

Table 25. エチルベンゼンの経口投与の吸入暴露への換算式による変換および検証

経口投与用量	吸入暴露濃度 への変換 (A)	AUC による検証		血液中濃度の最高値による検証	
		相当吸入暴露 濃度 (B)	A/B	相当吸入暴露 濃度 (C)	A/C
25mg/kg 群	29ppm	28ppm	1.04	31ppm	0.94
50mg/kg 群	57ppm	76ppm	0.75	95ppm	0.60
100mg/kg 群	114ppm	292ppm	0.39	190ppm	0.60
200mg/kg 群	228ppm	524ppm	0.44	406ppm	0.56

(A) 換算式により得た暴露濃度

(B) 経口投与用量に相当する AUC 値となる吸入暴露濃度

(C) 経口投与用量に相当する血液中濃度の最大値となる吸入暴露濃度

A/B : 換算式により得た吸入暴露濃度 / 経口投与用量に相当する AUC 値となる吸入暴露濃度

A/C : 換算式により得た吸入暴露濃度 / 経口投与用量に相当する血液中濃度の最大値となる吸入暴露濃度

Table 26. トルエンとエチルベンゼンの比較 (AUC)

		AUC (μg・分 / mL) *1	
		トルエン	エチルベンゼン
吸入暴露	25ppm	159	163
	50ppm	505	288
	100ppm	2419	685
	200ppm	4474	1433
経口投与	25mg/kg 体重	288	156
	50mg/kg 体重	457	509
	100mg/kg 体重	1399	1623
	200mg/kg 体重	3561	3818

*1 : 540 分間 (投与開始から血液中濃度測定終了までの時間) における AUC

Table 27. トルエンとエチルベンゼンの比較
(経口投与の吸入暴露への換算式による変換および AUC による検証)

経口投与用 量	トルエン			エチルベンゼン		
	AUC による検証			AUC による検証		
	吸入暴露濃度 への変換 (A)	相当吸入暴露 濃度 (B)	A/B	吸入暴露濃度 への変換 (A)	相当吸入暴露 濃度 (B)	A/B
25mg/kg 群	32ppm	35ppm	0.91	29ppm	28ppm	1.04
50mg/kg 群	65ppm	45ppm	1.44	57ppm	76ppm	0.75
100mg/kg 群	129ppm	75ppm	1.72	114ppm	292ppm	0.39
200mg/kg 群	258ppm	155ppm	1.66	228ppm	524ppm	0.44

(A) 換算式により得た暴露濃度

(B) 経口投与用量に相当する AUC 値となる吸入暴露濃度

A/B : 換算式により得た吸入暴露濃度 / 経口投与用量に相当する AUC 値となる吸入暴露濃度

Table 28. トルエンとエチルベンゼンの比較(吸入暴露での吸収率の推定)

暴露濃度	トルエン	エチルベンゼン
25ppm	20%	40%
50ppm	29%	38%
100ppm	62%	25%
200ppm	59%	22%

Table 29. トルエンとエチルベンゼンの比較(経口投与での吸収率の推定)

投与用量	トルエン	エチルベンゼン
25 mg /kg 体重	28%	34%
50 mg /kg 体重	19%	60%
100 mg /kg 体重	27%	49%
200 mg /kg 体重	38%	51%

付表 1 呼気のトルエン分析における GC/MS の分析条件

Operating conditions for GC/MS analysis	
GC	HP 5890 Series II
Column	EQITY-5, 60 m × 0.25 mm id, 1 μm film
Column temp.	70°C → 70°C $\xrightarrow{2\text{min}}$ $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 230°C $\xrightarrow{5\text{min}}$ 230°C
Injection temp.	250°C
MS	HP 5972
Ionization method	EI
Ion source temp.	280 °C
Ionizing voltage	70 eV
Emission current	300 μA
Quantitation	selected-ion monitoring, m/z 91

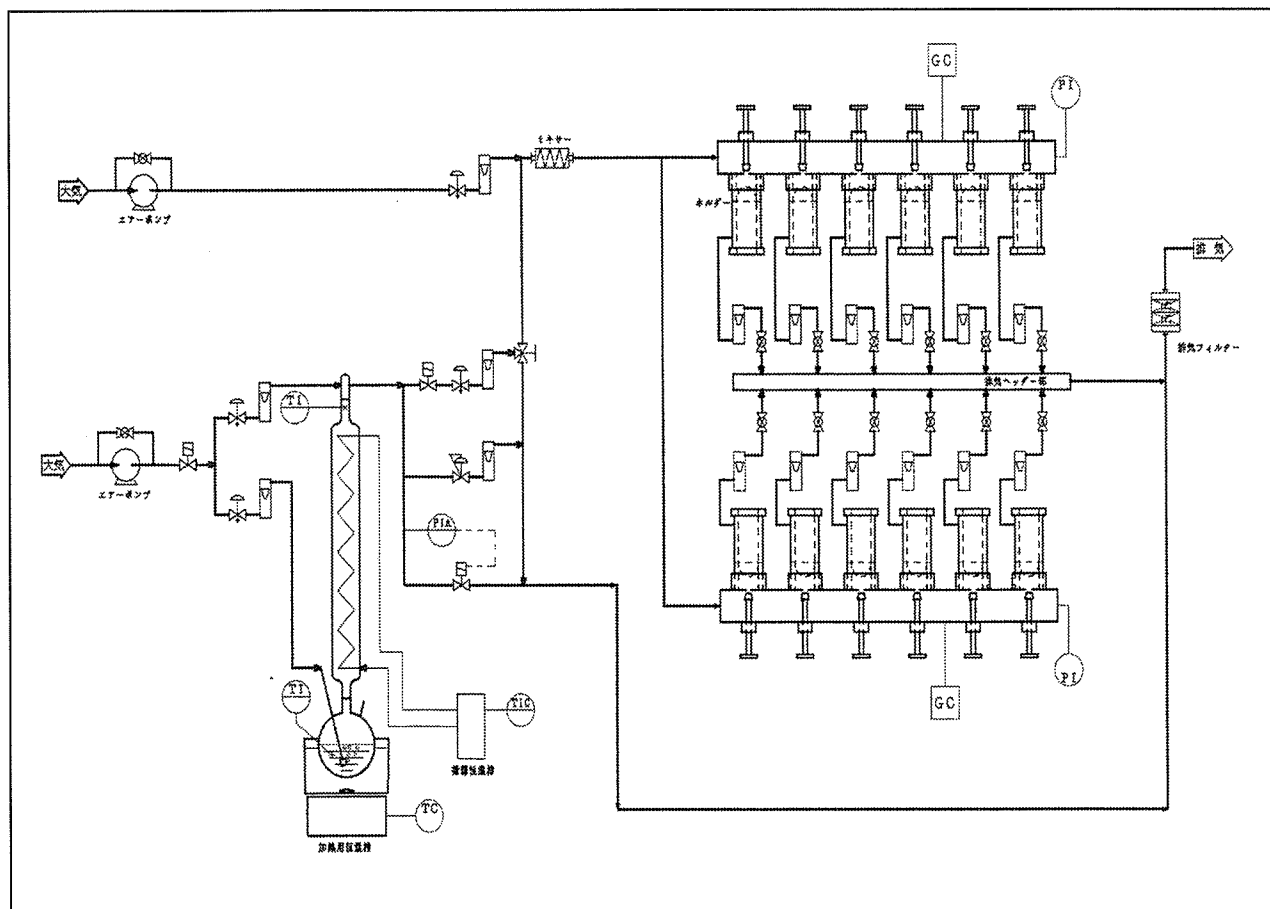


Figure 1. 吸入曝露装置

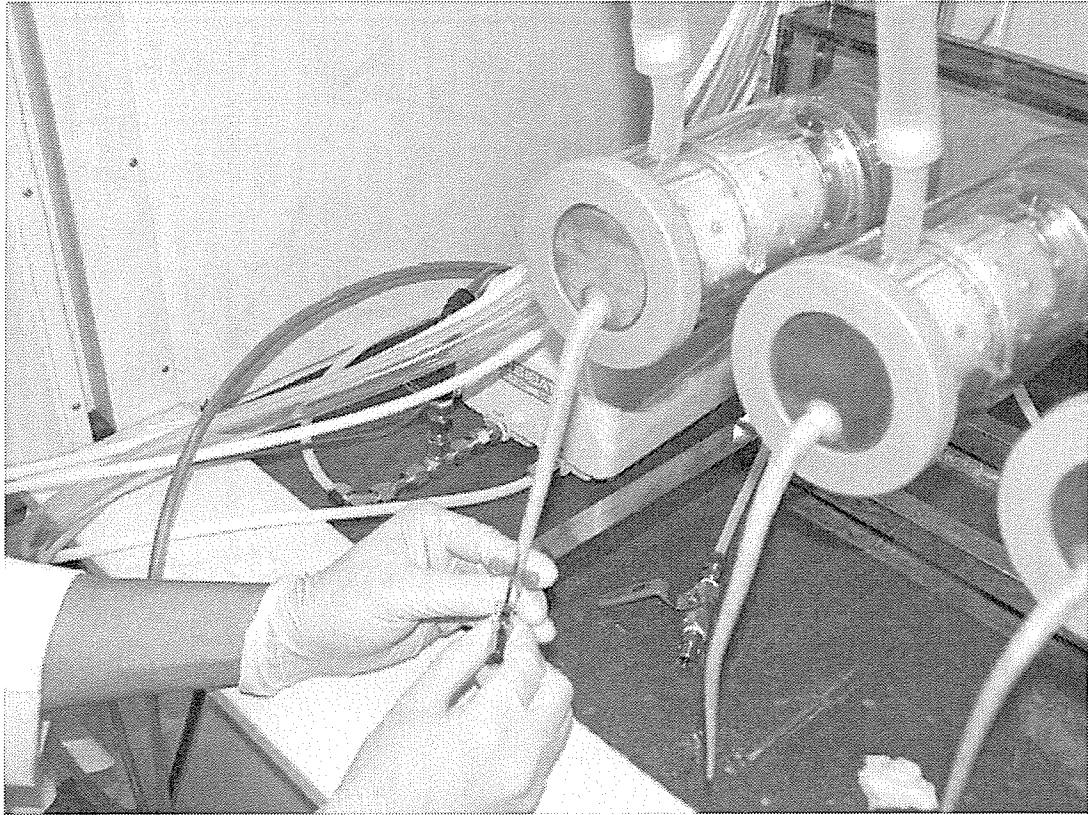


Figure 2. 吸入曝露中のラットからの採血

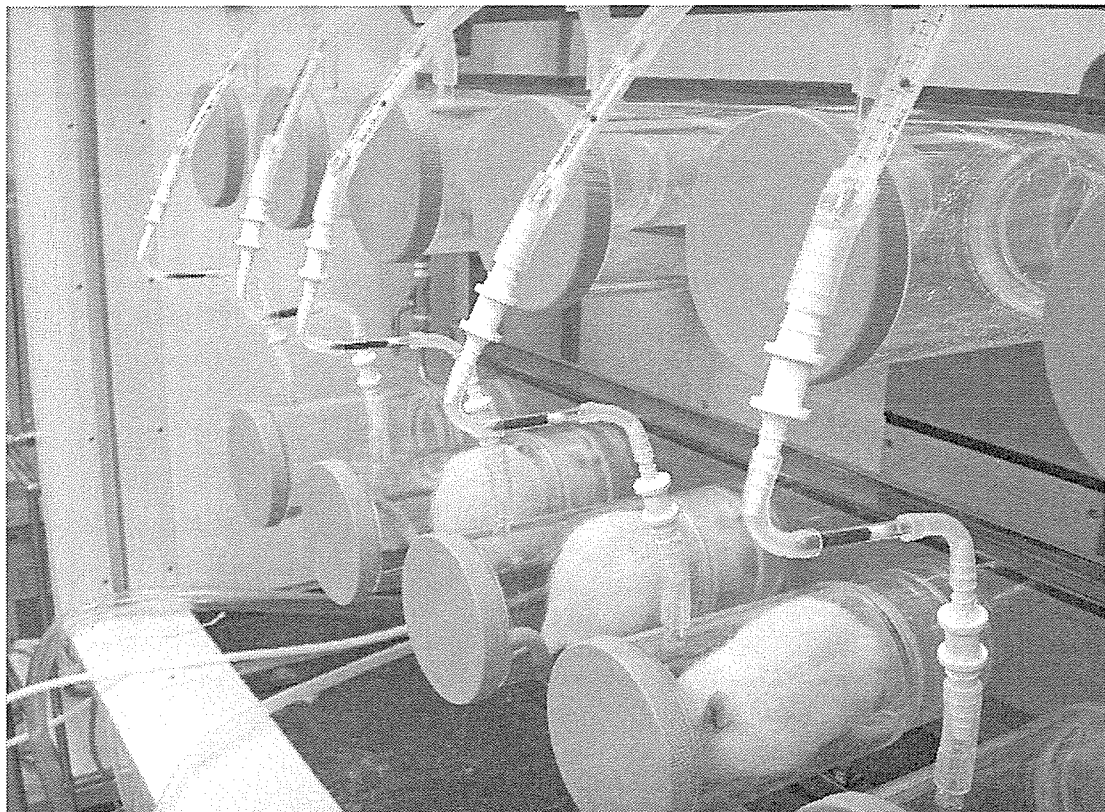


Figure 3. 化学物質の呼気からの排泄量を測定する装置

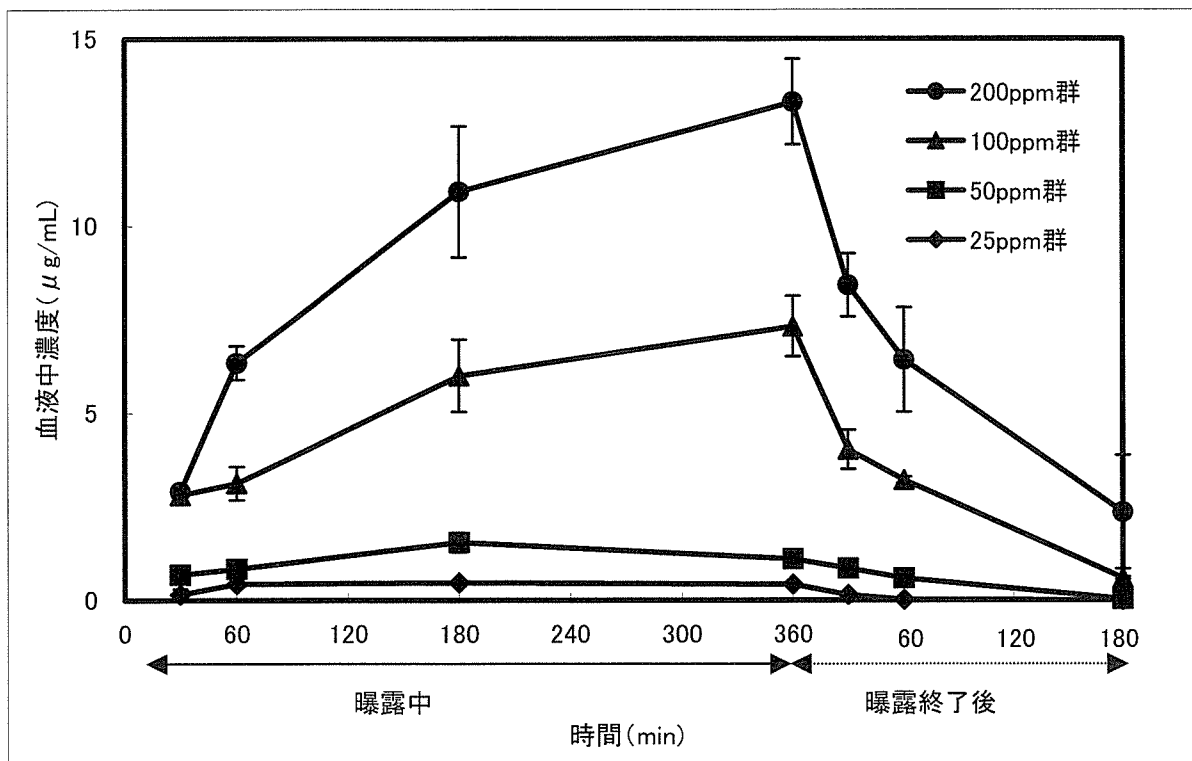


Figure 4. トルエンの血液中濃度(吸入曝露群)

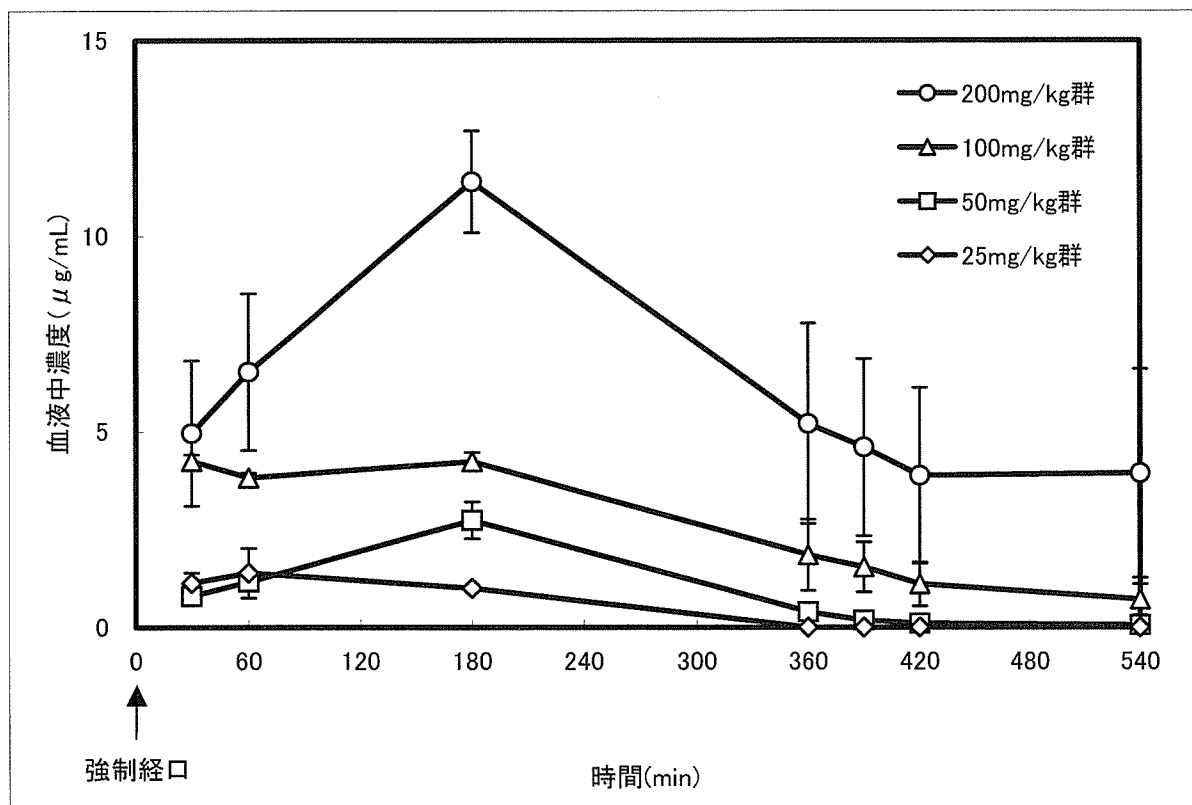


Figure 5. トルエンの血液中濃度(経口投与群)

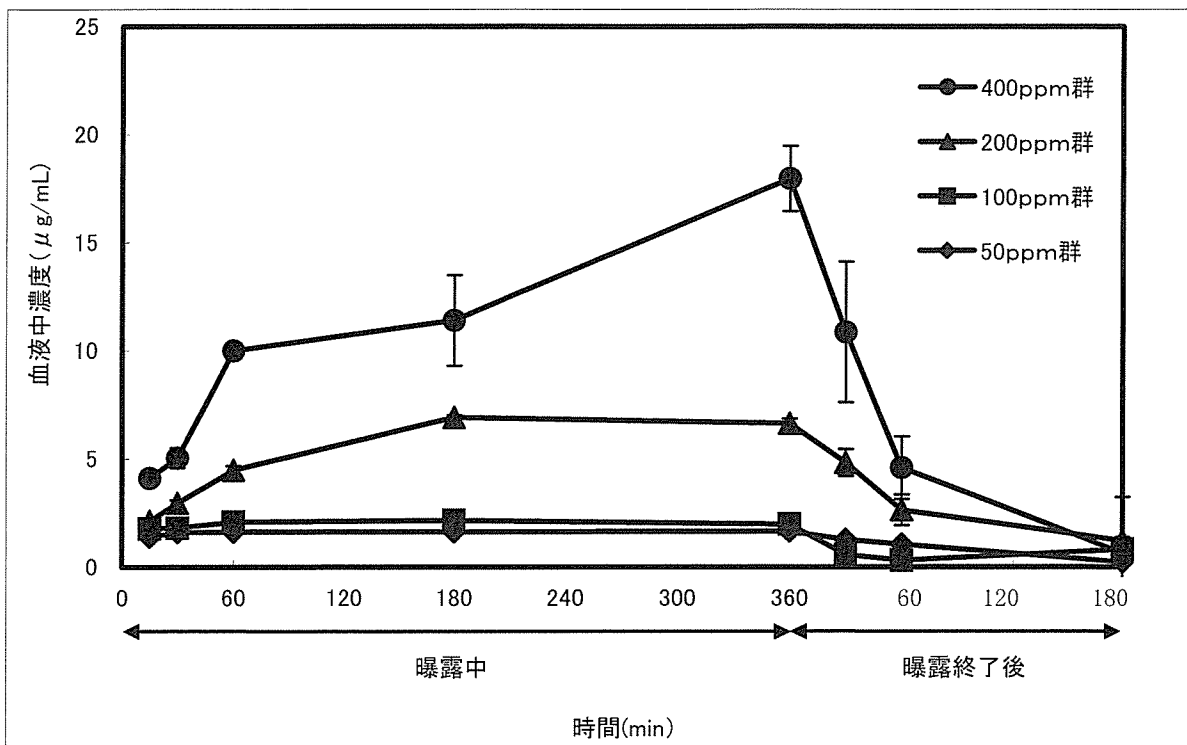


Figure 6. クロロホルムを吸入曝露したラットの血液中クロロホルム濃度の推移

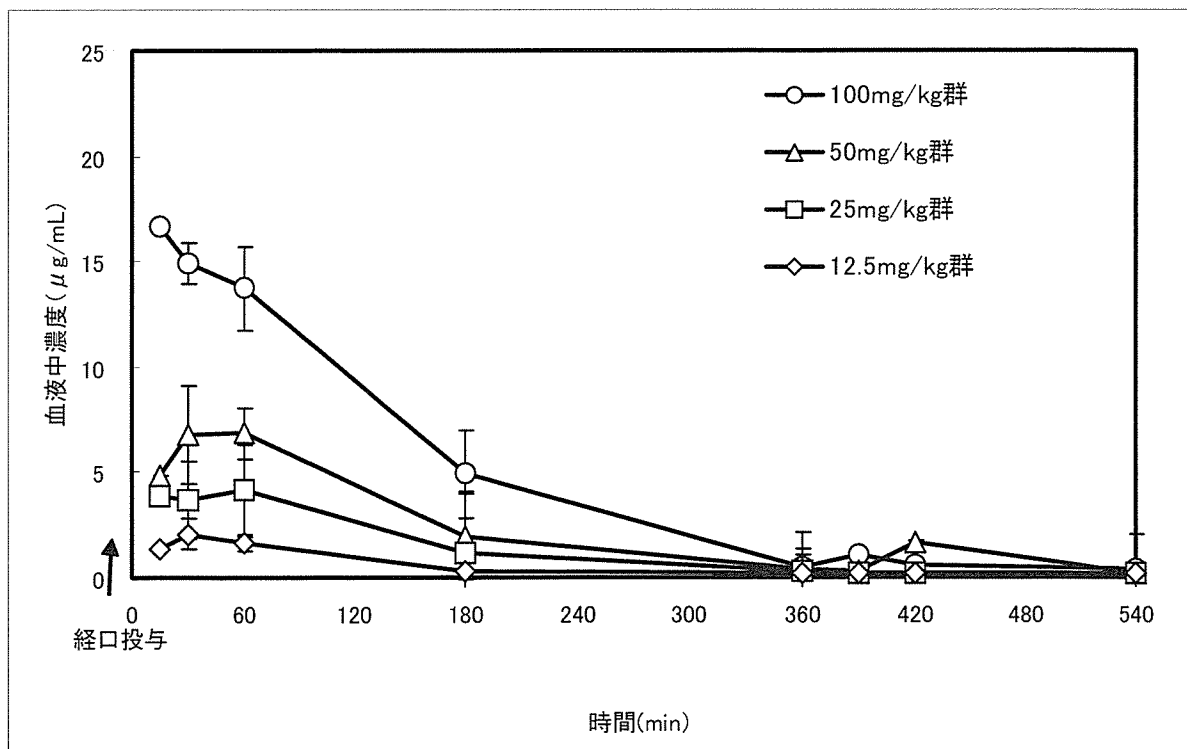


Figure 7. クロロホルムを経口投与したラットの血液中クロロホルム濃度の推移

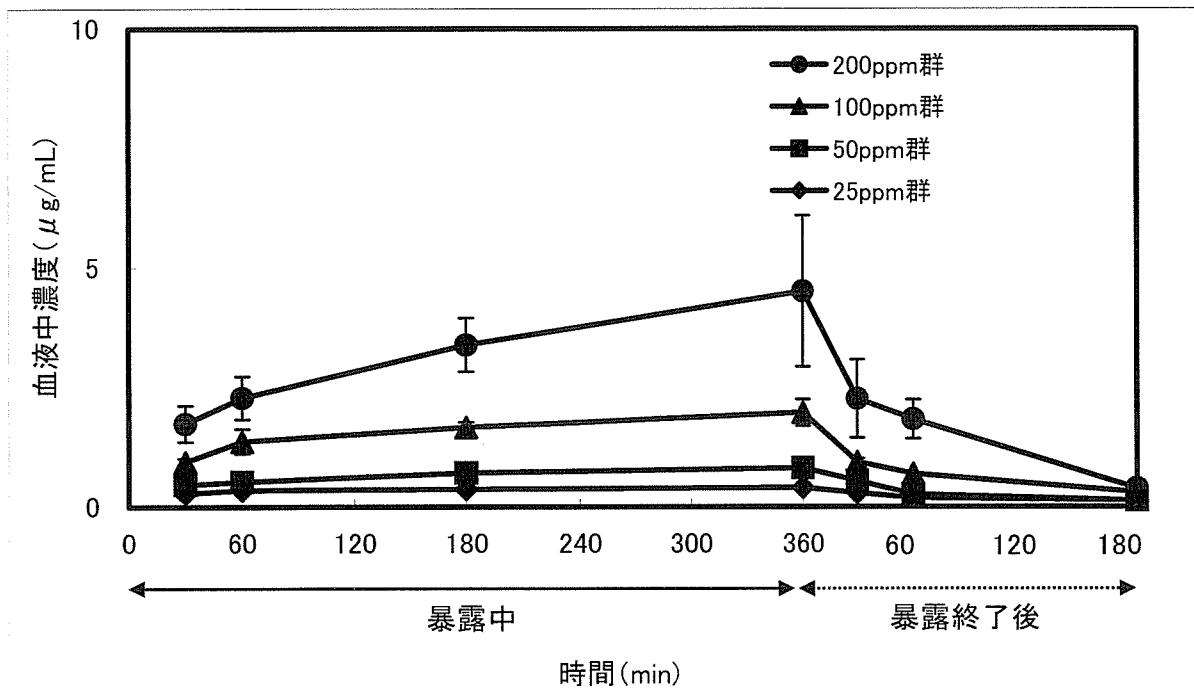


Figure 8. エチルベンゼンを吸入暴露したラットの血液中エチルベンゼン濃度の推移

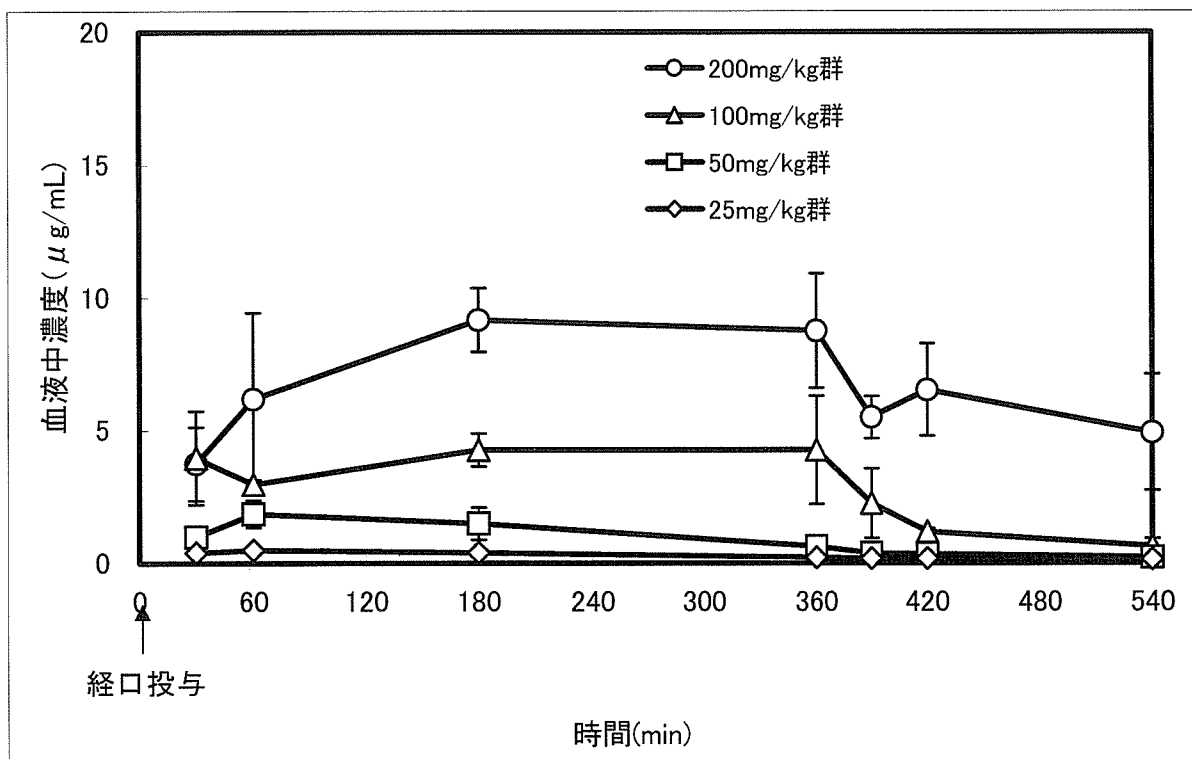


Figure 9 エチルベンゼンを経口投与したラットの血液中エチルベンゼン濃度の推移

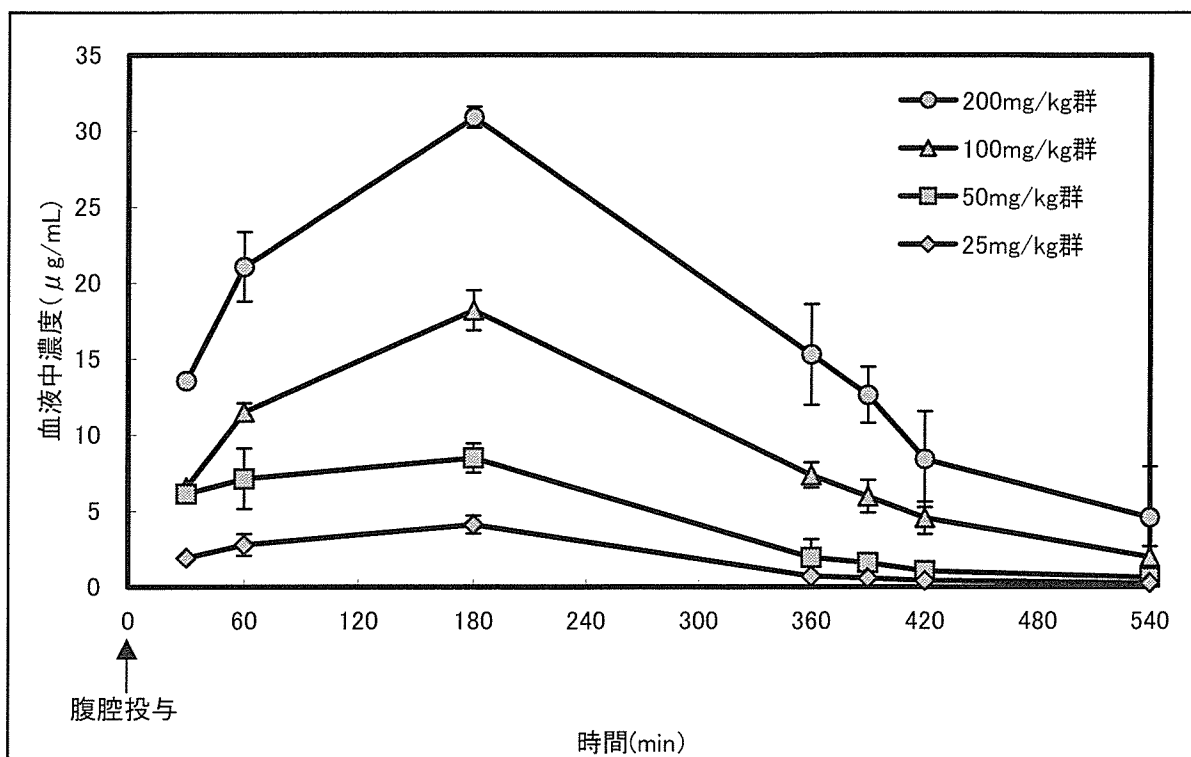


Figure 10. トルエンを腹腔内投与したラットの血液中トルエン濃度の推移

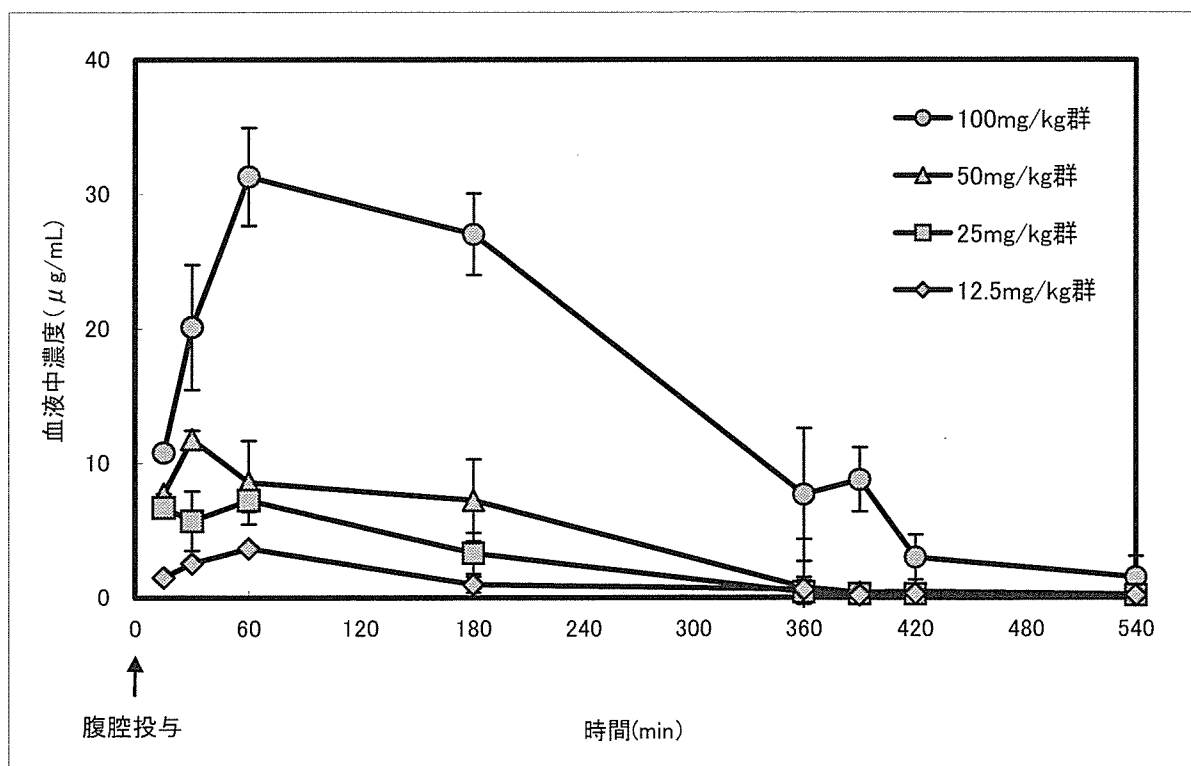


Figure 11. クロロホルムを腹腔内投与したラットの血液中クロロホルム濃度の推移

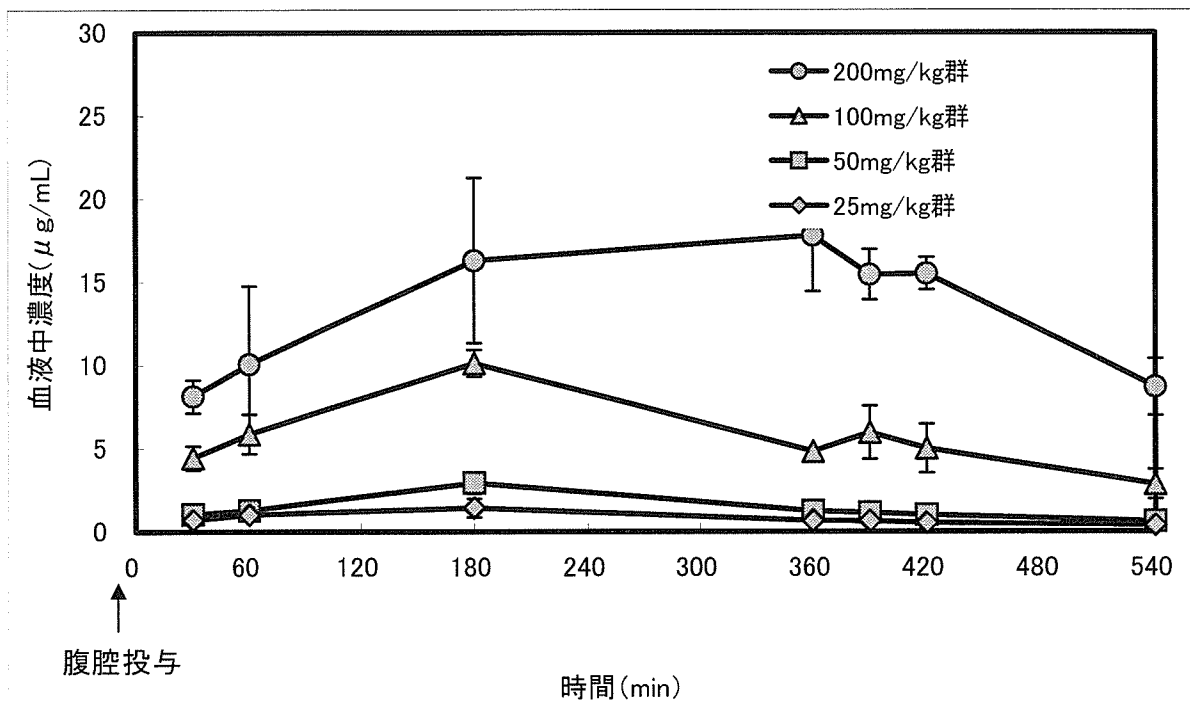


Figure 12. エチルベンゼンを腹腔内投与したラットの血液中エチルベンゼン濃度の推移

Ⅲ－１．２．低濃度アセトアルデヒド経気道曝露による生体影響評価

分担研究者 嵐谷 奎一 産業医科大学 産業保健学部 教授
研究協力者 樺田 尚樹 産業医科大学 産業保健学部 助教授
吉田 安宏 産業医科大学 医学部 講師

研究要旨：化学物質過敏症の原因物質のひとつとして懸念されているホルムアルデヒド同様にアルデヒド類の一種で人体への曝露も比較的大きいと予想されるアセトアルデヒドの実験動物を用いての生体影響について検討した。マウスに25ppm、125ppmあるいは500ppm濃度で連続4週間の曝露実験を実施した。その結果、免疫学的パラメータにおいては、Tリンパ球系の増殖刺激を受けている可能性が示唆された。またアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体測定や変異原性試験においては、アルデヒド脱水素酵素活性欠損者モデルの *Aldh2* ノックアウトマウスにおいて高い感受性が認められた。

A. 研究目的

近年我々の生活環境中の化学物質の種類増加は著しい。さらにオフィスや住宅の建材の変化・気密性の増加なども加わり、種々の症状を訴える人が増加し、シックビルディング症候群あるいは化学物質過敏症（以下MCS）という概念が提唱され、その対応が緊急に迫られている。一方でMCSに関しては概念・病態は解明されておらず、定義もいくつもあるなどコンセンサスが得られていない部分が多く問題が残されている。

ホルムアルデヒドの発生源、MCS への関与などの指摘より代替物質としてのアセトアルデヒドの使用増加が懸念される。アセトアルデヒドはラットの経気道曝露による鼻腔臭覚上皮への影響を考慮して室内濃度指針値30ppbが設定されている。このような状況下で本研究ではアセトアルデヒドについて経気道曝露実験系を確立し、その生態影響を評価することを実施した。

B. 研究方法

（１）吸入曝露装置

アセトアルデヒドガスの発生には、当初ディフュージョンチューブ法（ガス拡散管法）を用いた動的ガス発生法によったが、曝露開始時に濃度調整がやや不安定な時間があるため、発生装置を改良し特殊なメンテナンスをほとんど必要とせず安定した曝露を実施できる圧力容器による発生法を完成した（図1,2）。

（２）実験動物、曝露濃度

実験に用いた動物は、最初の2年間はC57BL/6マウスを、最終年度は生体内における主たるアセトアルデヒドの代謝酵素であるアルデヒド脱水素酵素ALDH2活性を有する *Aldh2*^{+/+}マウスおよび、その遺伝子をノックアウトした *Aldh2*^{-/-}マウスを使用した。このノックアウトマウスはわれわれの研究機関で作成し、繁殖維持している（FEBS Lett, 476, 306-311, 2000）。

曝露条件は、2~3日に一度動物および曝露装置の維持管理のために数時間の中断を置く以外は一日24時間、4週間の連続曝露とし、濃度は0ppm、25ppm、125ppmあるいは500ppmとした(図2)。

(3) バイオロジカルモニタリング

生体内曝露指標としてアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体を測定することを試みた。すなわちヘパリン加採血赤血球を蒸留水を加え溶血し、Cyclohexan-1,3-dioneを含む反応試薬と反応させ誘導体を形成し、HPLCで分離・定量した。

(4) 変異原性試験

脾臓Tリンパ球を採取し、フローサイトメーター(FACS)を用いて*T cell receptor (TCR)*遺伝子の突然変異頻度を、また末梢血網状赤血球中小核頻度を解析した。

(5) 免疫学的検索

①脾細胞数、FACSを用いた細胞分画の比較、②リンパ球マイトジェンLPS, ConAで刺激培養した際の細胞増殖試験、③サイトカイン類の測定を実施した。

その他病理学的検索を実施した。

(倫理面への配慮)

本実験は、産業医科大学動物実験及び飼育倫理委員会による審査・承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. 曝露濃度および体重変化：曝露法を改良したことにより非常に安定した曝露が実施できた(図2)。各群の体重を計測観察した結果、ALDH2活性を有する野生型マウスでは体重増加が観察されたが、

Aldh2^{-/-}マウスでは500ppm曝露により体重減少が認められた。

2. バイオロジカルモニタリング：アセトアルデヒド曝露により両系統マウスとも濃度依存的に有意な付加体の増加を認め、特に*Aldh2*^{-/-}マウスにおいて顕著であり、*Aldh2*^{+/+}マウス比で有意に高値であった(図3)。

3. 変異原性試験：小核頻度および*TCR*遺伝子座突然変異頻度ともに*Aldh2*^{+/+}マウスにおいては500ppm曝露においても有意な増加を認めなかったが、*Aldh2*^{-/-}マウスにおいては濃度依存的に有意な増加を認めた(図4,5)。

4. 免疫学的検索：

①脾細胞数・細胞分画：各群マウスの個体あたりの脾細胞数の相違は、認めなかった。脾細胞中の細胞分画をFACSにて解析した結果、大きな変化は認めなかった。

②細胞増殖：マイトジェン刺激したときの細胞増殖をStimulation indexで比較した。LPS刺激では、アセトアルデヒド曝露群においてもコントロール群と差異は認めなかったが、ConA刺激に際しては、アセトアルデヒドの曝露濃度依存的に細胞増殖の増大が観察された(図6)。

③サイトカイン類の測定

脾細胞をLPS刺激した培養上清中のIL-6濃度、あるいは各群マウスの肺胞洗浄液中の各サイトカイン濃度は、特に相違を認めなかった。

5. 病理学的検索：頭部鼻腔組織に関して、一般に鼻腔上方は一部を嗅上皮、下方を扁平上皮、呼吸上皮で覆われている。野生型マウスにおいて125ppm曝露群においてもこれら組織において上皮のびらん、出血、変性像などの明らかな変化は認められなかった。

D. 考察

アセトアルデヒドの人への健康影響としては、飲酒時のいわゆる二日酔いの原因物質の一つとして知られる。また蒸気は目、鼻、のどに刺激がある。目に侵入すると結膜炎や目のかすみを起こす。長期間の直接接触により発赤、皮膚炎を起こすことがある。高濃度蒸気の吸入による中毒症状として、麻酔作用、意識混濁、気管支炎、肺浮腫等があり、初期症状は慢性アルコール中毒に似ている。また日本人を含む東洋人の約半数においては生体内においてアセトアルデヒドを主に代謝するアルデヒド脱水素酵素活性を欠損していることが知られている。

曝露系は、初年度、10ppm 前後の低濃度アセトアルデヒドの吸入曝露実験系を確立した。初年度の方法を改良して次年度は 25ppm、125ppm の濃度にてマウス経気道曝露を実施し、変異原性試験、免疫学的パラメーターの変化、病理学的変化の有無などについて包括的に観察し、生体影響を検討した。

その結果、この程度の曝露濃度・曝露期間では、病理学的に明らかな悪影響を思わせる変化は認めなかった。また赤血球中のアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度は、25ppm、125ppm、どちらの曝露も増加が観察されなかった。さらに 125ppm 曝露を行っても、TCR 遺伝子座突然変異の検出系では突然変異の増加は観察されなかった。今回の実験結果のように比較的low濃度曝露では、生体内代謝が早いので、ヘモグロビン付加体や変異原性が観察可能なほど血中濃度が高値を維持しないことが示唆された。

一方アセトアルデヒドは *in vitro* の実験系では種々の変異原性試験において陽性結果も得られ、さらに *in vivo* における小核試験などでも陽性所見が報告されている。国際がん研究機関 (IARC) の分類では 2B (人に対して発がん性があるかもしれない) に分類され

ている。また前述のように遺伝子多型により日本人の約半数においてはアルデヒド脱水素酵素活性を欠損している。これらの人においてはアセトアルデヒドに対して高感受性を示す可能性が懸念される。そこで最終年度においてはアルデヒド脱水素酵素活性欠損のモデルマウスを導入して実験した。その結果、ヘモグロビン付加体、各種変異原性試験いずれにおいても *Aldh2*^{-/-}マウスにおいては高感受性を示すことが確認された。

また、免疫学的パラメータに関しては、マイトジェン刺激に伴う細胞増殖の増強などの変化が観察された。特に T リンパ球系のマイトジェンである ConA 刺激に関しては明らかな増殖能の増加が認められた。各種サイトカインに関しては変化は認められなかったが、この程度の濃度のアセトアルデヒドの経気道曝露で免疫系のパラメータが変化することは興味深いことであり、今後さらに検討が必要と思われる。

E. 結論

アセトアルデヒドの曝露実験系を確立し、マウスに連続4週間の曝露実験を実施した。その結果、その結果、アセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体や変異原性試験において、野生型マウスに比べ高感受性を認めた。一方、免疫学的パラメータにおいては、特にTリンパ球系の増殖刺激を受けている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

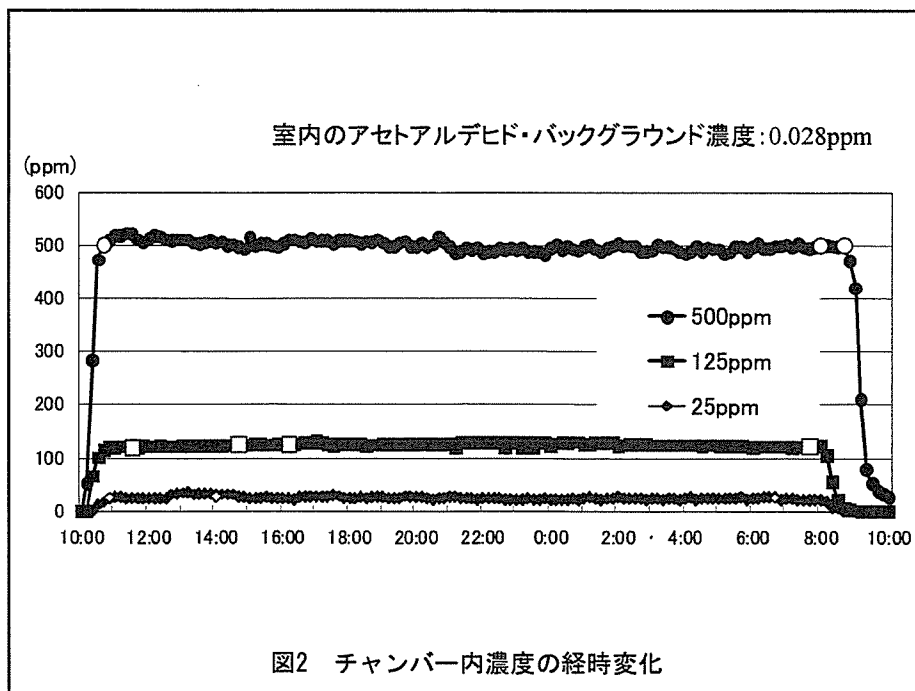
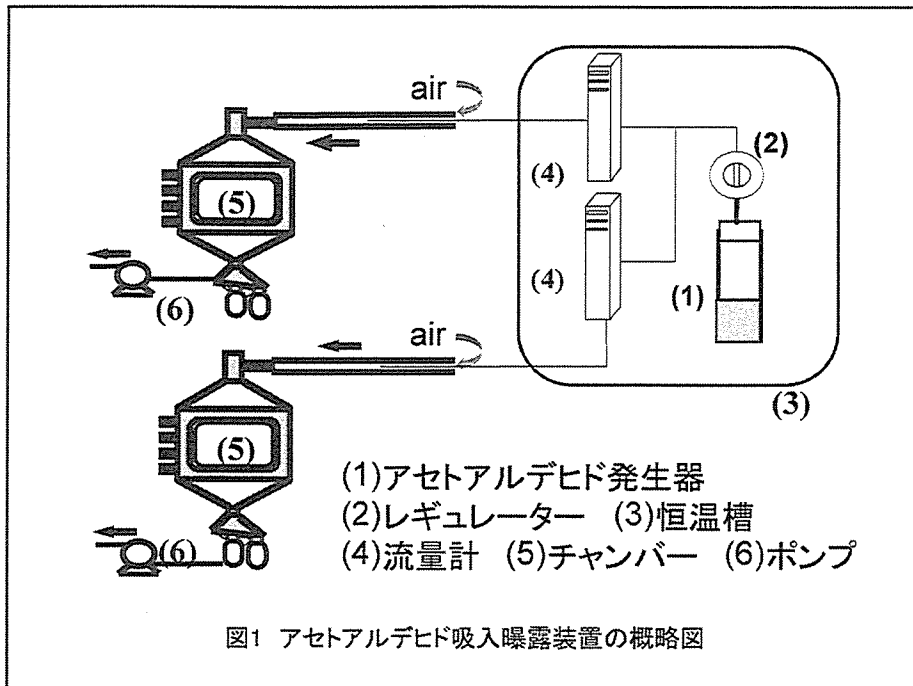
2. 学会発表

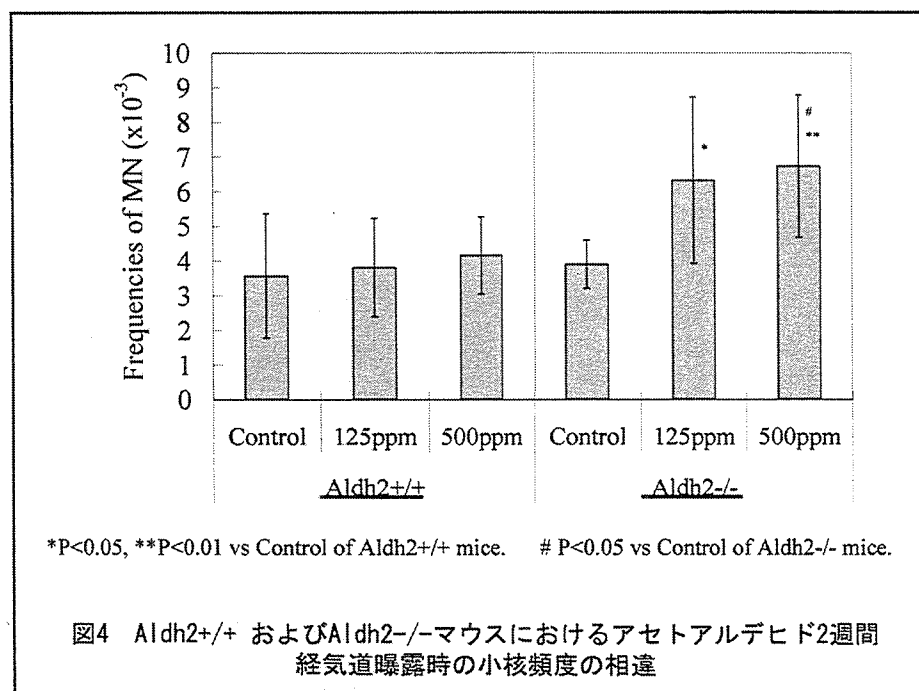
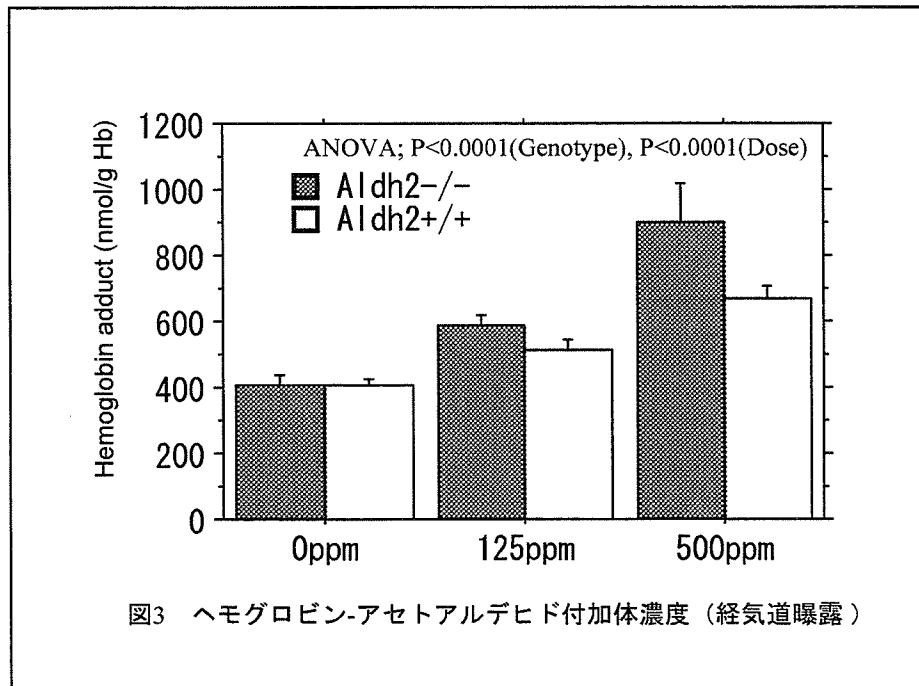
- ・影響マーカーと産業保健、櫻田尚樹、第79回日本産業衛生学会・研究会シンポジウム (仙台)、2006
- ・低濃度アセトアルデヒド経気道曝露に

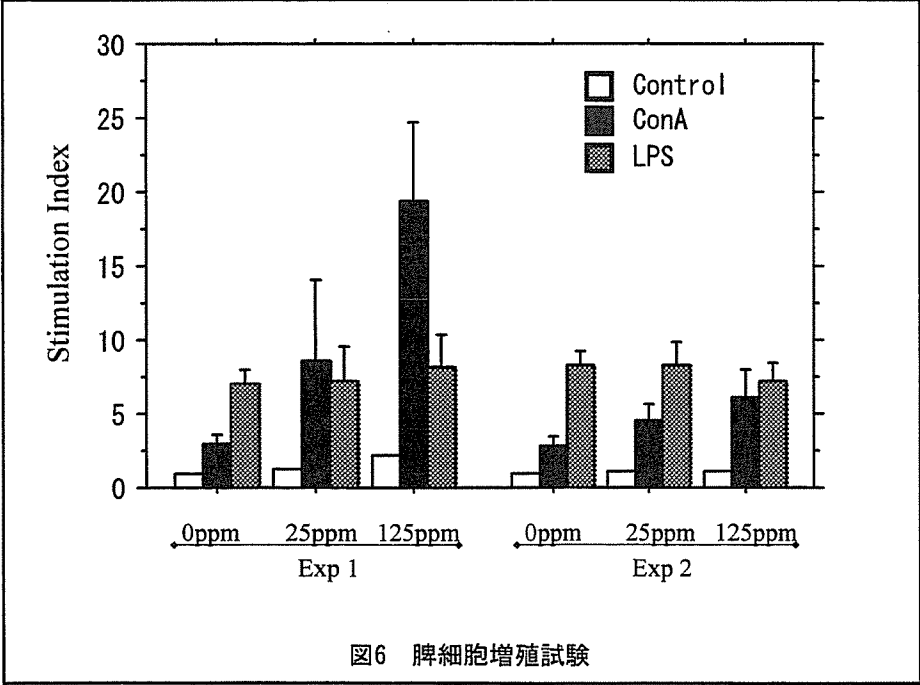
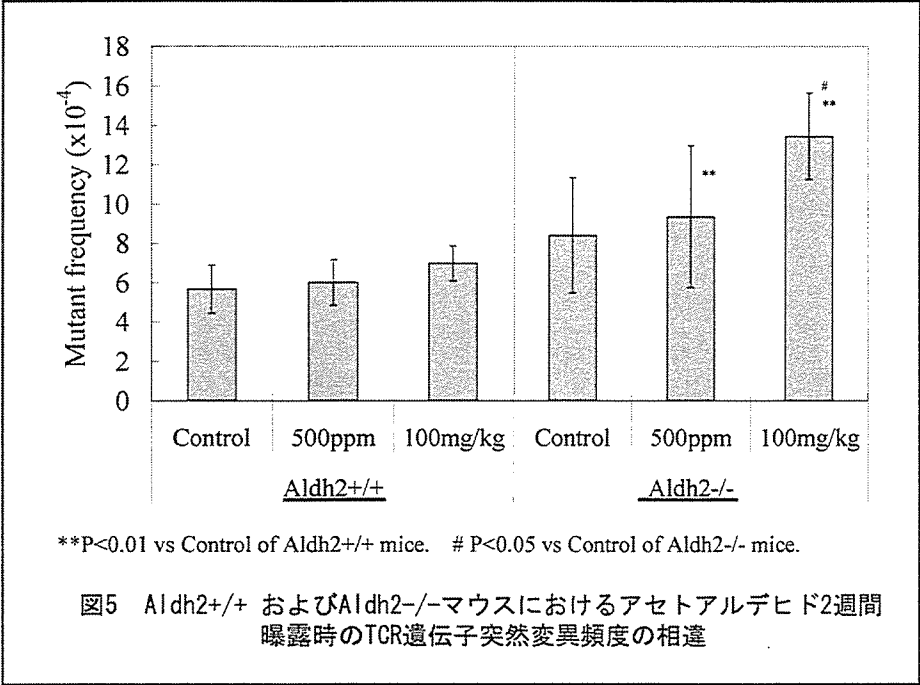
- よる生体影響評価、樺田尚樹，河野亮，
吉田安宏，安藤正典，嵐谷奎一、第47
回大気環境学会年会（東京）、2006
- ・マウスを用いたアセトアルデヒド経気
道曝露による生体影響、河野亮，嵐谷
奎一，樺田尚樹，吉田安宏，安藤正典、
第24回産業医科大学学会（北九州）、
2006

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし







Ⅲ－２． １． 家庭用品中化学物質による過敏症の発現機構に関する研究

分担研究者 安藤 正典 武蔵野大学 薬学部 薬学研究所 環境化学研究室 教授
協力研究者 大河原 晋 武蔵野大学 薬学部 薬学研究所 環境化学研究室 助手
神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 第一室長
香川 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 協力研究員

研究要旨 NMDA 受容体のサブタイプの一つである NR1splice variants を高感度かつ迅速に分別定量するために、SYBR Green リアルタイム PCR を用いた定量法の開発を行った。その結果、variant 特異的プライマーと定量用スタンダードの組み合わせの場合のみ指数関数的に増幅する蛍光シグナルが確認された。また、その PCR 反応溶液をアガロース電気泳動により確認したところ、目的とする長さのバンドが確認でき、非特異的なバンドは検出されなかった。さらに、PCR 反応終了後に融解曲線分析を行なったところ、単一のピークが確認できた。これらの結果から、構築したプライマーによって N 末領域ならびに C 末領域の NR1 splice variant を少なくとも 500 倍の選択性で識別できることが明らかとなった。

A. 研究目的

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体は、学習や記憶など中枢系の本質的な機能に対して重要な役割を引き起こす。近年、本態性多種化学物質過敏症の発症機序のひとつとして化学物質によるこの受容体の活性化が指摘された。従って、この受容体を指標とした迅速かつ簡便な定量法の開発は家庭用品から排出される化学物質のリスクを評価する上で重要であると考えられる。そこで今回、NMDA 受容体のサブタイプである NR1 splice variant の SYBR Green リアルタイム PCR による分別定量法の開発を行った。

B. 研究方法

1. 定量用プラスミドの構築

マウス海馬由来 totalRNA から、逆転写反応により cDNA を合成した。NR1 遺伝子の N 末と C 末領域を増幅させるプライマーを用いて

PCR 法により 8 種の splice variants に相当するフラグメントを増幅した。各フラグメントを pCR4-TOPO ベクターにサブクローニングし、塩基配列を確認した後に、定量用のスタンダードとして用いた。それぞれのリアルタイム PCR による mRNA 発現量の定量には SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いた。

2. 老化促進モデルマウスの脳各部位における NR1-splice variant mRNA の相対定量

5 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP8 の脳から、海馬、大脳皮質、小脳、嗅球および視床/視床下部の 5 つの部位を摘出した。各部位より精製した total RNA を用い逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA を適宜希釈し、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 存在下にてリアルタイム PCR を行い、定量用プラスミドを用いて作成した検量線から mRNA 発現量の定量

を行った。得られた定量結果は Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (Applied Biosystems 社) を用いた 18S ribosomal RNA の発現量で補正した。

C. 研究結果および考察

C 末側 4 種および N 末側 2 種の variant に特異的な領域約 100 bp を増幅させるプライマーを設計し(Fig.1, Table.1)、定量用スタンダードを鋳型としてリアルタイム PCR を行った。その結果、variant 特異的プライマーと定量用スタンダードの組み合わせの場合のみ指数関数的に増幅する蛍光シグナルが確認された。また、その PCR 反応溶液をアガロース電気泳動により確認したところ、目的とする長さのバンドが確認でき、非特異的なバンドは検出されなかった。さらに、PCR 反応終了後に、融解曲線分析を行なったところ、単一のピークが確認できた(Fig.2,3)。これらの結果から、構築したプライマーによって N 末領域ならびに C 末領域の NR1 splice variant を少なくとも 500 倍の選択性で識別できることが明らかとなった。

次に、スタンダードを段階希釈して作成した検量線をもとに、SAMP8 および SAMR1 マウスの脳における NR1 splice variant の発現量を比較した(Fig.4)。その結果、いずれの variant の発現量にも有意な差は認められなかったことから、SAMP8 に出現する記憶・学習障害は NR1 splice variant の構成比の変化を伴わない可能性が示唆された。また、脳の各部位におけるこれら variant の発現量の割合は、今までに有効な定量法として報告されている Northern blot 法

および Competitive PCR 法とほぼ同じ定量結果が認められた。したがって、今回開発した SYBR Green Real-Time PCR 法は、従来の方法に比べ高感度かつ迅速に識別、定量できることが明らかとなった。

D. 結論

本研究において、さまざまな神経疾患の発現に重要な役割を果たす可能性が示されている NMDA Receptor の Splice Variant を高感度かつ迅速に識別、定量する方法を確立した。本分析法は、室内環境化学物質に起因する本態性多種化学物質過敏状態等の発症メカニズムを明らかにする上で有効な方法となると考えられる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) SYBR Green Real-Time PCR によるマウス NMDA 受容体 Splice Variants の分別定量 大河原 晋、神野 透人、香川(田中) 聡子、徳永 裕司、安藤 正典、フォーラム 2005 衛生薬学・環境トキシコロジー

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

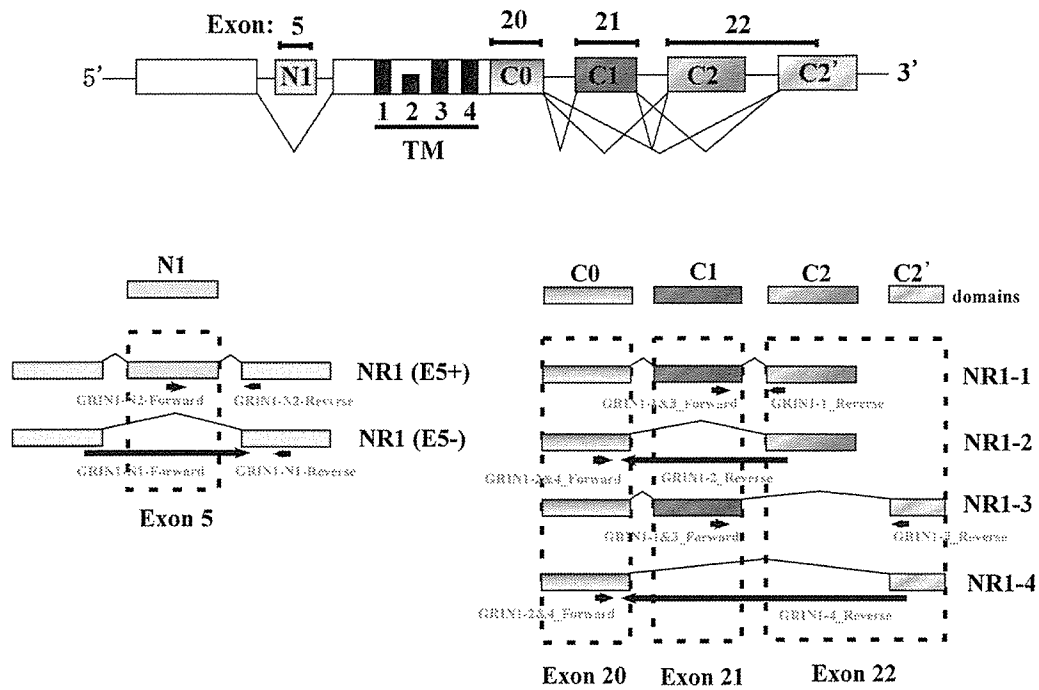


Fig.1 Location of primers specific for each splice variant in NR1 gene

Table 1 Primer sequences designed for each splice variant in NR1 gene

mRNA target	Primer name	Primer sequences	Amplicon size
mNR1-1	mGRIN1-1&3_Forward	5'-GATAGAAAAGAGTGGTAGAGCAGAGC-3'	122bp
	mGRIN1-1_Reverse	5'-ACCCCCGGTGCTCGTG-3'	
mNR1-2	mGRIN1-2&4_Forward	5'-CTGGGATCTTCCTCATTTTCATC-3'	123 bp
	mGRIN1-2_Reverse	5'-CCCCCGGTGCTCTGCA-3'	
mNR1-3	mGRIN1-1&3_Forward	5'-GATAGAAAAGAGTGGTAGAGCAGAGC-3'	126 bp
	mGRIN1-3_Reverse	5'-CAGTGGGATGGTACTGCCGTG-3'	
mNR1-4	mGRIN1-2&4_Forward	5'-CTGGGATCTTCCTCATTTTCATC-3'	128 bp
	mGRIN1-4_Reverse	5'-CAGTGGGATGGTACTGCTGC-3'	
NR1 E5(+)	GRIN1-N2-Forward GRIN1-N2-Reverse	5'-AACTATGAAAACCTCGACCAACTG-3' 5'-GGTCCCTGGGTCAAACCTGC-3'	102 bp
NR1 E5(-)	GRIN1-N1-Forward GRIN1-N1-Reverse	5'-GGAGCGTGAGTCCAAGGC-3' 5'-GGCAGAAAGGATGATGACCC-3'	117 bp

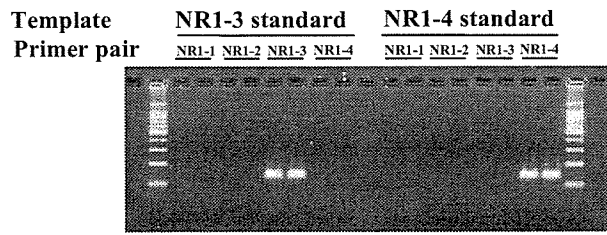
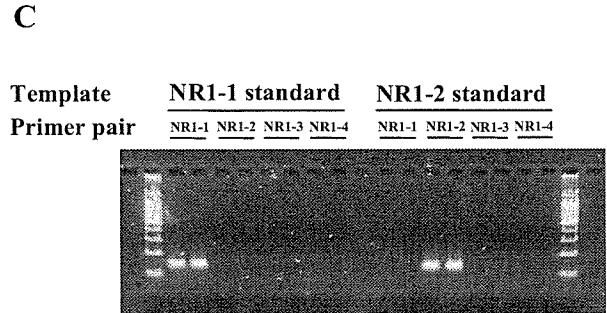
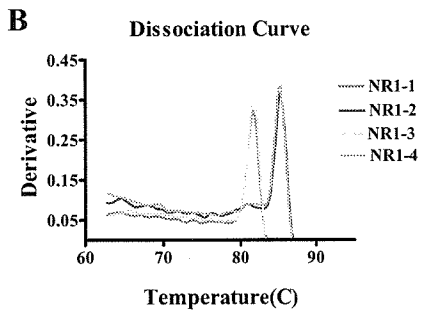
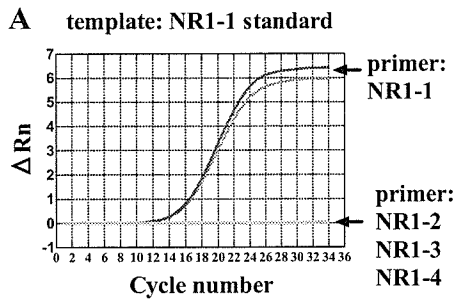


Fig 2 Specificity of real-time PCR primers. (A) Amplification plots of SYBR green real-time PCR for NR1 splice variants (NR1-1~4). **(B)** Melting curve analysis of SYBR Green real-time PCR product of NR1 splice variants (NR1-1~4) after 40 cycles. **(C)** Agarose gel electrophoresis of SYBR Green real-time PCR product of NR1 splice variants (NR1-1~4) after 40 cycles.

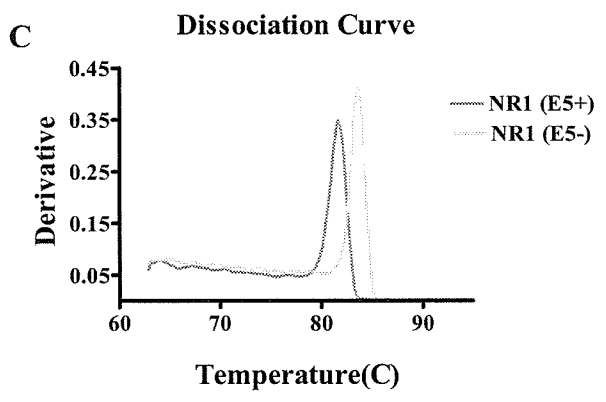
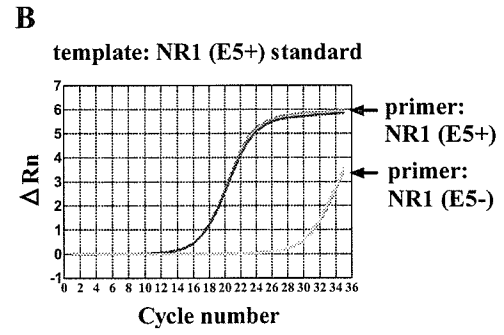
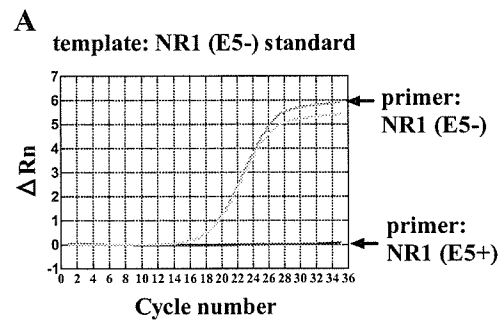


Fig 3 Specificity of real-time PCR primers. (A) Fluorescent data showing specificity of real-time PCR for NR1(E5-). **(B)** Fluorescent data showing specificity of real-time PCR for NR1(E5+). **(C)** Melting curve analysis of SYBR Green real-time PCR product of NR1 splice variants (NR1(E5-), NR1(E5+)) after 40 cycles.