

って症状が引き起こされた可能性が
あることを示唆すると考えられる。

③ 患者 iii

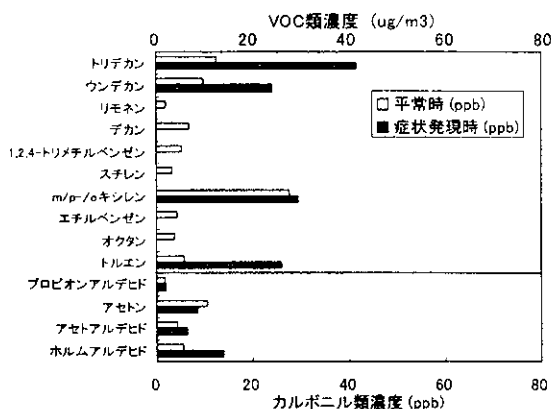


図3.患者 iiiの化学物質曝露濃度

患者 iiiは、40 代の自営業を営む女性で、化粧品で皮疹が出るというアレルギーを持っている。

患者 iiiは、カタログを開いた際やたばこ臭のある部屋に入った際や洋服ダンスを開いた際に、頭痛や目・舌・歯の痛みを訴えた。

それらの症状は、ホルムアルデヒド (13.8 ppb)、アセトアルデヒド (6.4 ppb)と、トルエン(26.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、キシレン(26.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、ウンデカン (24.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、トリデカン(41.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)によって引き起こされている可能性がある。

④ 患者 iv

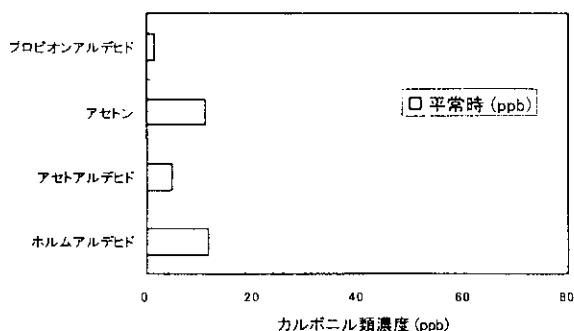


図4.患者 ivの化学物質曝露濃度

患者 ivは、30 代の男性で、アレルギー素因としては花粉症を持っている。

一日中偏頭痛や喉の痛みを感じ微熱がある日があったが、風邪もしくは治療のリバウンドと考えられ、曝露による症状の発現ではないと考えられる。

症状を引き起こす物質及びその濃度に関しましては、症状を感じた時間が短かったこともあり、特定はできなかった。

⑤ 患者 v

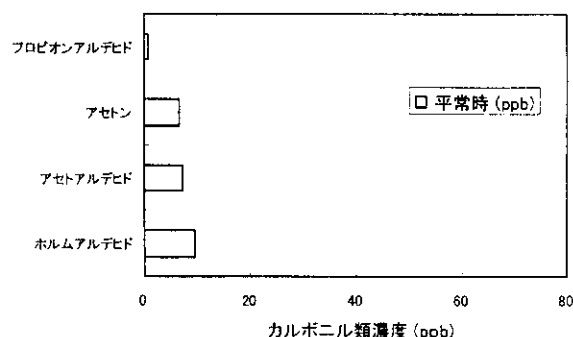


図5.患者 vの化学物質曝露濃度

患者 vは、30 代の会社員の女性で、現在は休職中である。アレルギー素因は確認されていない。

石油ストーブをつけてエアコンをつけていた時に、目眩を感じていた。

症状を引き起こす物質及びその濃度に関しましては、症状を感じた時間が短かったこともあり、特定はできなかった。

⑥ 患者 vi

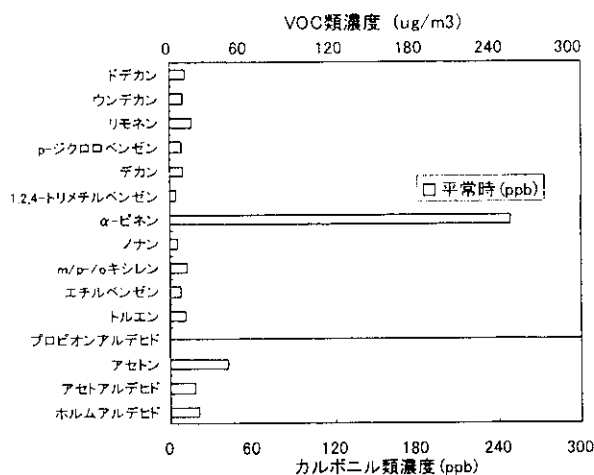


図6.患者viの化学物質曝露濃度

患者viは、30代の主婦で、アレルギー素因としては手湿疹や花粉症があげられる。

ふとんを干した時や洗濯物をたたんだ時に、体のかゆみ、頭痛、首痛、軽い目眩等を感じた。また、掃除をしていた時（埃）や外出時（排気ガス）には、鼻水が出て、動悸や体のしびれ、顔がほてるのを感じた。

症状を引き起こす物質及びその濃度に関しましては、症状を感じた時間が短かったこともあり、特定はできなかった。

⑦ 患者vii

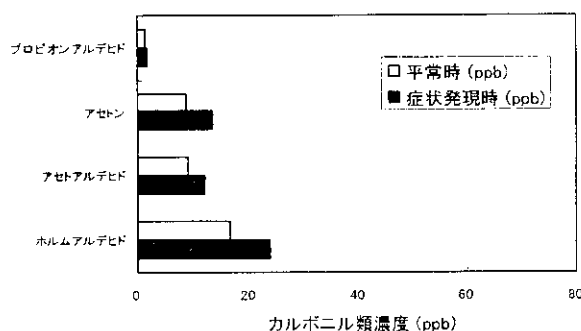


図7.患者viiの化学物質曝露濃度

患者viiは、30代の男性会社員で、

アレルギー素因はある。

車の排気ガスを浴びたときや、電車内で化粧や香水や整髪料の臭いを嗅いだときや、たばこの臭いを嗅いだときに、鼻や目の痛みや頭痛や吐き気を感じた。

ホルムアルデヒド (24.0 ppb)、アセトアルデヒド (12.1 ppb)、アセトン (13.6 ppb)によって症状が引き起こされている可能性がある。

2. 非過敏症の曝露濃度との比較

それぞれの患者の原因物質と特定された物質への一週間の曝露濃度は、非過敏症患者の曝露濃度と比較して十分低かった。ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、の結果については以下の図8-10に示した。

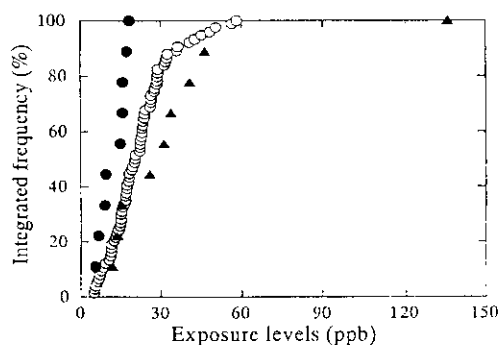


図8.Exposure levels to formaldehyde

(○: the weekly exposure levels of non-MCS persons, ●: weekly exposure levels of MCS patients, ▲: the exposure levels of MCS patients when they felt symptoms)

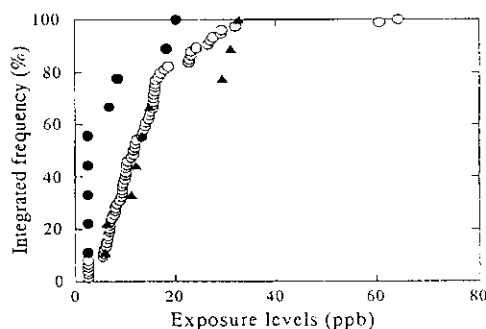


図9.Exposure levels to acetaldehyde

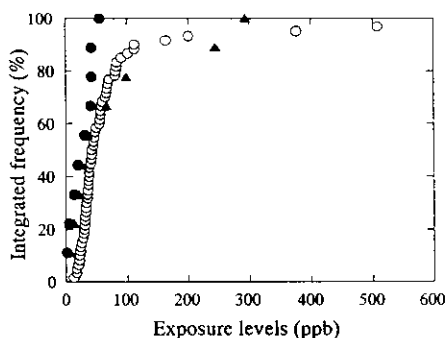


図 10. Exposure levels to toluene

次に、全ての過敏症患者と非過敏症そ

れぞれの化学物質曝露量の平均値、中央値、最大値を以下の Table1 に示した。

過敏症患者の曝露レベルは非過敏症患者と比べて低かった。過敏症患者が、ふだんの生活において化学物質を避けて生活しており、非患者の曝露レベルの空間において症状を引き起こされている可能性が示唆される結果となった。

これらの結果から、今後一般の基準値とは別に過敏症患者用の基準値の設定が必要だと考えられる。

Table 1. Weekly personal exposure levels of non-MCS persons (n=76) and MCS patients (n=22)

	non-MCS persons			MCS patients		
	median (ppb)	mean (ppb)	SD (ppb)	median (ppb)	mean (ppb)	SD (ppb)
Formaldehyde	20.7	22.3	11.7	13.5	16.4	12.2
Acetaldehyde	11.9	14.4	10.6	<5.36	7.18	6.13
Acetone	18.6	28.1	24.7	<15.6	16.0	12.0
Propionaldehyde	2.12	2.41	2.14	1.77	3.06	4.34
	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Butanole	<4.56	9.65	30.6	<4.56	9.68	14.8
Benzene	<13.1	<13.1	-	<13.1	<13.1	-
Methylisobutylketon	<3.78	<3.78	-	<3.78	<3.78	-
Tolene	47.0	101	217	14.3	21.1	17.9
Octane	<3.73	4.47	7.43	<3.73	3.73	4.18
Tetrachrolethylene	<3.87	<3.87	-	<3.87	<3.87	-
Buthylacetate	<4.36	<4.36	-	<4.36	<4.36	-
Ethylbenzene	8.84	19.4	62.2	5.17	5.95	4.38
m/p-Xylene	12.4	21.3	43.7	8.39	8.97	6.99
Stylene	<4.75	<4.75	-	<4.75	<4.75	-
o-Xylene	4.38	7.08	11.1	<4.19	<4.19	-
Nonane	<4.76	7.48	12.7	<4.76	<4.76	-
α -Pinene	<4.58	10.4	32.1	<4.58	35.1	-
1,3,5-Trimethylbenzene	<4.59	<4.59	-	<4.59	<4.59	-
1,2,4-Trimethylbenzene	6.12	10.3	10.4	<4.38	<4.38	-
Decan	<3.83	9.54	19.3	<3.83	5.41	5.27
p-Dichrolbenzene	4.46	74.0	246	8.84	16.6	16.1
1,2,3-Trimethylbenzene	<3.95	<3.95	-	<3.95	<3.95	-
Limonene	5.98	13.3	17.3	3.96	6.67	7.75
Undecane	<5.26	9.20	15.6	<5.26	<5.26	-
Nonanale	<4.61	12.2	24.8	<4.61	<4.61	-
Dodecan	6.08	9.62	10.7	<4.90	9.40	24.4
Tridecan	<5.53	5.59	7.40	<5.53	<5.53	-
Tetradecan	<5.44	<5.44	-	<5.44	12.4	33.0
Pentadecan	<5.70	<5.70	-	<5.70	<5.70	-
Hexadecan	<5.95	<5.95	-	<5.95	<5.95	-

XIII 室内空气中化学物質のアレルギー反応におよぼす影響に関する研究

分担研究者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 療品部主任研究官
鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価室主任研究官
鹿庭 正昭 国立医薬品食品衛生研究所 療品部室長

研究要旨 化学物質吸入暴露のタンパクアレルギー反応に対する影響を動物試験で調べるため、アレルギー陽性タンパク質 ovalbumin (OVA)を用いて動物を効率的に感作させる方法を検討した。BALB/c系マウスに対し、OVA 10 μ gを Alum アジュバントとの共存下で、2回腹腔内投与することで感作できることがわかった。OVA 感作マウスでは、血清中総 IgE 抗体値の著しい増加が認められ、脾臓リンパ球の幼若化反応、特に OVA に対する反応に著しい増加が認められた。OVA-Alum 投与群での Con A 刺激によって産生される IL-4 量は Alum のみ投与群と差はなかったが、OVA で刺激した場合の産生量は上昇した。一方、IFN- γ 産生は OVA 投与群よりも Alum 投与群の方がわずかに高い値を示した。このサイトカイン産生パターンは OVA 投与による液性免疫優位の状態を意味しており、これらの測定指標は、OVA に対するアレルギー状態の変動を見る上で有効な指標となることが示唆された。in vitro のサイトカイン産生に対するホルムアルデヒド(HCHO)およびパラジクロロベンゼン(p-DCB)の影響を調べる上で、これらの物質の添加条件を決めた。線維芽細胞株 V79 細胞に種々の濃度のホルマリン(HCHO 溶液)および p-DCB を添加して 24 時間培養したときは、ホルマリンは 2.5 μ g/ml、p-DCB は 25 μ g/ml まで変化なかった。マクロファージ系細胞株 P388D1 細胞については 72 時間培養したとき、ホルマリンは 0.25 μ g/ml、p-DCB は 2.5 μ g/ml で毒性は認めなかった。また、ホルマリンは 1 μ g/ml、p-DCB は 10 μ g/ml で吸光度の低下率は 10%以内であった。正常マウス脾臓リンパ球は P388D1 細胞と同様の濃度反応を示した。よって、ホルマリンおよび p-DCB はこれらの濃度でリンパ球に in vitro で添加して、サイトカイン産生などの免疫指標を調べるのがよいと思われた。

A. 研究目的

生活用品にはさまざまな化学物質が使用され、これらから揮発した化学物質は、高気密化、断熱化された住宅の室内環境中に長くかつ高濃度に存在することになっている。種々の化学物質に過敏に反応して自律神経症状を呈する人がいるが、その原因が室内空气中の化学物質、特にホルムアルデヒド(HCHO)にあると疑われているが、未だ十分な証拠は得られていない。また、ディーゼルガスの微粒子がアレルギーを悪化させると報告されているように、近年の粘膜気道アレルギー疾患の増加も、化学物質による室内空気汚染が関与

しているのではないかと疑われている。¹⁾

HCHO は住宅建材の接着剤などに使用されるため、一般家庭内環境で頻度高く検出される。HCHO のアレルギー症状に対する影響に関しては患者や実験動物を用いて検討されているが、暴露期間や方法、測定指標の違いにより種々の結果が得られており、明確な判断はできていない。²⁻⁴⁾ 我が国における室内空气中の HCHO 濃度の指針値は、慢性毒性的な面から 0.08 ppm と設定されている。室内空气中には HCHO 以外にも、衣類の防虫剤として使われるパラジクロロベンゼン(p-DCB)や溶剤のトルエンなど多くの化学物

質が検出されるが、いずれも急性毒性的な面は評価されているものの、神経系や免疫系に対する評価は十分でない。^{5,6)} さらに、室内環境のように複数の化学物質が組み合わさったときの影響についてはほとんど知られていない。我々は、以前、HCHOとp-DCBを短期間マウスに暴露したときの化学物質アレルギーに対する効果を検討した。しかし、暴露による差よりはアレルギーに対する個体差の方が大きく、暴露の効果を明確に認めることはできなかった。⁷⁾

本研究では、タンパク質が原因となるアレルギー反応に対する室内空気中の化学物質の単独または併用暴露の効果、さらにはその機構について検討する。タンパクアレルギーは液性免疫に分類され、IgE抗体の産生がアレルギー反応の程度に影響し、その抗体産生はサイトカインによって制御される。CD4+ T helper(Th)細胞はTh1とTh2の2つのグループに分けられ、これらの細胞から産生されるそれぞれのサイトカインは免疫反応の維持に重要である。⁸⁾ したがって、リンパ球サブポピュレーションの解析およびサイトカインの産生動態ならびに抗体値は、免疫状態の変化をあらわす指標となると考えられる。よって、これらに対する化学物質の影響を調べることにより、アレルギー増悪のメカニズムを解明できると思われる。今年度は、タンパクアレルギーの誘発法と指標の検出、および化学物質の*in vitro*暴露条件の検討を行った。

B. 研究方法

試薬：陽性タンパクアレルギーとして、ovalbumin (OVA) (Sigma社)を用いた。アジュバントとして、Alum(aluminum hydroxide hydrate [Al(OH)₃ · x H₂O] gel suspension, LSL Co., Ltd.)を用いた。OVAはリン酸緩衝液(PBS)に溶解した。

免疫方法：BALB/c系雌性マウス(6~8週齢)(1群5匹)に、OVA 10 μgとAlum 2 mgのPBS混合溶液 200 μlを腹腔内注射し、⁹⁾ 1週間後さらに同様の操作を繰り返した。別のマウスでは、アジュバントと混和させずに、2% OVA-PBS溶液 250 μl

を注射した。¹⁰⁾ PBSまたはアジュバントだけを注射したものを対照とした。AlumとOVAを混合して投与したときは、最終投与から7日後に、アジュバントと混合しないで投与したときは、最終投与から14日後に、採血、脾臓を採取し、以下の試験を行った。

IgEアッセイ：心臓採血し、凝固後、3000 rpmで5分間遠心して血清を分離した。血清中の総IgE抗体価を、既報のELISA法^{9,11)}を若干改変した方法により測定した。ELISA用96穴プレートに2.5 μg/ml rat-monoclonal anti-mouse IgE antibody (Southern Biotechnology Associates Inc., AL, USA)の0.1 mol/l炭酸緩衝液(pH 9.6)を100 μl入れ、4℃で一晩放置してコーティングした。0.1% casein-PBS 300 μlで、37℃、30分間処理してブロッキングした。個々の血清を0.1% casein-PBSで100倍希釈したもの、または種々の濃度のmouse monoclonal IgE anti-dinitrophenyl (DNP) antibody (clone SPE-7, Sigma Chemical, MO, USA)標準溶液を100 μl入れて、37℃で2時間静置した。次に、horseradish peroxidase (HRP)標識したgoat anti-mouse IgE (Nordic Immunology, Tilberg, The Netherlands)を1:2000に0.1% casein-PBSで希釈したものを100 μl加えて、室温で1時間静置した。各インキュベーション操作の間では、プレートを0.05% Tween 20-PBSで4回洗浄した。その後、o-phenylenediamine (OPD) peroxidase substrate (Sigma Chemical Co., MO, USA) 100 μlを加え、暗所で10分間置いた後、0.5 mol/l citric acid 100 μlを入れて反応を止めた。反応液の450 nmでの吸光度を測定し、標準抗体溶液から作製した検量線より、個々の血清中の総IgE抗体価を求めた。

リンパ球幼若化反応：¹²⁾脾臓を取り出し、200 meshの金属メッシュ上で押しつぶしてリンパ球を分離し、ナイロンメッシュを通して15 ml遠心チューブに移し、Hanks

液で 1200 rpm で 5 分間遠心して洗浄した。溶血処理してさらに洗浄後、牛胎児血清 (FCS) を 10%、25 mmol/l HEPES、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin を含有する RPMI1640 培地 (FCS-RPMI) に浮遊させた後、 5×10^5 個/200 μ l ずつ 96 穴プレートに入れた。種々の濃度の各 mitogen (Con A 2 μ g/ml、LPS 1 μ g/ml)、抗原として OVA 100 μ g/ml を添加して 72 時間培養し、終了 3~4 時間前に $^3\text{HTdR}$ 0.25 μ Ci または WST-8 色素 (Cell Counting Kit-8、和光純薬)、alarBlue 色素 (岩木硝子) を添加して細胞内に取り込まれた $^3\text{HTdR}$ 量 (dpm) および 450 nm (対照 595 nm) または 595 nm の吸光度を測定した。

サイトカインアッセイ：脾臓リンパ球を 5×10^6 個/1 ml ずつ 24 穴プレートに入れ、Con A 2 μ g/ml または OVA 100 μ g/ml を添加して 48~72 時間培養した。培養上清を 3000 rpm で 5 分間遠心して回収し、IFN- γ および IL-4 濃度を市販 ELISA キット (BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA) により定量した。

細胞毒性試験：ハムスター由来線維芽細胞 V79 細胞、マウス由来マクロファージ系 P388D1 細胞およびマウス脾臓リンパ球を用いた。V79 細胞は 10% FCS を含有する Eagle's MEM に浮遊させ 9×10^3 個ずつ 96 穴プレートに入れて 24 時間培養後、種々の濃度のホルマリン (HCHO 溶液) または p-DCB を含有させた培養液と交換してさらに 24 時間培養した。培養終了後、50 μ g/ml のニュートラルレッド (NR) 溶液 200 μ l と交換して 3 時間静置した。NR 溶液を捨て 2.5% ホルマリン-1% 塩化カルシウム溶液 280 μ l を加えて 1 分間静置して細胞を固定、洗浄し、1% 酢酸-50% エタノール溶液 100 μ l を加えて、細胞内に取り込まれた NR を抽出した。試験物質を添加せずに培養したときの 540 nm における吸光度を 100% と換算し、試験物質の各濃度の % を求めた。¹³⁾ P388D1 細胞および脾臓リンパ球は FCS-RPMI に浮遊させ、 1×10^4

個または 5×10^5 個ずつ 96 穴プレートに入れて種々の濃度のホルマリンまたは p-DCB 溶液を加えて 48~72 時間培養した。培養終了 4 時間前に WST-8 色素溶液 10 μ l を入れた後、450 nm (対照 595 nm) の吸光度を測定し、Control に対する吸光度の割合 % を求めた。

C. 研究結果

各試験溶液を投与されたマウスの血清中総 IgE 抗体濃度を ELISA 法により測定した。Alum アジュバントだけを投与した群と PBS だけを投与した群との値はほとんど同等であり、アジュバントに対して IgE 抗体は産生されないことが確認された。アジュバント共存下、OVA を 2 回投与すると IgE 抗体の増加が認められた。一方、アジュバントなしで OVA を投与しても、総 IgE 抗体値の上昇はわずかであった (図 1)。

Alum のみ投与群と OVA-Alum 投与群の脾臓リンパ球の mitogen および OVA に対する幼若化反応を WST-8 および alamarBlue 色素の吸光度の変化または $^3\text{HTdR}$ の取り込み量により測定した。何も添加しないで培養した control に対する増加率は、 $^3\text{HTdR}$ 取り込みで測定したときが最も大きかった。WST-8 でも Con A や LPS に対しての増加 (40~60%) は認められた。しかし、OVA に対する反応の変化は多くはなかった。一方、alarBlue では幼若化による吸光度の変化はほとんどなく、本反応の検出はできなかった (表 1)。OVA 投与群では Alum 群に比べて各 mitogen に対する反応率が若干増加し、LPS で刺激培養する以外は 72 時間培養した方が高い値を示した。OVA 投与と非投与の両群を比較すると、OVA 投与群では特に OVA に対する幼若化反応が上昇し、最も差が認められた (表 2)。

脾臓リンパ球培養上清のサイトカインを測定した。OVA-Alum 投与群で Con A 刺激によって産生される IL-4 量は Alum 群と差はなかった。しかし、OVA 投与群のリンパ球を OVA で刺激した場合、Alum 群のそれと比べて IL-4 産生量が上昇した (表 3(a))。Con A および OVA 刺激による IFN- γ 産生量は OVA 投

与群よりも Alum 投与群の方がわずかに高い値を示した(表 3 (b))。培養時にホルマリン 10 μ g/ml と p-DCB 100 μ g/ml を添加したが、いずれの場合も 3 HTdR の取り込み、サイトカイン産生量は低下し、本濃度ではリンパ球に対して毒性が認められた(データ未掲載)。

V79 細胞にホルマリンおよび p-DCB を 24 時間暴露したときの濃度反応関係を図 2 に示した。ホルマリンは 2.5 μ g/ml では control と変化はないが、それ以上では濃度が高くなるにつれて若干生存率を低下させた。P-DCB については、25 μ g/ml までは変化なく、ホルマリンに比べて毒性強度は弱かった。またこれ以上の濃度では不溶物が多く、判定が困難となった。本細胞を、ホルマリン 10 μ g/ml に p-DCB を 5~200 μ g/ml 共存させた溶液と培養したが、毒性強度の増強などの変化は認められなかった。

P388D1 細胞については化学物質による処理時間を長くして 72 時間培養したときの毒性を調べた。ホルマリンは 0.25 μ g/ml、p-DCB は 2.5 μ g/ml で毒性は認めなかった。ホルマリンは 1 μ g/ml、p-DCB は 10 μ g/ml でも吸光度の低下率は 10% 以内であり、この範囲での毒性はわずかであった(図 3)。培養時間にも影響するが、P388D1 細胞の方が低い濃度で毒性が表れた。マウス脾臓リンパ球についても上記濃度のホルマリンまたは p-DCB を添加して培養し、WST-8 色素の吸光度変化を見た。正常リンパ球の反応は P388D1 細胞と同様の濃度変化を示した(図 4)。

D. 考察

動物にアレルギーを誘発させるにはいろいろな方法が取られているが、アジュバントの使用は確立されているモルモットを用いた皮膚感作性試験でもその是非が話題となることがある。しかし、アレルギー状態と他の化学物質の暴露との関係を見るといった実験では、動物を確実に感作させることが重要である。そこでまず、有効な感作方法を見つけるため、陽性タンパクアレルギー OVA をアジュバントの有無の違いでマウスに投与し、感

作程度、すなわち IgE 抗体値が変化するか検討した。Dearman らの方法¹⁰⁾に従い、アジュバントなしで OVA を 2 回腹腔内注射し 28 日目に採血、血清総 IgE 抗体値を測定したが、溶媒のみ投与群に比べて上昇はあまり認められなかった。一方、アジュバントとともに OVA を投与した群では明らかな IgE 抗体値の上昇を認めた。したがって、本研究では以後、アレルゲンはアジュバントとともに投与することにした。また、血清 IgE 抗体価は免疫状態の強弱をあらわす 1 つと考えられた。

OVA-Alum 投与群の脾臓リンパ球は OVA 非(Alum のみ)投与群に比べて OVA に対する幼若化反応が亢進することから、これは特異的な免疫指標となることがわかった。Mitogen による幼若化反応は 3 HTdR の取り込みで測定するのが最も高感度であるが、WST-8 色素によってもある程度の判定ができることがわかった。ただ、OVA による幼若化反応の変化はわずかで、WST-8 色素でこの反応の変動を見るには難しいかもしれない。

CD4⁺ T helper(Th)細胞は Th1 と Th2 の 2 つのグループに分けられ、これらの細胞から産生されるサイトカインは免疫反応の維持に重要である。⁸⁾ Th1 サイトカイン IFN- γ は IgE 抗体産生を抑制し、¹⁴⁾ Th2 サイトカイン IL-4 は IgE 抗体反応の促進と維持に関係する。^{15,16)} したがって、IFN- γ 産生が増加すれば、Th1/Th2 バランスが Th1 優勢に、IL-4 が優勢なら Th2 優勢の状態に傾くと考えられる。化学物質で気道アレルギーを起こす trimellitic anhydride (TMA) や toluene diisocyanate (TDI) をマウスに投与すると、IgE 抗体値が増加し、Th2 細胞からのサイトカイン IL-4 や IL-10 の産生が増加することが報告されている。一方、接触皮膚炎を起こす 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) は Th1 優位の IFN- γ を産生すると報告されている。^{17,19)} OVA-Alum 投与群のリンパ球のサイトカイン産生状態は Alum 群のそれと比較して、OVA 刺激による IL-4 産生が増加し、IFN- γ 産生が低下する液性免疫優位の状態を示し、これは IgE 抗体産生の増加を支持した。したがって、サイトカインの産生動態に対する化

学物質の影響を見ることは、これらによるアレルギーの増悪の有無、メカニズムを知る上で有効である。サイトカイン産生などの免疫反応へのHCHOおよびp-DCBのin vitroでの効果を見るため、前段階としてこれらの細胞毒性を調べた。線維芽細胞株とマクロファージ様株、および正常リンパ球に対して、毒性作用のない濃度を見つけることとした。その結果、ホルマリンはp-DCBよりも低い濃度でも細胞死があることから毒性強度が強く、これはin vivo刺激性が強いことを意味する。培養期間にも関係するが、線維芽細胞よりもリンパ球系細胞に対して低い濃度で毒性が表れた。一方、感作していないリンパ球の増殖反応に対して、これらの化学物質の亢進作用は認めなかった。

次年度は、今回得られた濃度関係を用いて、HCHO および他の化学物質との併用によるサイトカイン産生への効果を調べ、アレルギー亢進の可能性を見る予定である。また、実際にOVA感作動物に化学物質を暴露して、これらのアレルギー反応指標や一般的な免疫機能としてのIgG抗体の産生能に対する影響についても検討したい。

E. 結論

BALB/c系マウスにOVAをアジュバントとともに2回投与することで効率的に感作することができた。この感作マウスでは、著しい血清総IgE抗体値の増加と脾臓リンパ球の幼若化反応の増加を認めた。したがって、血清総IgE抗体値は個体としての反応性の変化を見る上で有効である。脾臓リンパ球のin vitroの反応としては、OVA刺激による幼若化が起こりIL-4産生が増加し、液性免疫優位の反応が得られた。サイトカイン産生動態は免疫状態の維持に重要な役割をし、アレルギー状態の増悪などメカニズムを知る上で有効な指標である。これに対する化学物質の影響、培養時の添加条件を知るために、各種細胞への毒性濃度を調べた。ホルマリンは0.25 μ g/ml、p-DCBは2.5 μ g/mlの濃度までは影響を及ぼさなかった。以上の結果をもとに、今後併用時のサイトカイン産生に対する影響な

ど検討していく予定である。

F. 参考文献

1. 藤巻秀和：ファルマシア 36, 207-210 (2000).
2. T. Yoshida and F. Kayama: Fund. Appl. Toxicol., suppl. 35, 195 (1997).
3. Kramps, J.A., Peltenburg, L.T.C., Kerklaan, P.R.M., Spieksma, F.T.M., Valentijn, R.M., Dijkman, J.H.: Clin. Exp. Allergy 19, 509-514 (1989).
4. Tarkowski, M., Gorski, P.: Int. Arch. Allergy Immunol., 106, 422-424 (1995).
5. 李 勤, 花井義道, 宮田幹夫, 石川 哲：日本眼科紀要 45, 475-480 (1994).
6. 鈴木明夫, 永井弘光, 平塚秀明, 井上 聡, 桶生 聖, 秋葉美紀, 吉田徳男：応用薬理 42, 197-208 (1991).
7. 五十嵐良明, 鎌田栄一, 鹿庭正昭：平成12年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業, 室内空気中の化学物質に関する調査研究報告書(2001).
8. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L.: J. Immunol., 136, 2348-2357 (1986).
9. Akiyama, H., Hoshino, K., Tokuzumi, M., Teshima, R., Mori, H., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M.: Biol. Pharm. Bull., 22, 551-555 (1999).
10. Dearman, R.J., Caddick, H., Basketter, D.A., Kimber, I.: Fd. Chem. Toxicol., 38, 351-360 (2000).
11. Teshima, R., Kawase, M., Tanaka, T., Hirai, K., Sato, M., Sawada, J., Ikebuchi, H., Ichinoe M., Terao, T.: J. Agric. Food Chem., 38, 1618-1622 (1990).
12. Y. Ikarashi, T. Tsuchiya, A. Nakamura, M. Beppu, K. Kikugawa: J. Nutr. Sci. Vitaminol., 44, 225-236 (1998).
13. Borenfreund, E., Puerner, J.A.: Toxicol. Lett., 24, 119-124 (1985).
14. Finkelman, F.D., Katona, I.M.,

- Mosmann, T.R., Coffman, R.L.: *J. Immunol.*, 140, 1022-1027 (1988).
15. Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F.Jr., Snapper C.J., Ohara, J., Paul, W.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9675-9678 (1986).
16. Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F.Jr., Holmes, J., Ohara, J., Tung, A.S., Samples, J.G., Paul, W.E.: *J. Immunol.*, 141, 2335-2341 (1988).
17. Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I.: *J. Appl. Toxicol.*, 12, 317-323 (1992).
18. Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I.: *Immunology*, 86, 545-550 (1995).
19. Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 138, 308-316 (1996).

表1. 各種測定試薬を用いたリンパ球幼若化反応の結果

(a) WST-8

Stimulant	Alum			OVA-Alum		
	Absorbance	SI	% increase	Absorbance	SI	% increase
- (Control)	0.326			0.423		
Con A 2 µg/ml	0.481	1.48	47.5	0.642	1.52	51.7
LPS 1 µg/ml	0.463	1.42	41.9	0.671	1.59	58.5
OVA 100 µg/ml	0.373	1.15	14.5	0.485	1.15	14.6

(b) AlamarBlue

Stimulant	Alum			OVA-Alum		
	Absorbance	SI	% increase	Absorbance	SI	% increase
- (Control)	0.519			NT		
Con A 2 µg/ml	0.543	1.05	4.6	0.496		
LPS 1 µg/ml	0.517	0.99	-0.5	NT		
OVA 100 µg/ml	0.537	1.03	3.5	0.490		

(c) ³HTdR

Stimulant	Alum			OVA-Alum		
	dpm	SI	% increase	dpm	SI	% increase
- (Control)	125			155		
Con A 2 µg/ml	1823	14.54	1353.8	2088	13.43	1243.4
LPS 1 µg/ml	1976	15.76	1476.0	1347	8.67	767.0
OVA 100 µg/ml	239	1.91	90.7	516	3.32	231.8

AlumまたはOVA-Alum 250 µlを2回腹腔内投与したマウスから脾臓リンパ球を遊離し、5 × 10⁵個ずつCon A、LPSまたはOVAと48時間培養した。培養終了3時間前に、各測定試薬(WST-8 10 µl、alamarBlue 10 µlおよび³HTdR 0.25 µ Ciを加え、吸光度の変化または細胞に取り込まれた³HTdR量(dpm)を求めた。何も加えずに培養した時を対照とし、これに対する増加率stimulation index (SI)を計算した。

表2. 培養時間の違いによる脾臓リンパ球の幼若化反応の変化

Injection	Incubation time (h)	³ HTdR incorporation (mean ± SD, dpm)			
		-	Con A	OVA	LPS
Alum	48	148 ± 32	1291 ± 536	382 ± 132	1537 ± 998
	72	124 ± 24	3263 ± 839	270 ± 71	603 ± 100
OVA-Alum	48	154 ± 32	1981 ± 456	524 ± 127	1599 ± 234
	72	141 ± 29	3774 ± 610	622 ± 239	824 ± 151

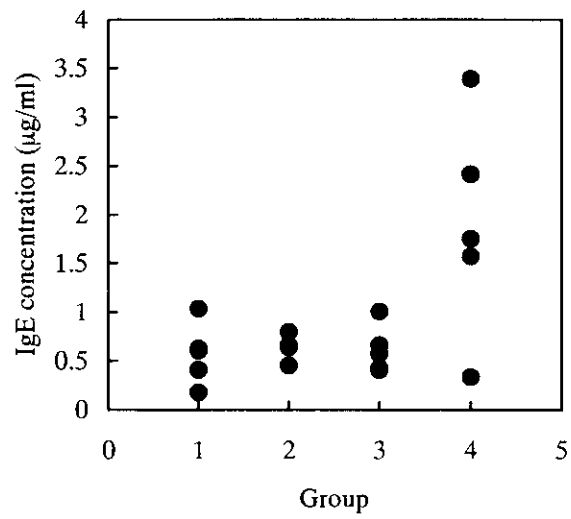


図1. 血清総IgE濃度

Group	Treatment	IgE concentration (μ g/ml) (Mean \pm SD, n=5)
1	PBS	0.57 \pm 0.32
2	OVA-PBS	0.64 \pm 0.12
3	Alum	0.61 \pm 0.24
4	OVA-Alum	1.89 \pm 1.13

表3. OVA感作マウスの脾臓リンパ球からのサイトカイン産生

(a) IL-4		
Treatment	IL-4 (pg/ml, mean \pm SD, n=5)	
	OVA-stimulate	Con A-stimulate
Alum	17.2 \pm 1.8	28.2 \pm 3.9
OVA-Alum	56.3 \pm 17.1	26.1 \pm 3.5

(b) IFN- γ		
Treatment	IFN- γ (pg/ml, mean \pm SD, n=5)	
	OVA-stimulate	Con A-stimulate
Alum	391 \pm 137	991 \pm 429
OVA-Alum	265 \pm 120	882 \pm 298

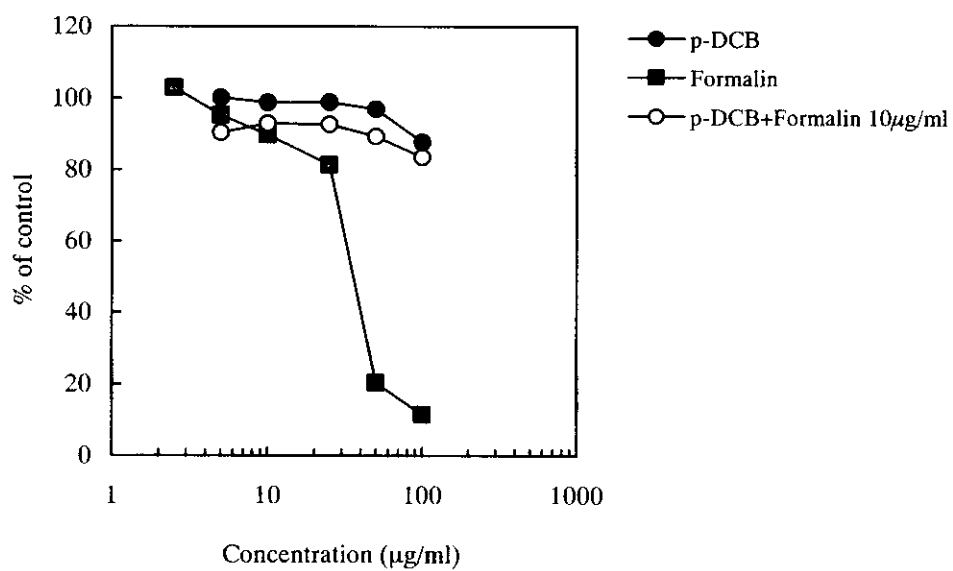


図2. ホルマリンおよびパラジクロロベンゼンのV79細胞に対する細胞毒性

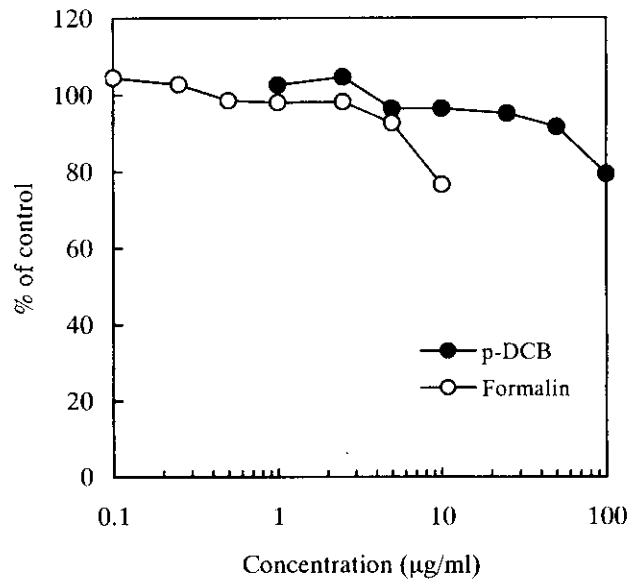


図3. P388D1細胞に対するホルマリンおよびパラジクロロベンゼンの細胞毒性
P388D1細胞 1×10^4 個に種々の濃度の化学物質を加えて72時間培養した。
毒性の判定は、WST-8色素の吸光度変化によって評価した。

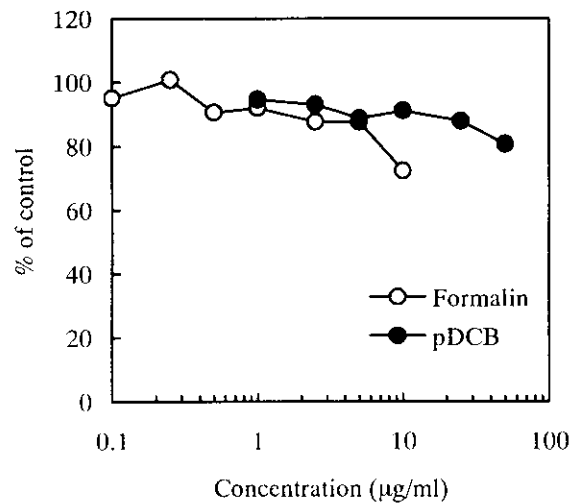


図4. 正常マウス脾臓リンパ球に対するホルマリンおよびパラジクロロベンゼンの細胞毒性
リンパ球 5×10^5 個に種々の濃度の化学物質を加えて48時間培養した。培養終了3時間前に
WST-8色素を添加し、吸光度の変化により細胞の生存率を評価した。

4. 室内空气中化学物質の低減化に

関する技術的開発として

XIV. ピーナッツ殻による空气中ホルムアルデヒドの吸着除去

千葉大学工学部

青柳象平

XIV ピーナッツ殻による空气中ホルムアルデヒドの吸着除去

分担研究者 青柳象平 千葉大学工学部

研究要旨 ピーナッツ殻の多孔性及び通気性に注目し、室内汚染物質の吸収材用担体としての利用を考えた。すなわち、シックハウス症の主因であるアルデヒド類と反応する適当な化合物を殻の網目構造に含浸させ、殻の高い通気性により、室内空気中のアルデヒド類を効果的に吸収・捕捉するものである。事実、ポリフェノール的一种、フロログルシン含浸殻は予想通り、高い効果を示した。さらに注目すべきは、無処理の殻が含浸殻の70~80%の活性を示したことである。ピーナッツ殻には準備および、廃棄の段階で特段の配慮を要せず、室内汚染物質吸収材としての活用が期待できることが明らかになった。

A. 研究目的

住宅建材や家具材から発散するホルムアルデヒドがシックハウス症候群の原因となっていることは良く知られている。ホルムアルデヒドには急性疾患の他、呼吸器系に関する発癌性も指摘されている。問題の根本的解決策の一つは、発散するアルデヒド類を吸収・無害化することである。最近、茶カテキンの優れたホルムアルデヒド捕捉能が示され、建材への塗布など実用化の試みが進められている。カテキンは3-ビドロキシフラバンのポリオキシ体の総称で、茶カテキンは最も代表的な(+)カテキンに相当する。決して安価な化合物ではなく、茶殻に含まれているのは好都合と云うべきで、抽出されたカテキンのホルムアルデヒドキャッチャーとしての実用性には疑問が持たれる。ホルムアルデヒドとの反応は(+)カテキンのC-6またはC-8位への親電子置換反応であることが知られている。そこで、カテキンの部分構造を持ち安価なポリフェノール、カテコール（カテコ

ールが「カテキン」と呼ばれることもある）および、フロログルシンを選び、ホルムアルデヒドキャッチャーとしての効果を調べた。

B. 研究方法

アルデヒド類の吸収に有効と思われる化合物（活性物質）をピーナッツ殻に含浸させた検体を用意する。これをテドラーバッグ中にセットし、ホルムアルデヒド標準ガス（1 ppm）を満たし（10 l）、バッグ中のホルムアルデヒド濃度が時間と共に減少する様を観測する。

1. 1. アルデヒド測定用拡散サンプラー・カートリッジの流用

活性物質5~6 mgを25 ml丸底フラスコにとり、メタノール10 mlを加えて溶かす。シリカゲル1.0 gを加え、フラスコをロータリーエバポレーターにセットし、約10分回転する。続いて減圧下、約30分回転した後、加温（40℃）し、メタノールを完全に留去する。この、活性

物質吸着シリカゲル 250 mg をサンプラー・カートリッジ(スベルコ, DSD/DNPH 空カートリッジ) に詰め, 試材とする。

1. 2. 活性物質含浸ピーナッツ殻の調製

活性物質の 0.1 % 溶液 200 ml を 500 ml ナス型フラスコにとり, ピーナッツ殻小片 20 g を加える。フラスコをロータリーエバポレーターにセットし, 約 10 分回転した後, 減圧下約 30 分回転する。続いて, 加温 (40 °C) し, メタノールを完全に留去する。乾燥した活性物質含浸ピーナッツ殻 2.0 g を茶煎用バッグに詰め検体とする。

1. 3. アルデヒド吸収能の測定

コック付テドラーバッグの角を 45° に約 5 cm カットし, 糸を付けた検体を挿入し, 切口を融封する。検体がバッグの中央部に位置するよう, 糸の端を外側からクリップで固定する。続いて, ホルムアルデヒド標準ガスを流速 2 l/min で 5 分間通気・充填する。通気開始後 5 分, 10 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間の各時点, 注射筒でバッグ内気体 200 ml を採集し, 固相抽出管 (スベルコ, LpDNPH S10L) に導入する。ホルムアルデヒドは固相抽出管のシリカゲルに含浸させてある 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) と瞬時に定量的に反応し, 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体を生ずる。固相抽出管内に保持されているこれらの物質をアセトニトリルで溶離し, 高速液体クロマトグラフィーにより分析する。

C. 結果及び考察

1. 1. アルデヒド測定用拡散サンプラー・カートリッジを流用した測定

多孔性のシリンダー中に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (一種のアルデヒドキャッチャーと云える) を吸着させたシリカゲル (250 mg) が入れている。外気に対する表面積が大きく, 検出効率が高いことが特徴の一つである。今回は, まず個々の活性物質 (DNPH の代わりにシリカゲルに吸着させて封入) の効果を比較するため, 取扱い便利なこのカートリッジを流用した。

初めにこの実験系, テドラーバッグに対するホルムアルデヒドの吸着を調べ, 無視できる程度であることを確認した。無処理のシリカゲルは吸着性を示しているが安定していない。活性炭はかなり顕著な吸着を示している。一方, 紅茶パック (1 回煎じ出し, 乾燥したもの) は確かに吸着を示すものの, 予想した程ではない。これに対し, カテキンは顕著な吸収を示し, 問題のカテキンも明らかな吸収を示した。このように, それぞれの化合物についてキャッチャー性能を概観することができる。

1. 2. 活性物質含浸ピーナッツ殻

カテキン類縁体であるケルセチンを含浸させた殻は, ホルムアルデヒドに対する顕著な吸収を示した。DSD-DNPH サンプラー・カートリッジを用いた場合より効果が大きく現れているが, サンプル量が多いことと, 通気性が高いことによると思われる。フロログルシンの場合は緑茶パックに優る非常に高い吸収性を示しており, これは今回調べたもののうち, 最も高いアルデヒドキャッチャー性能である。一方, 無処理のピーナッツ殻も, ブランクとして調べておく必要がある。半立の殻は, 驚くべきことにほぼ緑茶パック並の顕著な吸収性を示し, フロログ

ルシンの場合と比較しても 70~80%の効果であった。この、予想外の結果を確かめるため、他のピーナツ商品についても測定を行った。千葉県産品種不明ピーナツ殻および中国産ピーナツ殻を半立のものと比較した結果、程度の差は見られるが、いずれも顕著なホルムアルデヒドキャッチャー能を示していることが明らかになった。なかでも千葉県産、半立が最も高い効果を示していることは興味深い。

このように、ピーナツ殻にはアルデヒドキャッチャーの担体として、予想通りの性能を示したばかりでなく、それ自体優れたキャッチャー性能を示した。おそらく、殻にもポリフェノール成分が含まれているのであろう。キャッチャー能

に限って云えば、フロログルシン含浸殻が最も効果が高いが、人工化学物質の使用を極力避ける立場からはもちろん、省力、省エネルギー、コスト、の点からも、無処理のピーナツ殻の意義は大きい。最も簡単な用法は、殻を通気性の袋に入れるなどして発生源、たとえば、家具の内部に置くことである。しかし、工夫次第で、パネル状に整え、パーティションとして使用できると思われ、室全体のアルデヒド軽減が期待できる。いま一つ注目すべきは、使用済キャッチャー材の処理についても、土壌改良剤としての利用、炭化して吸着剤とする、焼却処分などが考えられる。いずれも、特段の注意を要するものは無く、エネルギーの投入も最小限で済むことがあげられる。