

A. 研究目的

シックハウス症候群の診断には、例えば脱髄疾患・脳腫瘍などの重大な基礎疾患の除外も然ることながら、心身・精神医学的な諸問題（心因反応、心身症、心気症・・・）を除外するために、どうしても自覚症状だけではなく、客観性のある他覚的な証拠が必須である[1][2]。即ち、客観的所見を得るための特異性の高い検査法を確立することは、臨床上の最優先課題と言える。室内空気汚染に起因する本症の多彩な自覚症状の主たる原因は、中枢神経系・自律神経系の機能障害によることが多く、神経学的所見、特に神経眼科学的検査法（眼球追従運動検査、電子瞳孔計検査、視覚空間周波数特性：コントラスト感度検査など）による所見が、本症の客観的評価に極めて有用であることをこれまで数多く報告し、本症の重要な他覚的所見として臨床頻度で出現し[6]、過敏反応を示す化学物質の室内濃度変化で、それらの症状の程度に増減が認められることから、曝露中の生体反応、特に中枢神経系における反応をリアルタイムで捉えられれば極めて有用な情報を与えてくれるものと考えた。

近赤外線酸素モニタリング(NIRO)は[7][8]、機器の操作が比較的簡便で場所も取らず、しかも安定した結果が得られるため、未熟児病棟・手術室などでの患者の非侵襲的酸素モニタリング法[9]として、高度医療施設に広まりつつあるが、本症患者における脳血流量の変動（頭部酸素量変化）を評価するための手段としても十分応用できるものと思われ、社団法人 北里研究所・北里研究所病院・臨床

現場で利用されている[3][4][5]。しかしこれらの神経眼科学的検査は、所見の解釈に高度な診断能力を有する神経眼科学に精通した専門医が必要なこと、さらに特殊な設備機器、十分に訓練された視能訓練士(ORT)等のスタッフが必要なことから、現実的には、国内外の臨床環境医学センターのような微量化学物質中毒の専門医療機関での評価法として主に利用されている。また、室内空気汚染の原因となっている化学物質（例えばホルムアルデヒド、トルエン、キシレン）の曝露負荷試験（チャレンジテスト）を行なうような場合、曝露前後はともかく、曝露中の患者の生体反応のパラメーターとして上記のような神経眼科学的所見を利用することは、技術的に困難な場合が多い。そこで主任研究らは、神経系の機能異常に伴う症状、特に大脳辺縁系症状が本症に高

環境医学センターにおいて本症と診断された患者を対象にその有用性を評価した。

B. 研究方法

1. 近赤外線酸素モニタリング法(NIRO)：

・使用機器

使用したNIRO機器は、静岡県浜松市に本社を置く浜松ホトニクス株式会社製NIRO-300を用いた(医療用具承認番号 20900BZZ00961000)。

・測定原理

生体における主な吸収物質は、水とヘモグロビン(Hb)であるが、これらは共に近赤外線領域で小さい吸収値を示すため、この領域の光は他の光に比べ生体をよく透過する。この性質を利用して生体酸素測定を行なう方法である。即ち、頭部に近赤外光を照射し、そこでの光吸収の変化を測定することにより頭部酸素の変化をモニタリングする。照射された近赤外光は、頭部の中の色々な成分(例えば、頭皮・筋肉・骨など)により吸収と散乱を受けるが、酸素量により光学特性が変化する成分はHbと酸化酵素チトクロームaa3(CtOx)で、これらは酸素との結合の有無により吸収スペクトルが変化するため、組織を通った近赤外光をモニターし、その吸収変化を測定することにより、HbとCtOxにおける酸素濃度変化を計算するものである。

・血流量の評価

本測定法は、濃度の変化を測定するもので、濃度の絶対値を測定するものではない。光プローブ安定後の測定開始時間(初期t)での濃度C (umol/L)と、ある時点での濃度C'の差より、濃度変化を評価した。これらは、NIRO-300からの測定データをRS232CでNIROデータ解析ソフトウェア(U7842)を組み込んだコンピューターに取りこみ、Hbの濃度変化[酸素化ヘモグロビン(O₂Hb)、脱酸素化ヘモグロビン(HHb)、総ヘモグロビン(cHb)]および総ヘモグロビンに対する酸素化ヘモグロビンの濃度比[組織酸素化指標(TOI)]の時間変化率解析(Slope解析)

を行なうことにより求めた。

また、解析データの処理は、NIRO-300用オンライン表示解析ソフトウェアU7842およびMcGraw-Graw-Hill, Health Professions Divisionが開発したStanton A. Glantz, Bio-Statics Programを用いた。

2. 曝露負荷試験(チャレンジテスト)：

臨床環境医学センター化学物質コントロールユニット内のチャレンジテスト専用ブースで行なった。安静時(非曝露時)における脳血流量は、健常群(20名：23～36歳・平均年齢27.4歳)・患者群(20名：25～44歳・平均年齢33.7歳)とも20分間測定し、安静時における脳血流量の変動(揺らぎ)を評価した。曝露負荷テストにおいては、測定開始から5分間、脳血流がほぼ安定化するのを確認したのち(曝露前脳血流量)、被験化学物質を10分間曝露し(曝露中血流量)、その後5分間の脳血流量を測定(曝露後血流量)、計20分間の変動を評価した。

被験化学物質としてホルムアルデヒドを、コンピューター制御された特殊装置に注入し、ブース内が8ppbあるいは40ppbの濃度になるよう設定した。なお、本試験は、健常群・患者群とも試験前の条件づけ(心因反応の影響)を防止するため、「曝露負荷物質の内容」「曝露のタイミング」などは告知せず、また機器オペレーターにもその内容は告知しない二重盲検で行なった。さらに今回、タバコ煙に過敏に反応する患者の希望で、タバコ抽出

物負荷試験も行った。タバコ抽出物による負荷は、技術的な問題（注入負荷装置の汚染、負荷濃度のコントロールなど）もあり、タバコ抽出物（ニコチン10ug相当量）を舌下投与し、投与前後の脳血流量の変動を評価した。また、ホルムアルデヒド、タバコ抽出物負荷テストともに、負荷前後に簡単な2分間作業テストを行ない、作業テストのスコアと脳血流量の変動の度合いとの相関性も検討した。

C. 研究結果

1. 安静時における脳血流量の変動:(図-1a~1b, 図-2a~2b)

・健常者:23歳・女性・会社員

図-1a:ヘモグロビン濃度変化

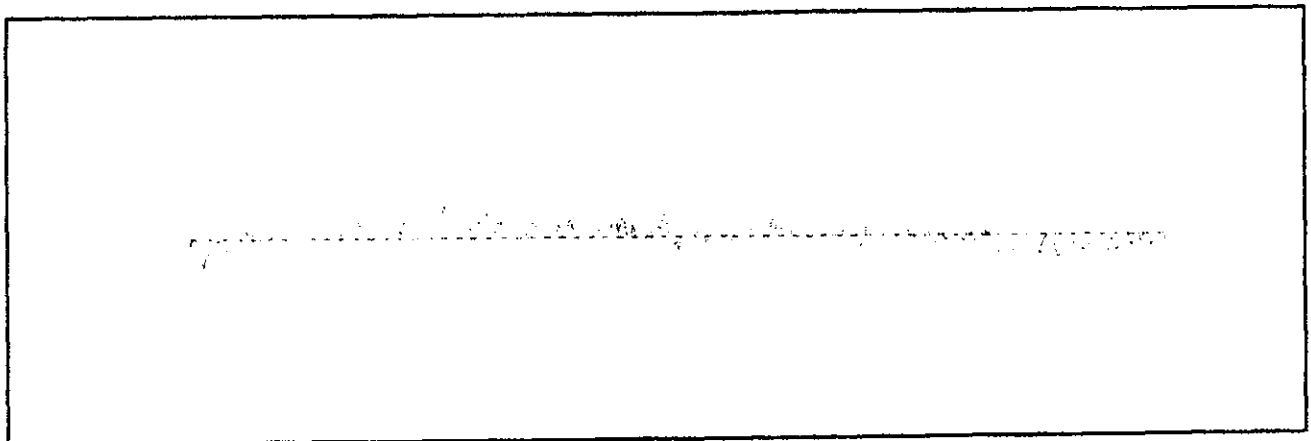
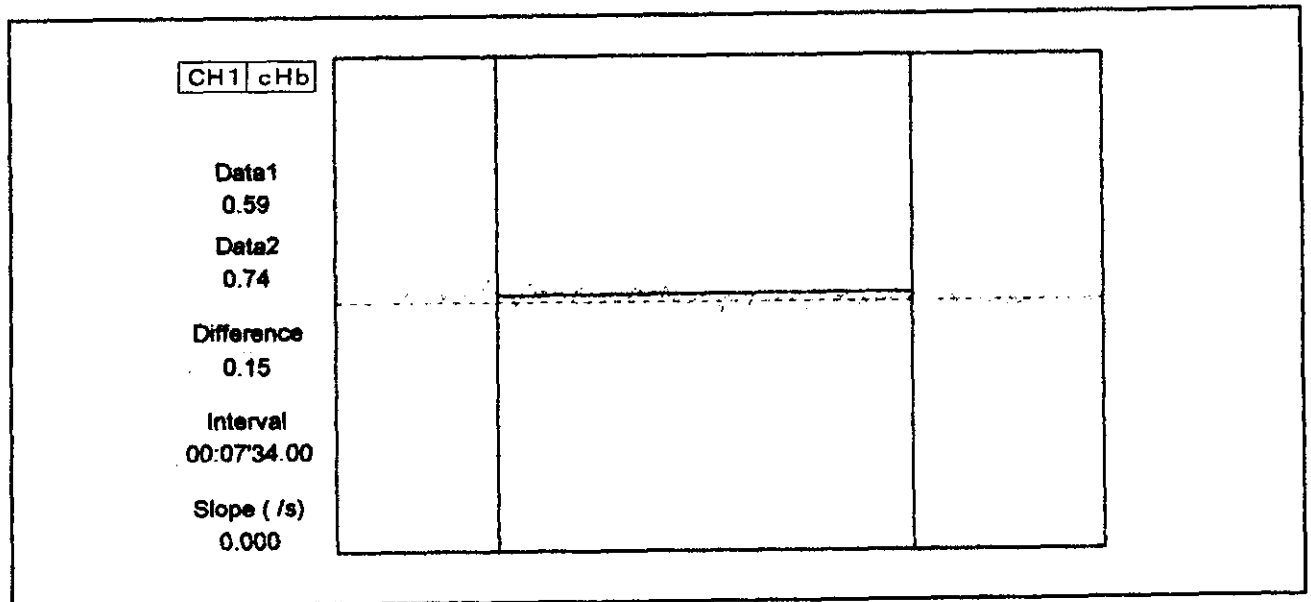


図-1b:時間変化率解析



健常者の安静時における脳血流量の変動は、測定初期値(t)に対して、5分間隔での平均血流量変動率が5%以内であった。時間変化率解析においても(図示せず)、(t)と測定終了値(e)は、ほぼ直線性を示した。また、粗

織酸素化指標(TOI)については、平均血流量変動率が0.5%以内であり、健常者においては血流量の「揺らぎ」がほとんど認められないことがわかった。

・患者:28歳・女性・専業主婦

図-2a:ヘモグロビン濃度変化

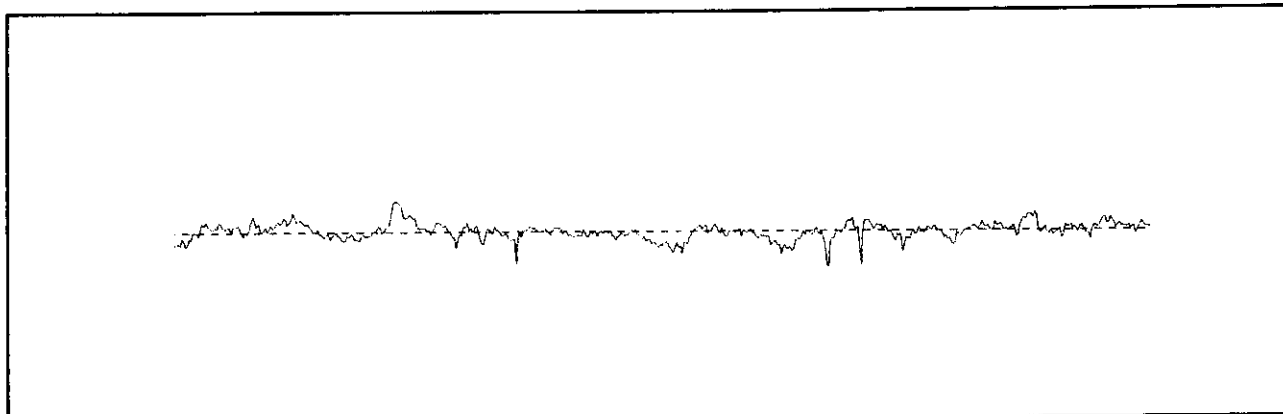
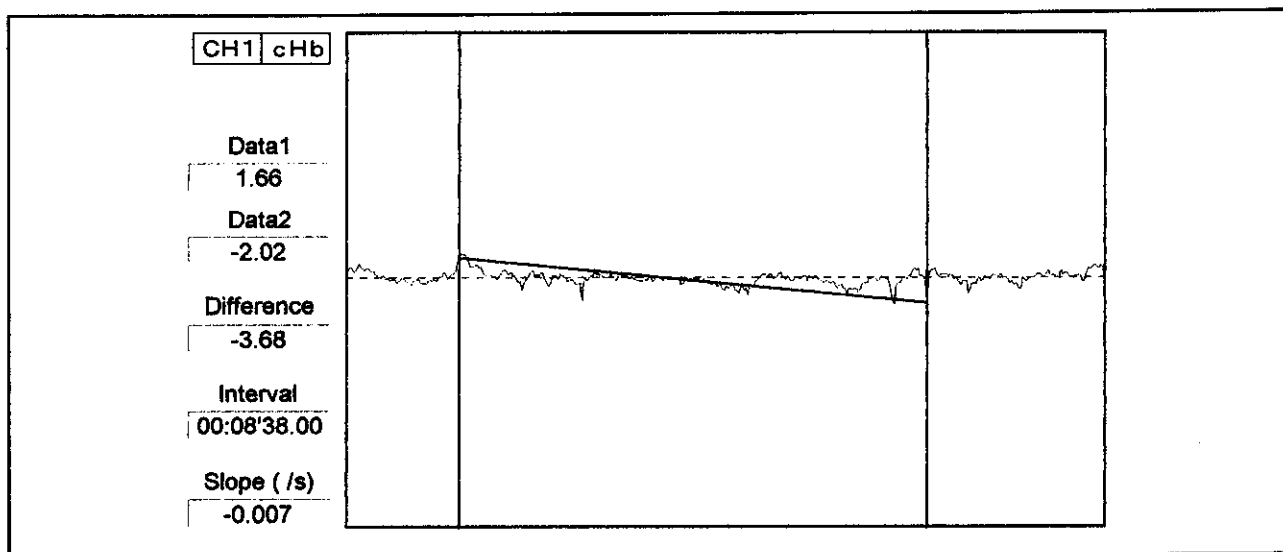


図-2b:時間変化率解析



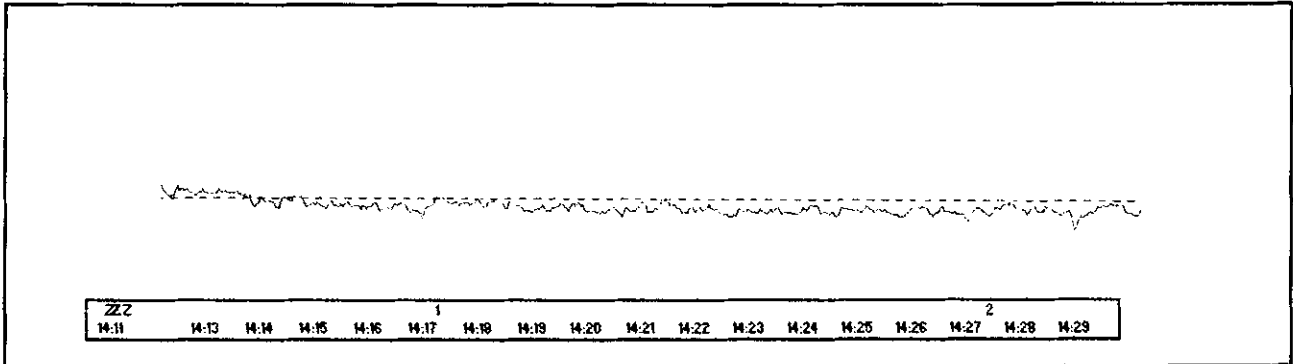
患者の安静時における脳血流量の変動は、測定初期値(t)に対して、5分間隔での平均血流量変動率は10%を越えた。時間変化率解析においても、(t)と(e)は、直線性を認めなかった。また、TOIについても(図示さず)、平均血

流量変動率は、2%を越え、患者では安静時の「揺らぎの幅」が大きいことがわかった。

2. ガス負荷試験における脳血流量の変動: (図-3a~3b、図-4a~4b、図-5a~5b)

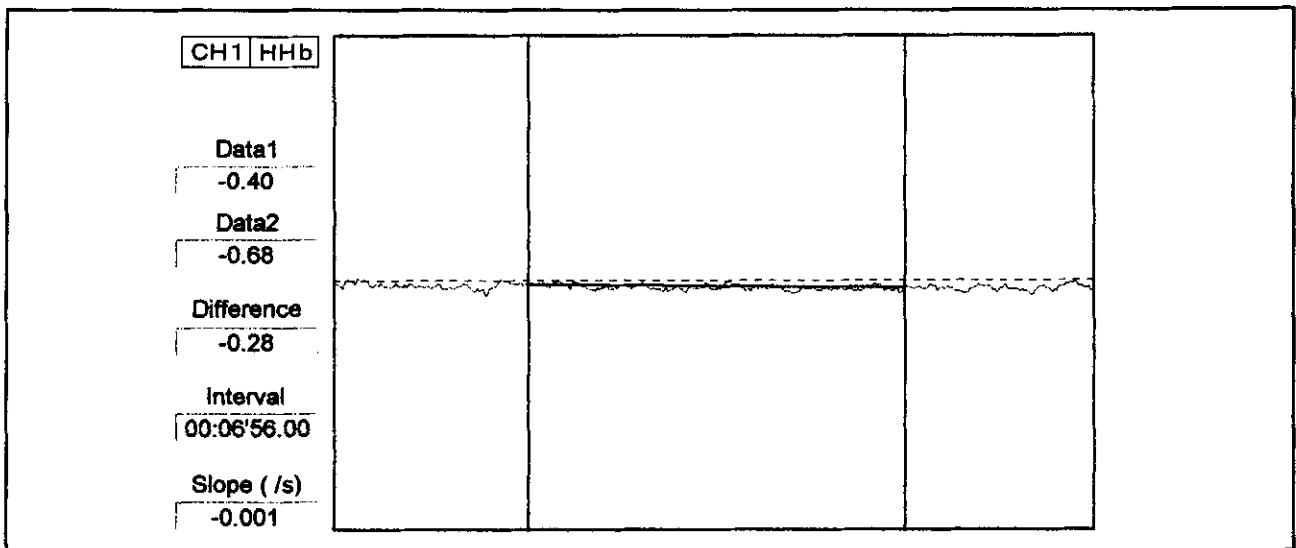
・健常者: 28歳・男性・会社員: ホルムアルデヒド40ppb負荷

図-3a: ヘモグロビン濃度変化



数字1: 負荷開始 数字2: 負荷終了を示す

図-3b: 時間変化率解析



健常者にホルムアルデヒドを40ppb負荷した。負荷前・中・後において特記すべき自覚症状の出現は認められなかった。また、負荷前・中・後における脳血流量の変動は認められず、時間変化率解析においても、負荷前・

中・後で、ほぼ直線性を示した。TOIについても、変動率は0.5%以内であった(図示さず)。2分間作業作業テストのスコアは、負荷前後で差は見られなかった。

・患者1: 43歳・男性・技術コンサルタント: ホルムアルデヒド40ppb負荷

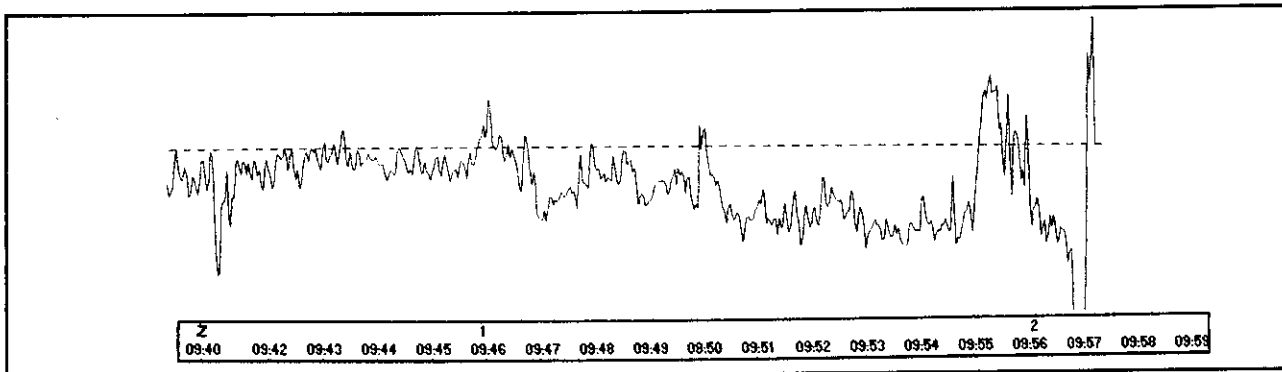
主訴: 頭痛、眩暈

経過: 40歳時、新築マンション入居直後より頭痛、眩暈が出現。その後、全身倦怠感、集中力低下が増強し

てきた。

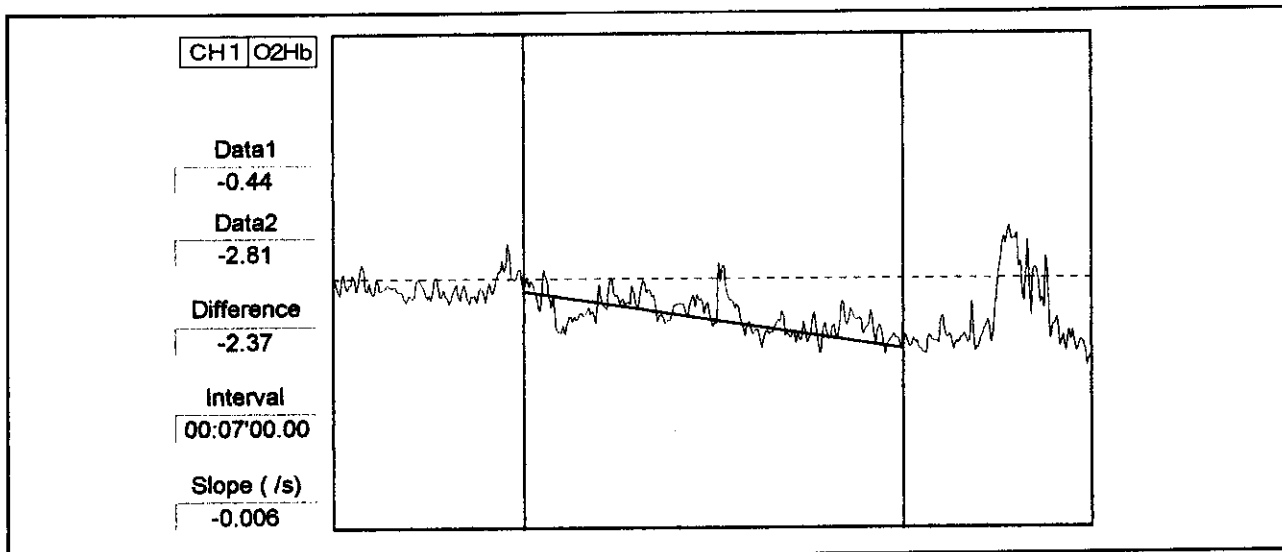
室内ホルムアルデヒド濃度測定結果:
0.5ppm (500ppb)であった(1999年7月測定)。

図-4a:ヘモグロビン濃度変化



数字1:負荷開始 数字2:負荷終了を示す。

図-4b:時間変化率解析



負荷検査経過:

脳循環血流が十分安定したことを確認後、ホルムアルデヒド負荷(ブース内濃度が40ppbになるように設定)を開始した。負荷開始約1分後より脳循環血流量の低下が認められ、負荷開始5分後にさらに顕著となり継続した。負荷開始15分後、患者の自覚症状が最大となり、本人の希望で検査中止となった。中止直前の血流量の変化は、中止告知行動によるものと考えられた。脳血流量は、負荷開始前・中・後で著しい変動を示し、時間変化率解析においても明かな負のスロープ形成(血流量の低下)が認められた。また、負荷前・中・後におけるTOIの平均変動

率は、5%を越えた(図示さず)。加えて負荷前後における作業能力を検討するため、2分間の作業テストを行った結果、負荷前スコア:90ポイントに対し、負荷直後のスコア:68ポイントであり、明らかにホルムアルデヒド負荷による作業能力の低下が認められた。さらに、以下の自覚症状が、ホルムアルデヒド負荷によって出現/増強した; 筋・関節痛、動悸・息切れ、集中力低下、意欲低下、緊張感増強、頭痛、喉の乾燥感増強、発汗。

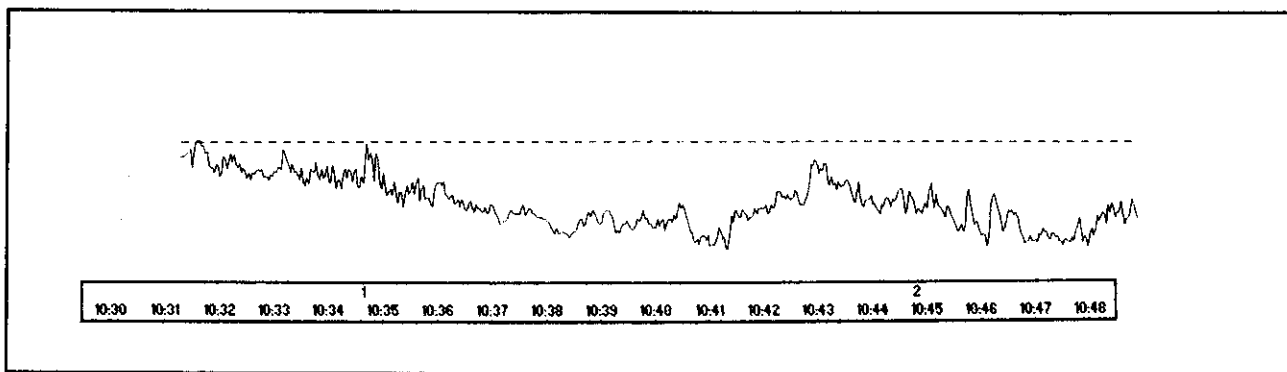
・患者2: 34歳・女性・会社員: ホルムアルデヒド8ppb負荷

主 訴: 全身倦怠感・嗅覚過敏

自宅(居間)での化学物質測定の結果、ホルムアルデヒドが、0.25ppm(250ppb)を示した(2000年3月測定)。

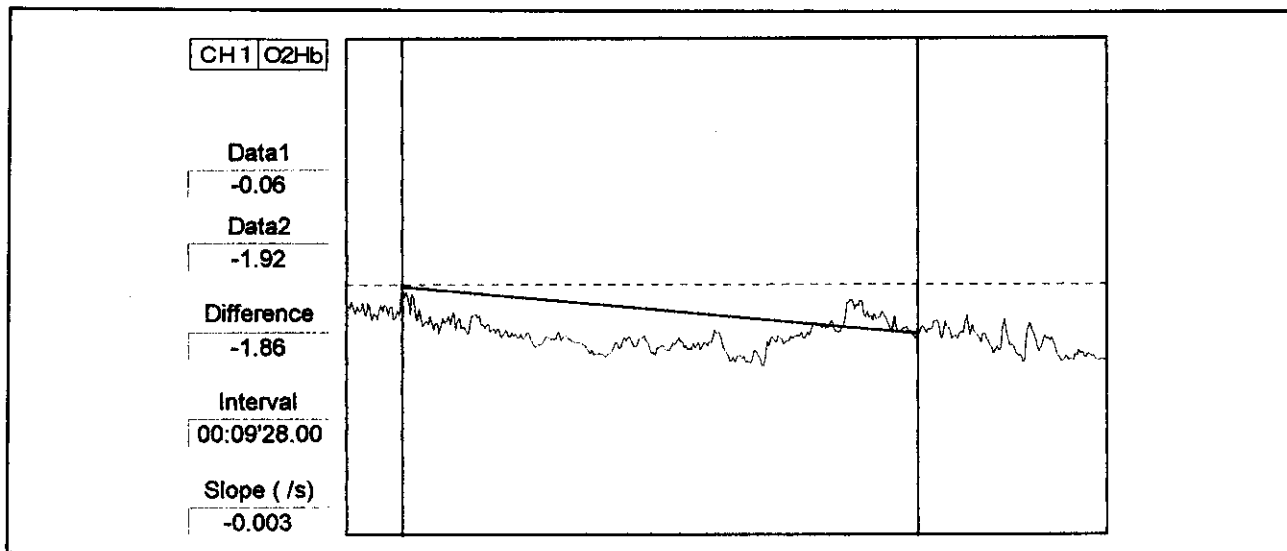
経 過: 自宅のリフォーム後数ヶ月を経過した頃より、倦怠感、易疲労感が出現。最近では、非常に臭い(特に化粧品、タバコ)に敏感となり、社会生活も困難となってきた。

図-5a:ヘモグロビン濃度変化



数字1:負荷開始 数字2:負荷終了を示す

図-5b:時間変化率解析



負荷検査経過:

脳循環血流が十分安定した事を確認後、ホルムアルデヒド8ppb負荷を開始した。負荷数分後より脳循環血流量の低下傾向が出現しはじめ、負荷終了まで低下し続けたが、負荷終了数分後より血流量は回復し始めた。時間変化率解析においても明かな負のスロープ形成が認めら

れた。負荷前・中・後におけるTOIの平均変動率は、3%を越えた(図示さず)。負荷前後における作業能力テスト(上述)は、負荷前:86ポイント、負荷後:72ポイントであり、ホルムアルデヒド負荷により、明かな作業能力低下が認められることがわかった。ホルムアルデヒド負荷により、倦怠感・咽頭異物感が増強した。

3. タバコ負荷試験における脳および末梢血流量の変動:図-6a~6d

・患者:32歳・男性・会社員

主訴:タバコ臭による頭痛・肩こり・全身倦怠感・

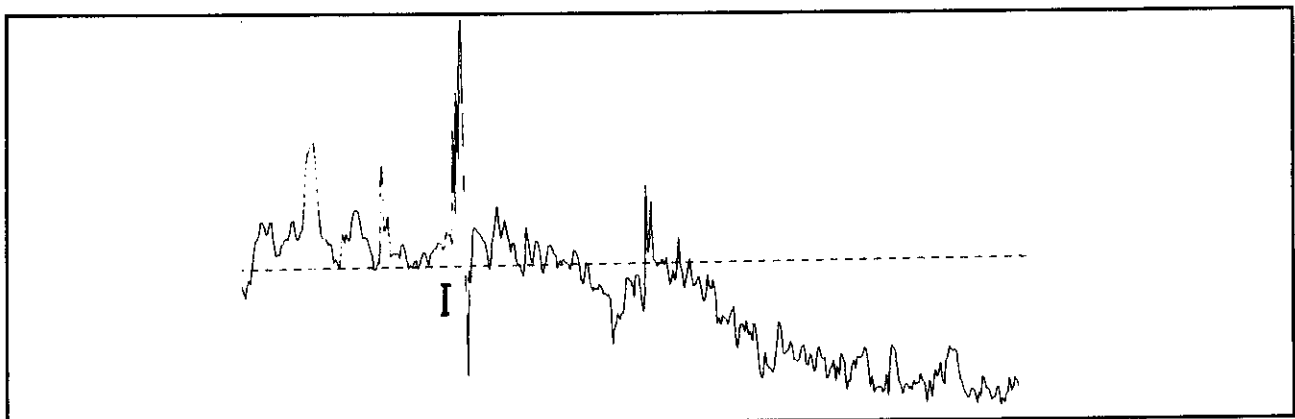
集中力低下

経過:

分煙対策の不十分な職場で事務職をしている。昨年頃より同僚の喫煙時に頭痛・肩こり・眩暈等が出現するようになり、最近では全身倦怠感、集中力低下も伴ってきた。再三会社に完全分煙を申し出たが聞き入れてもらえずタバ

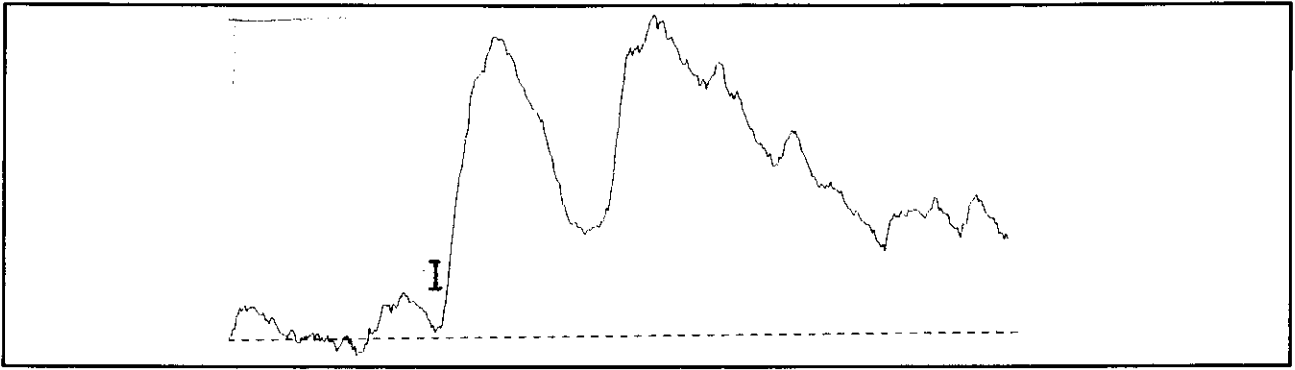
コ煙に対する過敏反応は継続し、本年になってさらに多彩な不定愁訴が出現したため当科受診した。電子瞳孔計による瞳孔対光反応:交感神経抑制型、眼球電位図:軽度の滑動性眼球追従運動異常(水平および垂直運動にて階段状波形を認める)、視覚空間周波数特性:高周波数領域で軽度感度低下。

図-6a:ヘモグロビン濃度変化(脳血流)



I マーク:負荷開始

図-6b:ヘモグロビン濃度変化(前腕血流)



I マーク:負荷開始

図-6c:時間変化率解析(脳血流)

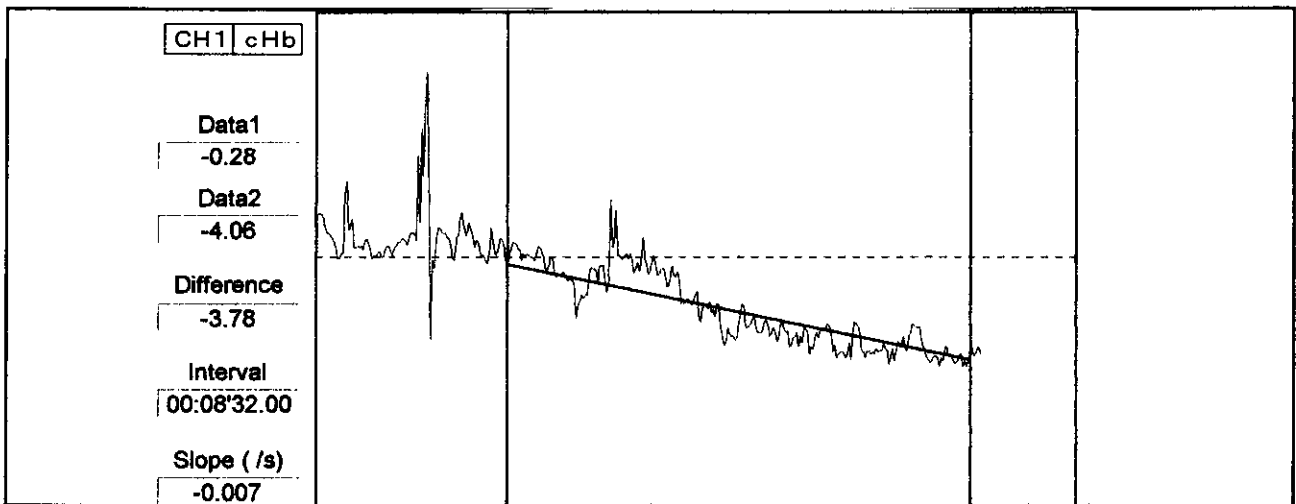
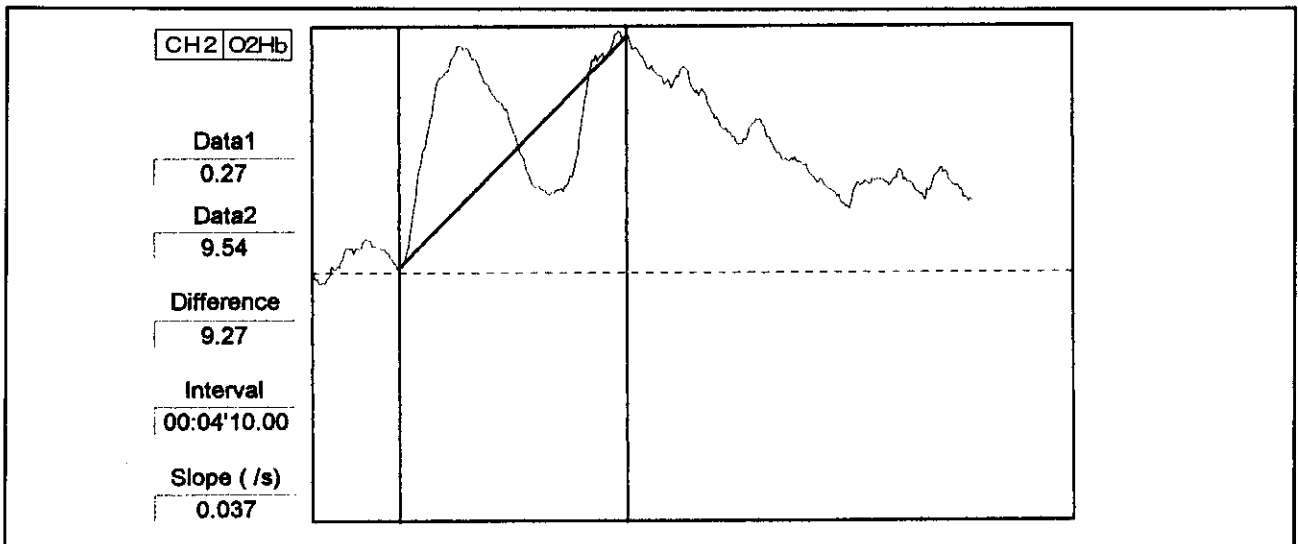


図-6d:時間変化率解析(前腕血流)



負荷検査経過：

脳循環血流が十分安定したことを確認後、タバコ抽出物負荷を開始した。負荷直後より強い脳血流量（ヘモグロビン濃度）の低下が認められ、負荷開始5分後にさらに顕著となった。時間変化解析においても同様に負のスロープ変化を示した。一方、末梢血流（右前腕部）は、負荷直後より血流量の増大が認められ時間変化率解析は、正のスロープ変化を認めた。TOIは、脳血流・末梢血流共に変動率は5%を越えた（図示せず。）負荷前後の2分間作業テスト結果は、負荷前スコア：90ポイントに対し、負荷直後のスコア：78.6ポイントであり、明らかにタバコ抽出物負荷による作業能力の低下が認められた。

D. 考 察

シックハウス症候群の診断には、例えば脳腫瘍などの重大な基礎疾患の除外も然ることながら、精神医学的な問題を除外するために、どうしても自覚症状だけではなく、客観性のある他覚的な証拠が必須である。そこで我々は、特異性の高い検査法として神経機能検査、特に神経眼科学的検査が極めて診断に有用な情報を与えてくれることを、これまで数多く報告してきた[1][2]。今回は新たに、特異性の高い神経機能検査法として、近赤外線酸素モニタリング(NIRO)利用による脳血流量の測定を検討し、この評価法が、臨床上極めて有用である知見が得られた。

ホルムアルデヒド負荷においては、8ppbという、極めて微量の負荷でも脳血流量が変動するケースが認められ、変動のパターンは、血流量の低下を示すパターンが約7割、血流量の増加するパターンが約1割、残りは両者の混合型（増加と減少の揺らぎ幅の増大）であった。また、負荷による脳血流の変動の度合いと、負荷前後における作業テストのスコアには相関性が認められ、脳血流量、作業能力テ

スト、ガス負荷による自覚症状の出現の程度を総合的に組合せることにより、より客観的な診断が出来るものと思われた。さらに、タバコ煙に過敏に反応する症例においても、他覚的評価法としての本検査法の有用性が示された。よって、過敏性を有する化学物質との気道（鼻腔～細気管支）を介した接触は、まず第一段階として嗅粘膜・嗅神経を通じてその情報が嗅球・嗅索・大脳辺縁系へと伝えられ、いわゆるパベッツ回路を刺激し化学物質に対する比較的早い応答としての「情動反応」が生じると推察される。次に第二段階としては肺胞から呼吸ガスとして拡散・吸収され、肺循環系を經由して体循環系に入り全身影響として種々の症状が出現すると考えられる。さらに、皮膚・粘膜（気道・口腔など）との直接的接触により、これらに分布している求心性の無髄神経線維を介してサブスタンスP等のタキキニンが分泌され、これによりサイトカン放出が惹起され局所血流量（血管の透過性の変化）が影響を受けると考えられた。

E. 結論

これらの結果より、ガス負荷試験と組合せた脳血流量のモニタリング評価は、シックハウス症候群・化学物質過敏症の他覚的評価法として極めて有意義な情報を与えてくれることがわかった。特に患者本人の告知をより科学的に評価するために、即ち、患者の多彩な愁訴の主たる原因が、室内空気汚染によるものなのか、あるいは「単なる気のせい」、即ち、精神神経科学的なものなのか（月経前症候群、更年期障害、心身症等など）を鑑別するための必須の検査手段になりうることを強調したい。

F. 参考文献

1. 菊池裕美他：化学物質過敏症患者の神経学的および眼科学的所見 臨床環境医学, Vol.9(1):22-27,2000.
2. 石川 哲他：化学物質過敏症診断基準について 日本医事新報 Vol. 3857:5-29,1998.
3. Sirakawa S et al. : Evaluation of the autonomic nervous system response by pupillographikal study in the chemically sensitive patients. Environmental Medicine Vol.8:121-127, 1991.
4. 宮田幹夫他：多種化学物質過敏症(multiple chemical sensitivity)の臨床 自律神経 Vol.33:257-261,1996.
5. 石川 哲他：環境汚染物質などによる眼症—特に有機燐剤の視覚毒性について 日眼雑誌 Vol.100:417-432,1996
6. 石川 哲他：微量化学物質と不定愁訴 総合臨床, Vol.49:2963-2970,1998.
7. Wray, S. et al.: Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and hemoglobin for the non invasive monitoring of cerebral oxygenation. Biochem. Biophys. Acta, 933:184-192, 1988.
8. Wyatt, J.S. et al.: Response of cerebral blood volume to changes in arterial carbon dioxide tension in preterm and term newborn infants. Paed Res., 29:553-557, 1991.

F. 研究発表

1. Ishikawa S et al.: Chemical sensitivity patients in Japan. 18th Annual International Symposium on man and his environment. 2000.
2. 坂部 貢他：化学物質過敏症の神経眼科的および神経学的所見 第48回日本職業・災害医学会、日本職業・災害医学会雑誌、Vol48:89, 2000.
3. Ishikawa S.: Hazardous health effect due to elevated indoor chemicals. International symposium on current satus of indoor air pollution by organic compounds and countermeasures for healthy housing, 2001.
4. 坂部 貢他：化学物質過敏症としてのシックハウス症候群、第13回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー Vol.50:158, 2001.

高濃度酸素環境が血管内皮におよぼす影響—接着分子の発現を中心に

(分担) 研究者 鈴木幸男 北里研究所病院内科・アレルギー科

土本寛二 北里研究所病院院長

研究要旨

シックハウス症候群は室内空気中の微量な化学物質による酸化ストレスの一つである。そこでシックハウス症候群の発症機序を解明するため、環境因子の一つである酸素の血管内皮細胞への影響を検討した。その結果、高濃度の酸素によりヒト血管内皮細胞において接着分子である ICAM-1 発現が増加し、これは抗炎症薬であるステロイド (MP) により抑制された。しかしエンドトキシンによる ICAM-1 発現増加は MP により抑制されなかった。また高濃度酸素はエンドトキシンに比べてグルココルチコイド受容体を強く発現した。以上より高濃度酸素環境において、MP は GR 発現を増強して ICAM-1 発現を抑制することが示唆された。

A. 研究目的

シックハウス症候群は室内空気中の微量な化学物質による酸化ストレスであり、皮膚や粘膜などに炎症を生じる。ここで炎症の第一段階は白血球の血管内皮への接着はであり、接着分子は両者の接着を仲介する蛋白質である。我々はこれまでに高濃度酸素環境は血管内皮上に接着分子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を増強し、白血球の血管内皮への接着を促進して組織障害を惹起することを示した。

臨床的に種々の自己免疫疾患や炎症性疾患に対してステロイドが広く用いられている。特にグルココルチコイドであるメチルプレドニゾン(MP)はステロイドパルス療法として頻用されている。この際、グルココルチコイドは細胞質内のグルココルチコイド受容体 (GR) と結合してその抗炎症作用・免疫抑制作用を発揮することが知られている。

一方、高濃度酸素環境が血管内皮細胞の GR 発現にどのような影響を与えるのかは明らか

でない。そこで培養ヒト肺動脈血管内皮細胞を用いて高濃度酸素環境とグラム陰性細菌の膜構成成分であるリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)が ICAM-1 および GR 発現におよぼす影響について対比・検討した。

B. 研究方法

正常ヒト肺動脈血管内皮細胞(クラボウ、大阪)を 10% 仔牛胎児血清 (FCS) 添加培養液 (endothelial cell growth medium、クラボウ) を用いて継代培養した後、100mm 培養皿 (Corning, New York) で単層に培養してコンフルエントとした。実験には継代数 8 代から 12 代の細胞を用いた。

コンフルエントになった細胞の培養上清中に大腸菌由来エンドトキシン (LPS、serotype 955:B5, Sigma, St. Louis, MO) 1 μ g/ml またはグルココルチコイドとしてメチルプレドニゾン (methylprednisolone; MP, 11 β , 17,21-tri hydroxy-6 α -methyl-1,4-preg nadiene-3,20-dione-21-sodium succinate, MW 497, Upjohn,

Kalamazoo, MI) 1mM を添加した。その後直ちに可変型培養器 (APM-36, ASTEC, 福岡) を用いて、各培養細胞を 21%酸素、5%二酸化炭素、1気圧または 90%酸素、5%二酸化炭素、1気圧に 48時間暴露した。

接着分子の一つである ICAM-1 の発現はフローサイトメトリーを用いて検討した。各群の内皮細胞を回収し、Dulbecco リン酸緩衝液 (DPBS) で洗浄した。これを phycoerythrin 標識抗ヒト ICAM-1 抗体 (LB-2, Becton Dickinson, San Jose, CA) と 30 分間、4℃で反応させた。DPBS で洗浄後、1% paraformaldehyde (Sigma) で固定した。蛍光強度はフローサイトメトリー (FACScan, Becton Dickinson) を用いて測定し、各検体とも細胞 10,000 個ずつ測定した。バックグラウンドはマウス IgG2 コントロール抗体 (Becton Dickinson) を用いて補正した。実験を 4 回ずつ施行し、結果は対照に対する相対的蛍光強度比 (%) で示した。

血管内皮細胞の GR 発現は Western blot 法により検討した。対照群および高濃度酸素暴露群の細胞を DPBS で洗浄したのち PMSF, aprotinin 添加 RIPA 緩衝液 (4℃) に反応させ細胞溶解液を得た。得られた検体を回収し 15,000 回転、4℃で 20 分間遠心後、上清を回収し、溶解液中の蛋白濃度を BCA 法にて測定した。等量の蛋白量の検体を 10% SDS-polyacrylamide gel (Realgel plate, バイオクラフト、東京) 上で電気泳動した (SDS-PAGE)。これを polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) に転写した後、抗グルココルチコイド受容体抗体 (E-20, Santa Cruz, Santa Cruz, CA) と反応させた。次いで HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz) と反応させ、ECL キット (RPN2106, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を用いて化学発光させフィルム (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) に感光させた。ゲル電気泳動画像の各バンド

の量比を NIH image (National Institute of Health, Bethesda, MD) を用いて定量評価した。

実験は 4 回施行し、得られた結果を平均±標準偏差で表した。群間の比較には分散分析と Scheffé 検定を行い、危険率 5% 未満を有意とした (StatView II, Abacus Concepts, Berkeley, CA)。

C. 研究結果

まずフローサイトメトリー法を用いて肺動脈血管内皮細胞上の ICAM-1 発現におよぼす高濃度酸素および LPS の影響を検討した。高濃度酸素群で ICAM-1 発現は対照群に比較して約 1.9 倍増加し、これは MP の同時投与により抑制された (高濃度酸素+MP 群)。一方、LPS 群では ICAM-1 発現は対照に比較して約 3.5 倍と増加したが、MP 投与によって抑制されなかった (LPS+MP 群)。即ち高濃度酸素および LPS という刺激の種類によって ICAM-1 発現の程度や MP に対する反応性が異なることが示された。

そこでその反応性の差を調べるために、グルココルチコイド受容体に及ぼす高濃度酸素および LPS の影響を Western blot 法を用いて検討した。刺激後 2 時間では高濃度酸素暴露と LPS 刺激で GR 発現に有意差を認めなかった。その後、高濃度酸素暴露および LPS 刺激による GR 発現は 4 時間で各々 250±63% および 139±24%、8 時間で 274±69% および 115±20% であり、高濃度酸素暴露による GR 発現は LPS 刺激よりも高値であった ($p<0.05$)。即ち、高濃度酸素暴露の方が LPS 刺激に比べて GR 発現はより強く、かつ長時間発現することが示された。

D. 考察

化学物質過敏症は室内空気中の化学物質による酸化的ストレスの一つである。化学物質過敏症の発症原因として何らかの免疫学的

機序の関与が強く示唆される。そこで化学物質過敏症の原因を免疫学的機序の点から解明するための基礎的研究として、環境因子の一つである酸素の血管内皮への影響を検討した。

ICAM-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子であり、通常、様々な細胞表面に分布し、TNF- α や IL-1,6,8 などの炎症性サイトカインによってその発現が増強される。ICAM-1 は好中球表面の CD11a/CD18(LFA-1)や CD11b/CD18 (Mac-1)と結合し、白血球の血管内皮細胞への接着に中心的な役割を果たす。この CD18/ICAM-1 を介する接着経路は様々な病態、例えば気管支喘息、虚血・再灌流障害、敗血症などに関与する。高濃度酸素および LPS の両刺激とも血管内皮細胞の ICAM-1 発現を亢進させた。高濃度酸素が ICAM-1 発現を増強する機序として、第 1 に高濃度酸素が血管内皮細胞を刺激して IL-1,8 や PAF などを産生させ、これらの可溶性因子が血管内皮細胞を刺激して ICAM-1 発現が増強すること (autocrine)、第 2 に高濃度の酸素分子自体が直接、血管内皮細胞を刺激することが考えられた。

グルココルチコイド(GC)は標的臓器において GR を介して作用を発揮する。GR はヒトのすべての有核細胞に存在し、GC の作用を発現するうえで不可欠の分子である。GR は核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子であり、細胞質で熱ショック蛋白質 (heat shock protein 90; hsp90) などと安定な複合体を形成している。GR は GC と結合すると hsp90 を乖離し、活性化される。活性化された GR は速やかに核内に移行しホモ二量体を形成する。その後、GR は標的遺伝子のプロモーター領域にあるグルココルチコイド応答配列(GRE)に結合し RNA ポリメラーゼ II を活性化して標的遺伝子の転写を促進させる。

MP により高濃度酸素による ICAM-1 発現増強は抑制されたが、LPS による ICAM-1 発

現増強は抑制されなかった。この機序として高濃度酸素の方が LPS より GR が強く発現し、MP が結合しやすく作用発現が強いことが考えられた。このように刺激の種類により GR 発現の程度や動態が異なることが示された。そして MP は高濃度酸素暴露による ICAM-1 発現を抑制して白血球の血管内皮への接着を抑制し、臓器傷害を軽減することが推測された。

結論

高濃度の酸素によりヒト血管内皮細胞において ICAM-1 発現が増加し、これはステロイド (MP) により抑制された。しかしエンドトキシンによる ICAM-1 発現増加は MP により抑制されなかった。また高濃度酸素はエンドトキシンに比べてグルココルチコイド受容体を強く発現した。以上より高濃度酸素環境において、MP は GR 発現を増強して ICAM-1 発現を抑制することが示唆された。

今後さらに細胞内シグナル伝達機序の解明を行う予定である。また耳鼻咽喉科では化学物質過敏症患者における内耳機能を評価し、その病態の解析を行う予定である。

研究発表

1. 論文発表

鈴木幸男、西尾和三、竹内 修、戸田京子、鈴木達夫、土本寛二。高濃度酸素環境がグルココルチコイド受容体におよぼす影響。臨床環境 (印刷中)

2. 学会報告

鈴木幸男、西尾和三、竹内 修、戸田京子、森田 稔、鈴木達夫、土本寛二。高濃度酸素環境がグルココルチコイド受容体におよぼす影響。第 9 回 日本臨床環境医学会総会。東京。2000年6月2～3日。

シックハウス症候群症状誘発物質の同定と定量

分担研究者 柳沢幸雄

東京大学大学院・新領域創成科学研究科環境学専攻・教授

研究要旨

シックハウス症候群の患者の過敏症状を誘発する化学物質を同定し、誘発濃度の定量を本研究で確立した Active 法と Passive 法の併用によって行った。対象化学物質は一般環境中で症状を発現させている可能性の高いカルボニル類と VOC 類である。誘因物質の特定により、診断・治療法開発促進と患者の日常生活へのアドバイスが可能となった。また過敏症状を誘発する濃度は、非患者の平均被曝濃度よりかなり低く、過敏症患者の生活の困難さが定量的に明らかになった。さらに塩化ビニルシートの可塑剤として大量に用いられている有機酸エステルの簡便な分析法を開発し、一般住宅の室内濃度の測定を行った。その結果フタル酸エステルの被曝量は、経口摂取量と比較して無視できない程度であることが明らかになった。

A 研究目的

一般には影響が顕在化しない非常に低濃度の化学物質に曝露された際に、アレルギー症状に似た過敏反応を示す事があり、それを化学物質過敏症 (Multiple Chemical Sensitivity, MCS) と呼ぶ。MCS 患者の化学物質曝露量と症状発現の関係を明らかにすることが、本研究の 1 つの目的である。事務所や作業環境での濃度や健常者の生活する室内外濃度を測定した既往の研究は多くある^{1) 2)} が、個人曝露量を測定したものは少ない³⁾。特に、MCS 患者を対象とした個人曝露量測定は全く行われていないため、症状を引き起こす物質の特定及びその定量法を確立することが必要である。その曝露量と症状の関係から、MCS の過敏性の発現に関する解明や、規制値の設定や代替品の開発等の対策が期待できる。本研究では、一般環境中で症状を発現させている可能性の高いカルボニル類と VOC 類を対象として MCS 患者の曝露量と症状の関係を明らかにするため、分析方法の開発・検討、MCS 患者の曝露量測定

を行った。

また、可塑剤として使用されているフタル酸エステル類やリン酸エステル類などの有機酸エステル類は、内分泌攪乱作用があると疑われている。それらを含む建材が使用されている場合、それらにより室内空気が汚染されることがあるため、本研究ではフタル酸エステル類及びリン酸エステル類といった有機酸エステル類の室内空气中濃度の調査を行った。この室内有機酸エステル類の分析方法を開発して有機酸エステル類による室内汚染の現状を明らかにするとともに、室内空気汚染源となる製品(建材)の特定を行うためのフラックス測定用パッシブサンプラーの開発を行う事が本研究の第 2 の目的である。これまで、室内空気質の内分泌攪乱作用への影響を検討した研究例がなかったことから、その寄与の検討を行なった。また、発生源特定用のパッシブサンプラーの基礎データを収集し、実際の室内において発生源の推測を行った。

B 研究方法

1. 過敏症状を発現させる化学物質の捕集法

過敏症発現時の化学物質の種類・濃度を特定する方法は、1週間 MCS 患者に、Active sampling 法（ポンプによって空気をサンプラーに吸引する方法，As 法）としてポンプにつないだサンプラーを2つ（DNPH カートリッジ（Waters 社製 XpoSure）、活性炭チューブ（柴田化学製））と Passive sampling 法（ポンプを使わず分子拡散原理により捕集する方法，Ps 法）としてそのままのサンプラーを2つ持ってもらい、症状を感じた時のみポンプのスイッチを入れ、症状がなくなるとスイッチを切る方法である。Ps 法による測定値が通常生活時の濃度、As 法による測定値が症状発現時の濃度を表す。As 法の結果が Ps 法の結果より高濃度の化学物質及びその濃度が、症状を発現させると考える事ができる。

2. 過敏症状を発現させる化学物質の分析法

カルボニル類は DNPH カートリッジに DNPH 誘導体化させて捕集した後、アセトニトリル 10ml で抽出し、高速液体クロマトグラフィー（Hewlett Packard 社製 HP1100）で分析した。VOC 類は活性炭チューブに捕集した後、内標準物質としてトルエン d8 を添加した二硫化炭素 1ml を加えて 10 分間超音波抽出し、遠心分離器にかけたその上澄み液を GC-MS（Hewlett Packard 社製 HP5983, HP6890）で分析する。それらの分析の最適条件は実験によって決定した。

3. 捕集・分析法の確認試験

本測定法に関わる諸分析の検討を以下の実験によって行った。結果については紙面上の都合もあり、それぞれ一部の物質の例のみを挙げ

る。

1) ブランクテスト

未使用の5本のサンプラーを一度開封してから封をして、冷蔵庫に1週間保存した後に測定した。その標準偏差の10倍を定量下限値とした（Table 1）。

2) 検量線の直線性

ブランク値が検出下限以下（S/N 比=3 以下）のものは、検量線の直線性が失われる濃度を定量下限値とした。

3) 破過試験

2本の連結したサンプラーに多地点で複数の時間の間一般空気を通した。2本目に破過が見られる際の一本目の捕集量を定量上限値とした（Fig. 1）。カルボニル類ではアセトン、アセトアルデヒド、ホルムアルデヒドの順に、VOC 類ではほぼ沸点の低いものから順に破過が起こる事が分かった。

4) 回収率試験

既知量の標準試料をマイクロシリンジでサンプラーに打ち込み、清浄空気を流して溶媒をとばした後、分析する。吸着した物質の何%が抽出して分析できているかを調べた（Table 2）。VOC 類では、アルコール類やメチルイソブチルケトン、酢酸ブチル等の酸素を含んだ構造のものは、全て回収率が低くなった。これは極性のために活性炭からの抽出がうまくいかなかったためと考えられる。その他の VOC 類やカルボニル類はよい回収率が得られた。

5) 再現性の確認

同地点、同一時間で5本ずつのサンプラーによりサンプリングし、測定によるばらつきがど

の程度であるかを調べた (Table 3)。

6) As 法-Ps 法の相関試験

同地点、同一時間で As 法・Ps 法それぞれによりサンプリングし、As 法-Ps 法の相関を求める事により、Ps 法のサンプリングレートを決定した。カルボニル類・VOC 類ともに極めてよい直線性が得られた (Fig.2)。

また、理論計算によりサンプリングレートの算出を行った。カルボニル類に関しては実験結果との一致が見られたが、VOC 類に関しては食い違いがあり、今後の検討を要する。

7) 吸着の安定性 (Back diffusion) の検討
スパイクしたサンプラーをそのまま測定したものと、フタを開けて清浄空气中に放置したものを複数本ずつ比較し、カルボニル類を捕集したサンプラーから再び脱離しないかどうかの検討を行い、再脱離が起こっていない事が確認された。

Table 1. Detection limit

	Detection limit* (μg)
Formaldehyde	0.0935
Acetaldehyde	0.121
Acetone	0.381
Benzene	2.44
Toluene	1.65

*Based on 10 times Standard Deviation of the blank mean

A Table 2. Recovery test

	Recovery(%)	RSD(%)
Formaldehyde	101	2.99
Acetone	99.2	0.959
Benzene	95.2	4.93
Butanole	14.9	92.3
Toluene	92.1	1.48
Ethylbenzene	94.1	3.64

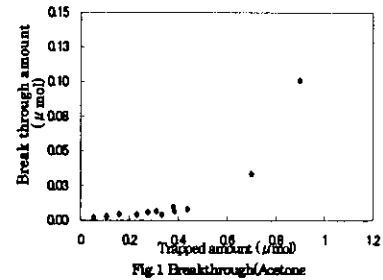
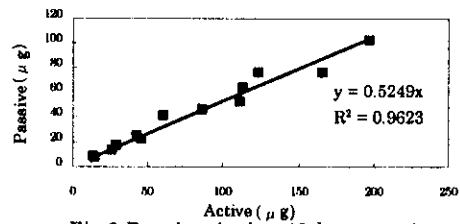


Table.3 Repeatability (Formaldehyde, Passive)

Air concentration (ppb)	Relative standard deviation (%)
12.3	6.50
30.4	5.90
64.0	2.00
142	5.65



4. 化学物質過敏症患者の被曝量調査

1) 方法

化学物質過敏症患者に、Active 法・Passive 法合わせて 4 つのサンプラーを 1 週間持って行動し、症状が出たときにはポンプのスイッチを入れてもらった。同時にアンケートもつけてもらい症状の出たときの行動や場所等を記録してもらった。また、同居もしくは近所の非過

敏症患者に Passive sampler を 1 週間持って行動してもらい、過敏症患者の結果との比較も行った。Pump 流量は、ニードルバルブによってカルボニル類約 350ml/min、VOC 類約 650ml/min に設定した。正確な流量は、測定前後にそれぞれ 5 回ずつ計測して、その平均値をとった。4)

2) 対象

北里大学研究所病院において眼球運動の異常

から化学物質過敏症と診断された患者12人を対象とした。5人の患者(1家族)に関しては、2度(秋・冬)測定を行った。

3) 倫理面への配慮

調査目的、および詳細な調査方法を記述した操作書をもとに調査に調査に対する理解を求め、調査への参加に同意した者を対象者として選定した。

5. 有機酸エステル類の測定法の開発

室内空気中有機酸エステル類の捕集は活性炭チューブを小型ポンプ(Air Check 2000(SK) with a STANCOR AC adapter)に取り付け、室内空気を約4.3m³採取することによって行った。活性炭チューブに捕捉された目的物質を、内部標準物質が含まれたトルエン溶液1mlにより10分間超音波抽出した。遠心分離後、上澄み液1μlをGC/MS, GC/FPDによって分析した。基礎実験項目は以下のとおりである。

1) 活性炭からの回収率の検討

活性炭チューブに標準溶液(フタル酸エステル:100μg/ml、リン酸エステル:10μg/ml)を0.1ml添加し、標準溶液添加チューブ中に保持されている有機エステル類を定量した。

2) 室内空気マトリックスからの回収率

6つの活性炭チューブに室内空気をサンプリングし、そのうち3つにフタル酸エステル(2μg)、リン酸エステル(1μg)を添加し分析を行った。

3) 破過試験

目的物質の入った標準溶液を活性炭チューブに添加し(100μg)、活性炭を破過層も含めて分析した。

以上の基礎試験から以下のような結果を得たので、フィールド測定に適用可能であることがわかった。

1) 直線性

フタル酸エステル類のうち、DEPは0.005-10μg/ml(以後、前処理した最終溶液濃度のことを示す)、他は0.01-10μg/mlの範囲で直線となった。リン酸エステル類のうち、TBEPは0.05-10μg/ml、他は0.02-10μg/mlの範囲で直線となった。

2) 再現性

0.1, 1, 10μg/mlの標準溶液を使って実験を行った結果、ほとんどの物質に対しRSDは10%以下となった。

3) 定量限界

フタル酸エステル類のうち、DEPは2.5pg、他は5pgとなった。リン酸エステル類は10pgとなった。

4) 回収率

活性炭からの回収率はフタル酸エステル類:94-115%、リン酸エステル類:19-80%となった。室内空気マトリックスからの回収率はフタル酸エステル類:68-102%、リン酸エステル類:84-100%となった。

5) 破過試験

実験の結果、破過層に目的物質は検出されなかった。従って、現在使用している活性炭チューブで100μgまで捕集できることが示された。

以上の結果から本研究において確立した分析方法においては、 $0.6 \times 10^{-3} \sim 23.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲で、ほとんどの物質に対し 10%以下の精度で精確に分析できることが示された。本研究で確立した分析方法は、既往の方法(1)と比較しても早く、感度が良く、精度が良い等の利点が多いことから、ルーチン分析方法として十分優れたものであると結論できた。

6. 室内空気中有機酸エステルの調査

2000年4～5月及び10～12月に計27件の新築を含む東京都・神奈川県・千葉県的一般家庭において、(3)の2)の方法で室内空気のサンプリング及び有機酸エステル類濃度を分析した。

7. Flux 測定用パッシブサンプラーの開発

室内空気汚染源特定のためのパッシブサンプラーとして、Fig.13のような装置を考案した。このサンプラーは、活性炭シート(Empore DISK:糸状の PTFE(テフロン)に充填剤を固定し、厚さ 0.5mm のメンブレンフィルターにしたディスク型固相)を、テフロン板によって高さの調節されたステンレスシャーレにセットしたもので、サンプル(壁、家具等)に付着させ、そこから発生する有機酸エステル類をサンプリングするものである。

8. Flux 測定の基礎実験

拡散確認実験では、拡散境膜の厚さを本研究で対象とした 1～15mm の間に段階的に設定し、サンプリング後、活性炭シートを取り出し内部標準物質が含まれたトルエン溶液 3ml 中に 20 分間放置した後、10 分間超音波抽出した。遠心分離後、上澄み液 1 μ l を GC/MS, FPD に

よって分析した。再現性の実験では、拡散境膜が 3mm のサンプラーを使用して 2 つ同時にサンプリングすることで測定を行い、抽出・分析を行った。

なお、物質名の略称は次の通りである。フタル酸ジエチル:DEP、フタル酸ジ-n-ブチル:DBP、フタル酸ベンジルブチル:BBP、フタル酸ジシクロヘキシル:DCHP、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル:DEHP、リン酸トリ-n-ブチル:TBP、リン酸トリス(1-クロロ-2-プロピル):TCEP、リン酸トリフェニル:TPP、リン酸トリス(2-ブトキシエチル):TBEP

C 研究結果

1. 被曝量結果

① 患者 A-1,2 (Fig.3,4,5,6)

患者 A は、新築の家に入居して発症した。今は祖父母宅に疎開している。患者 A-1 は秋の測定時には、544 分間症状が出てポンプを稼働させた。約 7 時間は知人宅(築 5 年)を訪問して頭痛、関節痛、目のかすみ、倦怠感、脱力感等の症状があり、食器棚を開けた際には目がちかちかし、整髪料をつけた人が通ると頭痛、吐き気、舌のしびれを感じた。

秋の測定結果からは、ホルムアルデヒド(40.9ppb)、アセトアルデヒド(6.16ppb)、トルエン($73.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、1,4-ジクロロベンゼン($314 \mu\text{g}/\text{m}^3$)によって症状が発現している可能性が示唆された。また、冬の結果からは、トルエン($99.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、1,4-ジクロロベンゼン($308 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、エチルベンゼン($11.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、m/p-キシレン($14.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$)によって症状が発現している可能性が示唆された。秋、冬測定で症状のなかったときの濃度(Passive 濃度)

で、これらを上回るものがなかったため、これらから、原因物質を絞り込むことは出来なかった。

患者 A-2 は秋の測定時には 79 分間症状が出てポンプを稼働させた。物置を開けた際に吐き気、ゴミ収集車の前を通った時に鼻の痛みを訴えた。秋の測定結果からは、アセトアルデヒド (2.72ppb)、1,4-ジクロロベンゼン (214 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) によって症状が発現している可能性があることがわかる。また冬の結果からは、トルエン (245 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、エチルベンゼン (19.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、m/p-キシレン (15.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) が症状の原因物質となる可能性があることがわかる。冬の測定において症状のなかったときのアセトアルデヒド濃度 (Passive 濃度) が 6.58ppb だ

ったことから、秋の症状はアセトアルデヒド (2.72ppb) によるものではなかったことが確認された。

同居している健常者 (Fig.7,8) は、トルエンと p-ジクロロベンゼンに関しては、1 週間の平均曝露濃度であるにもかかわらず、室内指針値 (263 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、238 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) よりも高い値を示した。衣服の防虫剤を大量に使用していることが原因と考えられる。過敏症患者の家族の内 4 人が症状を起こした p-ジクロロベンゼンは、この同居人の部屋及び衣服に発生源があると考えられる。酢酸エチルやメチルイソブチルケトンや m/p-キシレンに関しても患者より有意に高い曝露濃度を示した。

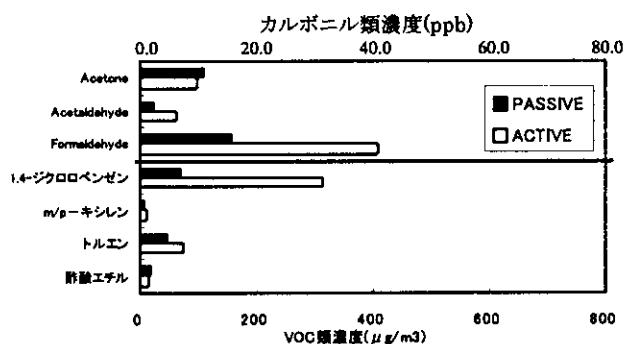


Fig. 3 患者 A-1 の秋の曝露化学物質

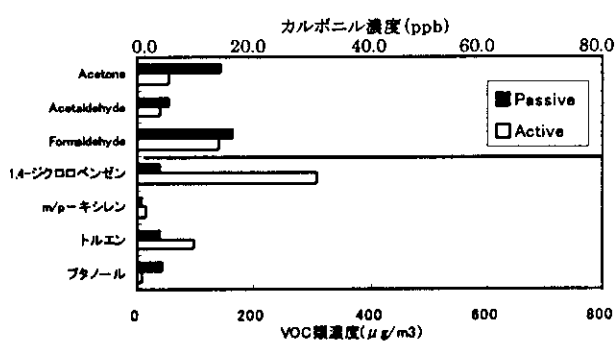


Fig. 4 患者 A-1 の冬の曝露化学物質