプリングする。

- ・2日で測定する場合

自然換気を5時間以上実施、開口部閉鎖一晩(8時間以上)後にサンプリングする。

ii) 健康的な居住環境形成技術の開発プロジェクト案

- ・5時間で測定する場合

換気(9:0-9:30)→5時間閉鎖(9:30-14:30)→サンプリング(14:30-15:0)→5分換気(15:0-15:05)→1時間閉鎖(15:05-16:05)→サンプリング(16:05-16:35)

- ・8時間で測定する場合

換気(6:0-6:30)→8時間閉鎖(6:30-14:30)→サンプリング(14:30-15:0)→5分換気(15:0-15:05)→1時間閉鎖(15:05-16:05)→サンプリング(16:05-16:35)

\* 長時間サンプリング

i) ISO案

長時間(1日以上)サンプリングの場合は拡散型サンプラーが望ましい。

ii) 健康的な居住環境形成技術の開発プロジェクト案

通常的生活状態において24時間サンプリング(拡散型サンプリング)を行う。サンプリング開始時刻は以下の如く。

11時開始、17時開始、19時開始

⑧ 標準的なサンプリング法の提案

ISO及び既往研究を検討した結果、以下の如くサンプリング法を提案する。

\* 室内における最大濃度を求める場合

換気(20:30-21:0)→12時間閉鎖(21:0-9:0)→サンプリング(9:0-9:30)

\* 日平均濃度を濃度求める場合

日常生活の状態ですべて24時間サンプリングを行う(サンプリング操作等を考慮して早朝及び夜遅い時間帯のサンプリング開始は回避することが望ましい)。

2) 測定方法の検討

ISO(16000-3)案及び既往研究等(2, 4-DNPH捕集-溶媒抽出-HPLC法)を参考に検討した今回、検討した方法は固相捕集-溶媒抽出-高速液体クロマトグラフ法である。その概要は2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン含浸シリカゲルに空気中のHCHOを捕集した後、アセトニトリルでヒドラゾン抽出後、高速液体クロマトグラフ法で測定する方法である。

D. 考察

1) HCHOサンプリング法

住宅内における最大濃度を求める場合、ISO原案(自然換気の場合)では、測定対象家屋の窓、扉等開口部を全て開け強制換気(30分間外気を導入する)を行う。その後、開口部を8時間閉鎖する。密閉状態で30分間サンプリング行った後、HCHOの分析を行う。この8時間放置の根拠としては図1に示したように換気回数0.5回/hr程度では室内に放散されるHCHOと外気に放出していくHCHOが平衡状態に達するのに8時間を要することを示している。また、換気回数が0.5回/hr以下では室内HCHO濃度が平衡状態に達するま

で15時間以上要することを示している。

一方、我が国の場合、住宅構造、面積、容積、建材の種類、住宅の熱容量等が異なる為に、ISO原案がそのまま使用出来るか否か疑問を指摘する研究者がいる。そこで、本研究においては住宅構造、面積、容積、換気回数の異なる住宅内で平衡到達時間調査を実施した。その結果、図2で示したように換気回数の殆ど同じような住宅の場合でも平衡到達時間が異なる結果が得られている。この原因については明確ではないが、使用している建材の乾燥状態、建物のエージング状態等によって放散量が異なってくるとの指摘もある。従って、換気回数のみで平衡到達時間を予測できないと主張する研究者もいる。

一方、室内HCHO濃度は14-15時頃に濃度が最も高くなるので、この時間帯にサンプリングできるように強制換気、8時間閉鎖時間等を組み込んだサンプリング計画を提案している研究報告も存在する。しかし、この場合、日常生活が殆ど不可能になり、ヒトが居住している場合、このサンプリング計画は困難である。むしろ、未入居の住宅の場合に有効なサンプリング計画である。

よって、ヒトが通常的生活している状態で、最大負荷状態（最も濃度が高い状態、平衡状態）に近い状態は夜間の睡眠時間帯と考えられる。よ

って、本研究においては室内濃度がガイドライン値に適合しているか否かを判定する場合、以下のようなサンプリング計画を提案する。

換気(20:30-21:0)→12時間閉鎖(21:0-9:0)→サンプリング(9:0-9:30)→分析

一方、通常的生活状態の室内濃度を求める場合は24時間サンプリングを行う。この場合、サンプリング開始時刻を早朝或いは夜遅い時間帯を避けることが望ましい。

## 2)分析法

2,4-DNPHカートリッジを用いてHCHOを捕集する方法は、空気中に存在するNO<sub>2</sub>によって妨害を受けるとの指摘がある。本研究において室内環境内で存在する程度のNO<sub>2</sub>(0.2ppm)とHCHO(0.1ppm)ガスを混合させ影響実験を行った。その結果、0.2ppm程度のNO<sub>2</sub>濃度では影響は認められなかった。一方、オゾンはヒドラジン及びヒドラゾンの双方に対して負の影響が指摘されている。従って、室内空気中にオゾンの存在が懸念される場合は、シリカゲルによう化カリウムを含浸させたオゾンスクラバーを装着することによりオゾンの影響を除去することが可能である。このオゾンスクラバーは市販されているのでそれを使用する方が便利である。但し、試料空気中の湿度が高い場合はスクラバーが水を含み測定が不可能になるので、スクラバー部分を室温より若干高めに保温してサンプリングする必要がある。

## E. 結論

居住環境内におけるHCHO濃度を測定するための標準的なサンプリング方法と測定方法を提案した。サンプリング法の場合は室内の最大濃度を求める方法と室内の日平均濃度（生活状態における）を求める2案とした。一方、測定方法は2,4-DNPHカートリッジ

捕集-溶媒抽出-HPLC法（アクティブサンプリング法）を提案した。

1) サンプリング方法

① 最大濃度を求めるサンプリング法

換気(20:30-21:0)→開口部閉鎖(21:0-9:0)(窓開け換気)(12時間窓、扉閉鎖)→サンプリング(9:0-9:30)→分析(密閉状態)

② 日平均濃度を求めるサンプリング法

日常生活をしている状態で24時間サンプリングを行う。測定開始時刻は早朝や夜遅い時間帯は出来るだけ避ける。

サンプリング(11:0-11:0, 24hr)→分析(日常生活)

2) 測定方法

① 最大濃度及び日平均濃度を求める方法

2,4-DNPHカートリッジ捕集-溶媒抽出-HPLC法のアクティブサンプリング法を最大濃度及び日平均濃度を求める場合の双方の測定法として提案した。最大濃度を求める場合の採取量は30L(1L/minx30min)、日平均濃度を求める場合は144L(100ml/minx24hr)とした。

## VI. 公衆衛生学的立場から見た化学物質過敏症について

### A. 研究目的

化学物質過敏症(Multiple Chemical Sensitivity, 以下MCSと略)を巡っては、その症状の原因が現在のところ明確ではなく、定義は病態については毒性学、臨床医学などの多方面において未だ議論を残しているという状況にある。このため医療機関、保健所、市町村の公的機関などに訴えが持ち込まれることが多いと予想される機関においても、依然として「化学物質過敏症」への認識が一般化していないか、認識していても対応に苦慮している場合が多いようである。このような現状においても、化学物質が原因と疑われる症状を訴える患者は実際に存在しており、彼らは訴えを持ったまま、その症状が疾病であるという判断もないままに行政や医療機関の判断の狭間に放置されているといっても過言ではない。

そこで我々は昨年度に引き続き某病院でMCSと診断された患者へのアンケート調査を分析し、全国の無作為に抽出した成人に面接調査を行い、上記調査の分析を参考とした化学物質過敏症様症状を経験した人の出現頻度を調査し、行政的対応の資料を得ることを目的とした。

### B. 研究方法

1) MCSと診断された患者に対するアンケート調査に関する分析

神奈川県のあるK病院でMCSと診断された患者313名にアンケート調査を行い、K病院を受診するまでの経緯や現在困っていることなどについて検討した。

2) 化学物質過敏症様症状に関する全国調査

#### ①調査期間

平成12年2月、3月

#### ②対象者

全国を北海道から九州まで12ブロックに分け、各ブロックをさらに13大都市、市部、郡部に分け、それぞれの推定母集団の住民基本台帳から、層化2段無作為抽出法により全国の20歳以上の男女2,000人を抽出し、訓練された調査員が個別面接調査を行った。これを2回行い、計4,000人を対象とした。

#### ③調査機関

社団法人 中央調査社に委託し、同社が毎月行っている個人オムニバスサーベイにて行った。

#### ④調査項目

MCSの特徴に関する項目はテキサス大学サンアントニオ校内科のMillerが世界共通のMCSの特徴を調査する目的で作成した調査項目を北里研究所臨床環境医学センターの石川らが日本人向けに翻訳した質問表をもとに作成した。主な項目は化学物質曝露による反応、その他の化学物質曝露による反応、症状について、マスキング（症状の偽装、化学物質曝露に対する1つの適応）について、日常生活の障害の程度がある。

### C. 研究結果と考察

MCSと診断された患者に対するアンケート調査の詳細は平成10年度報告書に報告したが、MCSの患者はその重症度によっては通常の家生活や社会生活を送ることが困難な状況にある。その原因の一つとして、MCSについて一般市民はもとより、保健・医療従事者、自治体などの公的機関においてもMCSが疾患としての認識や知識として定着しておらず、各機関とも適切な対応がとられていない場合が多いことがあげられる。そのため患者の中には様々な問題が起こってもなかなか解決することが出来ず、症状を悪化させたりストレス環境下におかれたまま生活せざるを得ないことが多かった。MCSの原因や根本的な治療法の解明についての研究は、未だ緒についたばかりである。またその原因の化学物質は様々であり、それによって解決方法は異なってくると思われる。従って現在の段階で一律的な対応策を確定することは難しいが、現実には症状に苦しむ患者がいる以上、原因の究明とは別に、家庭生活、社会生活の中で対応可能なものは実行していくことが必要であろう。特にMCSの疾患としての認識や知識の一般化が重要であり、医療従事者や家族、社会の周囲の人たちが認識することで、患者がMCSの適切な診断と治療にたどり着くまでの期間は短縮され、重症化を防ぐとともに、原因物質の回避、精神的ストレスからの軽減などの効果が得られるなど、MCSの患者の症状を改善する事が可能になると思われる。

同じく昨年度に行った化学製品PLセンターに寄せられた電話相談の中から、シックハウス症候群またはMCSに関するものと判断された相談について分析した結果では、やはり最初に相談した保健所や行政の公的機関では相手にされなかったり、たらい回し



にされたケースも多く、それぞれの機関での対応の不十分さが認められている。このような結果をふまえ、全国にはシックハウス症候群やMCSの様に化学物質に起因する健康影響の症状を持ちながら、自分の症状が何によっておこっているかを知らなかったり、病気と認識していない様な潜在的な健康被害が隠されている可能性を考え、MCS様の症状の訴えを持つ人たちの出現頻度を調査することを目的とした全国調査を行っており、その結果は現在分析中である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

内山巖雄、村山留美子：化学物質過敏症—公衆衛生の立場から—、アレルギー・免疫、6, 1012-1017, 1999

### 2. 学会発表

村山留美子、内山巖雄：化学物質過敏症（シックハウス症候群を含む）に関する相談の実態について。第58回日本公衆衛生学会総会，大分。1999.10

# Ⅰ. 室内空气中化学物質の免疫系に対する 影響評価に関する基礎的研究

## 1. 室内空气中のトルエン及びリポ多糖（LPS）が 気道の自律神経系に及ぼす影響に関する基礎研究

愛知学泉大学家政学部

鳥居 新平

名古屋大学医学部小児科

坂本 龍雄

## 2. ホルムアルデヒド暴露のアレルギー反応に対する影響に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所療品部

五十嵐良明

鹿庭 正昭

国立医薬品食品衛生研究所総合評価室

鎌田 栄一

# 1. 室内空気中のトルエン及びリポ多糖 (LPS) が 気道の自律神経系に及ぼす影響に関する基礎研究

鳥居新平 愛知学泉大学家政学部

坂本龍雄 名古屋大学医学部小児科

## <要旨>

全身麻酔下のラットに10分間、トルエンガスを吸入させ、エバンスブルー法で気管、主気管支組織中への血漿漏出量を測定した。その結果、気管では50ppm以上、主気管支では18ppm以上の濃度のトルエン吸入で有意な血漿漏出が惹起された。タキキニンNK1受容体拮抗剤CP999,94を前投与するとこれらの気道反応が消失したことから、トルエンは気道のC線維を刺激し、遊離したタキキニンによりNK1受容体を刺激して血漿漏出を引き起こすことが明かとなった。

リポ多糖 (LPS) の吸入は、それ自体で軽度の気道血管透過性亢進を惹起した。また、トルエンと同様、この反応にタキキニンNK1受容体を介する機序が含まれていることを明らかにした。また、LPS吸入は内因性タキキニンの遊離を抑制する効果をもたらすが、吸入12時間後ではむしろ内因性タキキニンによる気道反応を増強し、それ以降、この増強効果は消滅した。

## <研究背景>

近年、わが国では住宅の気密性能が著しく向上した。しかし、それに相応した換気システムやこまめに換気するという住まい方の工夫が普及しておらず、多くの住宅で深刻な室内空気汚染が進行している。とりわけ化学汚染物質による「シックハウス症候群」、「化学物質過敏症」などと称される健康障害の報告が国民の不安を引き起している。健康住宅研究会（1996年設置）はトルエン、キシレン、ホルムアルデヒド、可塑剤、木材保存剤、防虫剤を優先取組物質に選出し、早急に対策を講じるよう提言している。

トルエンは住宅建材の塗料溶剤等に用いられており、新築住宅の室内空気中のみならず、微量ではあっても室内空気中に広範に検出される揮発性有機化合物である。人体に及ぼす毒性に関する研究が十分に行われているとは言い難く、実際、労働環境における許容濃度は50ppmで、WHOヨーロッパが住宅用ガイドラインとして示している総揮発性有機化合物 (TVOC) の基準値0.3mg/m<sup>3</sup>と比較すると大きな差異がみられる。

今回、トルエン曝露によるヒトの気道自律神経系への影響を解明する第一歩として、ラットを用いてトルエン単回曝露によって惹起される気道反応に自律神経系(今回はC線維由来神経ペプチドを検討対象とした) がどのように関与しているかを検討した。

昨年秋、リポ多糖 (LPS) 曝露はサブスタンスPによる気道血管透過性亢進を増強するが、C線維からのタキキニンの遊離を抑制するためか、ホルムアルデヒド、カプサイシン等の知

覚神経刺激物質による気道反応を増強しないことを動物モデルを用いて示した。今回、このようなLPSの神経原性炎症に及ぼす効果の機序を解明するための追加研究を行った。また、LPS吸入自体が内因性タキキニンを介した血管透過性亢進を惹起するか否かについても検討した。

#### <研究内容>

1. トルエン単回吸入はラットの気道の血管透過性亢進を引き起こすか。

研究方法—Wistar雄性ラット(8週齢)を6群(n=5)に分け、ペントバルビタール(50mg/kg i.p.)で全身麻酔し、気管カニューラを挿入後、人工換気を行った(1回換気量8ml/kg、90分)。エバンスブルー静注(20mg/kg)3分後に、トルエンガスを10分間吸入させた。10分後に人工換気を中止し、血中のエバンスブルーを除去する目的で体・肺循環を生食を用いて灌流し、下部気管及び主気管支を摘出した。下部気管、主気管支の組織中に漏出したエバンスブルー量の測定は、ホルムアミド1mlで組織中のエバンスブルーを抽出し、620nmの吸光度より算出した。5種類の濃度のトルエンガスをパーミエーター(GAS TEC社)を用いて発生させた。条件は、低濃度のものよりdilution tube D-10(流量1・/分、50℃)、D-20(1・/分、50℃)、D-30(1・/分、50℃)、D-30(短)(1・/分、50℃)、D-30(短)(0.3・/分、50℃)とした。トルエン濃度はまだ実際に測定していないが、理論値はそれぞれ18ppm、30ppm、50ppm、135ppm、450ppmである。なお、陰性コントロール群にはパーミエーターを循環した室内大気を10分間吸入させた。

研究結果—組織中へのエバンスブルーの漏出量はエバンスブルー量(ng)/湿重量(mg)で表した。気管壁へのエバンスブルーの漏出量は室内大気、18ppm、30ppm、50ppm、135ppm、450ppmのトルエンの順に53.9(S.E.M 3.0) ng/mg、67.3(6.8) ng/mg、74.1(1.9) ng/mg、105.4(4.5) ng/mg、127.9(8.2) ng/mg、112.8(8.8) ng/mgであった。主気管支では45.4(3.3) ng/mg、63.0(6.8) ng/mg、69.3(2.1) ng/mg、81.3(5.6) ng/mg、90.4(6.5) ng/mg、87.0(4.2) ng/mgであった。Bonferroni/Dunnテストによると、トルエンは気管では50ppm、主気管支では18ppmから有意な血漿漏出を引き起した。また、135ppm吸入時に最大の血漿漏出を惹起し、450ppmではむしろ漏出量は低下した。

まとめ—トルエンは10分間の単回曝露で、労働環境における許容濃度(50ppm)またはそれ以下でも有意な血漿漏出を惹起した。ホルムアルデヒドと比較すると、血漿漏出量やその反応閾値に関して、その気道反応性は低かった。これはホルムアルデヒドが水溶性のため、気道内にほとんど吸収・吸着されるが、トルエンはそうでないことによる可能性が考えられる。

## 2. トルエン曝露による気道血管透過性亢進はホルムアルデヒドと

同様にタキキニンNK1受容体を介して引き起されるか。

研究方法—Wistar雄性ラット（8週齢）を4群（n=5）に分け、前述の如く処置して人工換気を行った。タキキニンNK1受容体拮抗剤CP99,994 2mg/kg、5mg/kg、またはその溶解液である生食を静注し、2分後にエバンスブルーを静注した。3分後に135ppmトルエンを10分間吸入させ、やはり前述のように処理して気管、主気管支の組織中に漏出したエバンスブルー量を測定した。なお、陰性コントロール群には生食で前処置し、パーミエーターを循環させた室内大気を10分間吸入させた。

研究結果—CP99,994及び生食で静注しても気道内圧、平均動脈圧ともに有意な変動を示さなかった。CP99,994は用量依存的に気管及び主気管支組織中のエバンスブルー量を減少させた。5mg/kgのCP99,994で前処置をした場合、気管及び気管支組織中のエバンスブルー量は陰性コントロールと有意差を認めなかった。

まとめ—トルエン単回曝露による気管及び主気管支の血漿漏出は、ホルムアルデヒドの場合と同様、タキキニンNK1受容体を介して引き起されることが証明された。トルエンガスが気道知覚神経（C線維）末端を刺激し、その結果、遊離されたタキキニンがNK1受容体を刺激すると推測される。

## 3. トルエン曝露による神経原性の気道血管透過性亢進は、気道のneutral endopeptidase (NEP) 活性を阻害することにより増強するか。

研究方法—Wistar雄性ラット（8週齢）を2群（n=5）に分け、前述の如く処置して人工換気を行った。生食、またはNEP阻害剤ホスホラミドン1mMのエアロゾールをネブライザーを用いて1分間吸入させた。2分後にエバンスブルーを静注し、その3分後に145ppmトルエンを10分間吸入させた。同様に処置し、気管、主気管支の組織中のエバンスブルー量を測定した。

研究結果—生食及びホスホラミドン吸入はトルエン吸入直前の気道内圧、平均動脈圧に影響を及ぼさなかった。ホスホラミドン吸入群では気管、主気管支組織中に、それぞれ131.4 (8.8) ng/mg、111.2 (6.1) ng/mgのエバンスブルーが漏出した。一方、生食吸入群では99.2 (3.4) ng/mg、83.5 (4.4) ng/mgであり、ホスホラミドンは気管、主気管支の双方において有意にトルエン吸入による血漿漏出を増強した。

まとめ—NEP活性を阻害することにより、タキキニンによるNK1受容体刺激が増強するこ

とは十分に予想できることであり、本研究もそれを支持する結果となった。また、NEP活性を強力に阻害する作用をトルエンは有していないことも明らかとなった。気管支喘息の基本病態として、下気道への好酸球・リンパ球浸潤と広範な上皮剥離があげられる。NEPは気道上皮に密に分布していることから、喘息患者の気道上皮のNEP活性は相対的に阻害された状態にあると考えられている。すなわち、トルエンは健常気道よりも喘息気道に対して強く神経原性炎症を惹起するものと思われる。

#### 4. LPS吸入曝露はサブスタンスP及びホルムアルデヒドによる気道血管透過性亢進を増強するか—反応時間による作用の変化について

研究方法—Wistar雄性ラット（8週齢）を8群（n=5）に分け、生食またはLPS（E. coli 055: B5, 0.5mg/ml, 30分間）を吸入させた。12時間後、36時間後にペントバルビタール（80mg/kg i.p.）で全身麻酔し、気管カニューラ挿入後、人工換気を行った（1回換気量8mg/kg, 90分）。エバンスブルー静注（20mg/kg）2分後、サブスタンスP静注（5n mol/kg）またはホルムアルデヒド吸入（5ppm, 10分間）を行った。10分間反応させ、前述の如く気管、主気管支を摘出して、組織中に漏出したエバンスブルー量を測定した。なお、無処置でサブスタンスP、またはホルムアルデヒドを投与した群を陽性コントロールとし、無処置で生食を静注、またはパーミエーターを循環した室内空気を吸入した群を陰性コントロールとした。

研究結果—サブスタンスPは、LPS吸入12時間後、36時間後のラット気管/主気管支に96.8/95.8ng/mg、95.5/98.0ng/mlのエバンスブルーの漏出を引き起こした。陽性コントロールは60.4/66.3ng/mgであり、LPS吸入は12時間後、360時間後とも気道組織中へのサブスタンスP静注による血漿漏出を有意に増強した。ホルムアルデヒドは、LPS吸入12時間後、36時間後のラット気管/主気管支に187.8/169.5ng/mg、116.2/120.9ng/mgのエバンスブルーの漏出を引き起こした。陽性コントロールは108.5/108.3ng/mgであり、LPS吸入は12時間後にはホルムアルデヒド吸入による気道組織中への血漿漏出を有意に増強するが、36時間後にはこの効果を認めなかった。

#### 5. LPS吸入がラット気道に血管透過性亢進を惹起するか。

研究方法—Wistar雄性ラット（8週齢）を4群（n=5-6）に分け、直後、12時間後、36時間後に無麻酔下でエバンスブルー（20mg/kg）を尾静脈より静注した。それぞれ3時間後にペントバルビタール（80mg/kg i.p.）で全身麻酔し、生食で体・肺循環を灌流した。気管カニューラを挿入後、3mlの生食で3回気道内腔を洗浄してBALFを採取し、前述と同様、気管、主気管支を摘出した。エバンスブルー量は、気管、主気管支組織中のものは前述の方法に従い、また、BALF中のものは、BALFの遠心後の上清の620nmでの吸光度より算出した。

研究結果—LPS吸入は、気管、主気管支、BALFのいずれにおいても、直後から3時間の間に軽度ではあるが有意な血漿漏出を引き起した。気管では45.9ng/mg（陰性コントロール値20.3ng/mg）、主気管支では50.2ng/ml（17.0ng/mg）、BALFでは499.6ng/ml(147.2ng/ml)であった。しかし、それ以降は陰性コントロールと有意差を認めなかった。CP-999,94をLPS吸入前に投与すると、気管、主気管支への血漿漏出は部分的ではあるが有意に抑制された。

まとめ—LPS吸入単独でも気道組織及び気道内腔にわずかの血漿漏出を惹起するが、この機序に内因性タキキニンによるNK1受容体刺激が含まれることが示された。

#### <研究発表>

1. トルエンに関する研究は本年のアレルギー学会総会で発表予定。
2. LPSに関する研究は1999年のアレルギー学会総会（広島）で発表。

## 2. ホルムアルデヒド暴露のアレルギー反応に対する影響に関する研究

五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所療品部  
鹿庭 正昭 国立医薬品食品衛生研究所療品部  
鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所総合評価室

### 研究要旨

ホルムアルデヒド(HCHO)の連続吸入暴露による一般毒性とアレルギー反応性に対する効果について、BALB/c系マウスを用いて検討した。マウスにHCHO混合空気を1日6時間、28日間連続暴露を行った。体重及び摂餌量は対照群とHCHO暴露群で差は見られなかった。臓器重量、血液学的検査及び血清生化学的検査においても暴露の効果は認めなかった。HCHOの吸入暴露によって、HCHOに対して感作は成立しなかった。また、総IgE抗体価も変化しなかった。Trimellitic anhydride (TMA)の感作誘導期における耳介リンパ節細胞(LNC)増殖反応は、HCHO暴露によって著しく増強され、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)によるLNC反応も増加した。一方、HCHO暴露群におけるTMA誘導血清IgE抗体価及びDNCBで惹起した耳腫脹反応は対照群とほとんど差はなかった。したがって、マウスに対してのHCHOの吸入暴露は、一般毒性を示さず、アレルギーの惹起反応を増悪させることはないものの、アレルゲンによる感作誘導については増強作用を示すことが示唆された。

### A. 研究目的

現在、世界で生産されている化学物質は数百万種以上にのぼり、それらの化学物質から合成される製品は、多種多様にわたり、私たちの身の回りに存在する。近年、種々の化学物質に過敏に反応して症状を呈する人が増加しているが、昨今の住宅の高断熱・気密化による住宅建材など多様な製品から揮発した化学物質の連続暴露が原因ではないかと考えられている。また、皮膚アレルギー、粘膜気道アレルギー疾患が急激に増加しているが、これについても、大気汚染や種々の化学物質への暴露が起因しているのではないかと疑われている。<sup>1)</sup>

ホルムアルデヒド(HCHO)、パラジクロロベンゼン、有機リン系化合物やトルエンなどは多くの室内環境に検出される。これらの化学物質の個々の一般毒性については、ある程度判明しているが、免疫系に対する作用はまだ不明な点が多々ある。更に、現実の環境では上記の化合物が複雑に組み合わさって作用している。

我々は、一般的家庭内環境で検出される HCHO とパラジクロロベンゼンを例にとり、それらの単独または複合による実験動物への作用を検討する。

本年度は、昨年度開発した HCHO 発生暴露装置を用いて、マウスの4週間吸入試験を実施し、一般毒性とアレルギー症状の変化について検討した。



## B. 研究方法

試薬：アレルゲンとして trimellitic anhydride (TMA)、dinitrochlorobenzene (DNCB)を用いた。ホルマリン溶液(37% $\text{HCHO}$ )は和光純薬工業製を用いた。

動物：BALB/c AnCrJ 系マウス(日本チャールス・リバー)を5週齢で購入し、1週間の馴化飼育後、実験に供した。暴露開始時の体重は雄 21.1~24.7 g、雌 17.7~20.9 gであった。これらの動物を無作為に、雌雄各3群(試験ごとに1群3~6匹)に分け、ステンレス製金網ケージに各々3匹ずつ収容し、チャンパー内で飼育を行った。 $\text{HCHO}$ 混合空気は毎日6時間、28日間連続暴露した。試験期間中、飼料(CRF-1、オリエンタル酵母)及びマイクロフィルターを通過させた水道水を自由に摂取させた。

$\text{HCHO}$ 吸入暴露装置：図1に示す装置を用いた。<sup>2)</sup>装置は、 $\text{HCHO}$ 混合空気発生装置と実験動物を収容し暴露するチャンパーから構成される。精製水で一定濃度に希釈したホルマリン溶液をHPLC用ポンプ(BECKMAN社製 Model 110A)にて70℃の恒温槽(柴田製作所製WB-27D型)の円柱ガラス槽(柴田製作所製、直径12.5 cm、高さ20 cm、内容積2.3 l)内にセットされた噴霧器に導き、コンプレッサー空気(圧力1.4  $\text{kgf/cm}^2$ 、流量12 l/min)で噴霧して $\text{HCHO}$ 混合空気を作製した。この $\text{HCHO}$ 混合空気を、エアポンプ(岩城硝子製、APN-450NST-1型)で取り入れ、HEPAフィルターを通過させた空気希釈し、ステンレス製角錐型チャンパー(夏目製作所製、内容積1560 l、120×120×210 cm)内の総空気量が340 l/min、差圧-3~5 mm  $\text{H}_2\text{O}$ の条件になるように調整した。チャンパー内の温度は実測値で22.5~25.5℃、湿度は37.5~46.0%であった。照明は、午前6時~午後6時の12時間点灯した。排気処理は、 $\text{HCHO}$ 混合空気を活性炭に通過させることで行った。

$\text{HCHO}$ 濃度の測定：Grosjeanらの方法<sup>3)</sup>を用いた。チャンパー内の空気2 lを積算流量計付きポンプ(アイデック製、2T-FT型)を用いて市販DNPHカートリッジ(Waters社製 XpoSURE)に捕集し、DNPH- $\text{HCHO}$ 誘導体をアセトニトリル10 mlで溶出した。この溶出液20  $\mu\text{l}$ をHPLCに注入して分析した。

### HPLC条件

ポンプ：島津製作所 LC-10AT

カラム：ODS (粒径5  $\mu\text{m}$ , 4.68 mm i.d.× 150 mm, LUNA, Phenomenex 社製)

移動相：アセトニトリル・水 (60:40)

流速：1.3 ml/min

検出器：島津製作所 SPD-10A 型 UV 検出器 (360 nm)

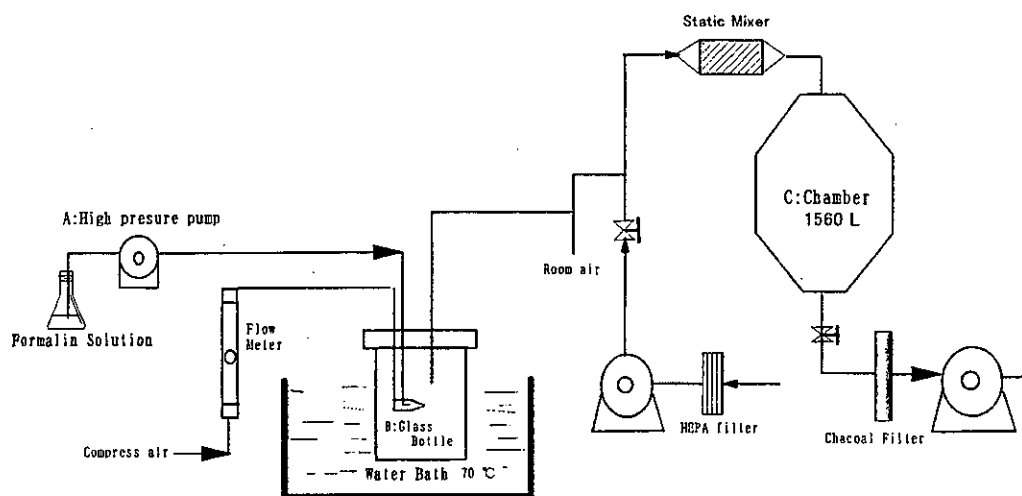


図 1. ホルムアルデヒド発生暴露装置

表1. 血液学的及び血清生化学的検査項目

	Items of measurement	Abbreviation
Hematology	White blood Cell Count	WBC
	Red Blood Cell Count	RBC
	Hemoglobin Concentration	HGB
	Packed Cell Volume	PCV
	Mean Cell Volume	MCV
	Mean Cell Hemoglobin	MCH
	Mean Cell Hemoglobin Concentration	MCHC
	Platelet Count	PLT
Biochemistry	Total Protein	TP
	Albumin	ALB
	Albumin-Globulin Ratio	A/G
	Blood Urea Nitrogen	BUN
	Glucose	GLU
	Triglycerides	TG
	Total Cholesterol	CHO
	Alanine Aminotransferase	ALT
	Aspartate Aminotransferase	AST

一般毒性試験：HCHOの暴露濃度として、Kamataら<sup>2)</sup>が行ったラットの28ヶ月間吸入慢性毒性試験の中間濃度2 ppmを高濃度群(H群)とし、その1/10を低濃度群(L群)とした。対照群はHEPAフィルターを通過した空気を暴露した。マウスは各群、雌雄各6匹ずつとした。28日間連続暴露期間中、一般状態及び死亡動物の有無を連日観察し、体重及び摂餌量の測定を週1回行った。暴露終了後、一晩絶食させた後、エーテル麻酔下に、心臓から5%EDTA入りディスポーザブル注射筒を用いて約1 ml採血した。血液学的検査は、多項目自動血球計数装置(東亜医用電子 Sysmex M-2000 型)を、血清生化学的検査は血液自動分析装置(日立製作所 7150 型)を用いて、表1に示す項目について測定した。採血終了した動物は剖検した後、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、顎下腺及び胸腺を摘出し、直ちにその湿重量を測定した。

Local lymph node assay (LLNA) : <sup>4)</sup> 雌性マウス(1群3匹)にHCHOを28日間吸入暴露した後、両耳に1% DNCBまたは10% TMAの AOO 溶液を25  $\mu$ l ずつ3日間連続で塗布した。コントロール群は AOO のみを同様に塗布した。最終塗布の翌日、耳介リンパ節を取り出し試験群ごとにまとめた後、リンパ節細胞(LNC)を分離し、牛胎児血清を10%含有するRPMI1640培地に浮遊させた。LNCを $1 \times 10^6$ 個ずつ96穴プレートの各穴に入れ(1群4穴)、<sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>HTdR) 0.5  $\mu$  Ci を添加して、37°Cで24時間培養した。培養終了後、セルハーベスターで細胞を回収し、細胞内に取り込まれた<sup>3</sup>HTdR量(dpm)を液体シンチレーションカウンターによって測定した。

耳腫脹試験 : <sup>5)</sup> HCHOに対する感作の成立を見るため、HCHO暴露終了の翌日、マウス(1群5匹)の耳の厚さを測定した後、ホルマリン10%のジメチルホルムアミド溶液25  $\mu$ l を耳に塗布し、24時間及び48時間後の耳の厚さを測定した。

DNCB 惹起反応に対する暴露の効果については、別に試験した。HCHO暴露後、マウス(1群5匹)の腹部を毛刈りし、1% DNCBの AOO 溶液50  $\mu$ l を塗布して感作させた。7日後、さらに同様の操作を繰り返した。その7日後、耳の厚さを測定した後、1% DNCB溶液25  $\mu$ l を塗布して惹起し、24時間及び48時間後の耳の厚さを測定した。さらに7日後、再惹起を行い、同様に耳の腫脹の程度を調べた。

IgE アッセイ : <sup>6)</sup> HCHO暴露後、マウス(1群5匹)の腹部に20% TMAの AOO 溶液50  $\mu$ l を塗布し、7日後、10% TMA溶液を25  $\mu$ l ずつ両耳に塗布した。さらに7日後に、心臓採血し、血清を分離、ELISA法によってIgE抗体価を測定した。

統計学的処理方法：体重、血液学的検査、血清生化学的検査、臓器重量の成績についてはDunnettの方法で、耳腫脹反応及びIgE値については、t検定で有意差検定を行った。

## C. 研究結果

### 1. HCHO濃度

L群はHCHO理論濃度0.2 ppmに対し実測濃度 $0.1 \pm 0.03$  ppm、H群は2.0 ppmに対し $1.44 \pm 0.27$  ppmであった。

### 2. 一般毒性試験

体重及び摂餌量については、雄雌とも HCHO 群と対照群は同等の変化であった(図 2,3)。

血液学的検査では、雌の MCV に有意な減少が見られた。また、雄の WBC に増加傾向が観察された(表 2)。

血清生化学的検査では、雌 H 群の GLU に有意な増加、雄 L 群の TG に有意な減少が見られた(表 3)。

臓器重量に関しては、雌 L 群の肝臓と脾臓の実重量に有意な減少が見られた(表 4)。

### 3. アレルギー反応に対する効果

HCHO を吸入暴露したマウスに対して LLNA 法に従って DNCB または TMA を塗布し、耳介 LNC 増殖反応を測定した。AOO だけを塗布した場合、<sup>3</sup>HTdR 取り込み量は HCHO をいずれの濃度で暴露しても変化しなかった。DNCB による LNC 増殖反応は、暴露 HCHO 濃度が高いほど高くなった。TMA による反応も HCHO 暴露すると著しく増強され、その値は L 群の方がより高かった(表 5)。

MEST 法を用いて、HCHO 吸入暴露によって HCHO に対する感作が成立するかどうか確かめた。HCHO 連続暴露終了後、ホルマリン溶液を耳に塗布したが、耳の腫脹反応は認められず、HCHO には感作しないことがわかった。次に、DNCB の惹起反応に対する HCHO の吸入暴露の効果を調べた。吸入終了後から DNCB を腹部に 2 回塗布して感作を行い、14 日目に惹起を行った。1 回目の惹起では平均値で見ると、HCHO 暴露でわずかに増加傾向が認められるものの有意な差はなかった。再惹起でも同様に差は認めなかった(図 4)。

HCHO を暴露させたマウスの総 IgE 抗体価は対照群と差はなかった。よって、HCHO による抗体産生はなく、I 型アレルギーの誘導はなかった。次に、TMA による血清 IgE 抗体産生に対する HCHO 吸入暴露の効果について調べた。HCHO 暴露後、TMA で処理したマウスの血清 IgE 抗体価は対照群と差はなく、HCHO 吸入暴露による IgE 抗体産生の増強は認められなかった(図 5)。