

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590752

研究課題名(和文) 室内環境汚染物質 2-エチル-1-ヘキサノールによる鼻のシックハウス症状の解明

研究課題名(英文) Clarification of sick building syndrome of a nose by indoor air pollutant  
2-ethyl-1-hexanol

研究代表者

三宅 美緒 (Miyake, Mio)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80128610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：2-エチル-1-ヘキサノール(2EH)はシックビル症候群の原因である揮発性有機化合物の一つであり、におい刺激と関連がある。本研究は、2EHの亜慢性吸入による嗅覚系、特に鼻腔の嗅上皮と嗅球に及ぼす組織病理学的変化を明確化することを目的とした。

2EH吸入は、曝露1週間と3カ月後に嗅上皮の炎症、変性、壊死、落屑、再生を引き起こし、さらに、3カ月曝露は嗅神経の投射先である嗅球に組織学的な変化をもたらした。これらの変化は、2EHによるシックビル症候群に関連しているかもしれない。

研究成果の概要(英文)：2-ethyl-1-hexanol (2E1H) is reported to be one of the causative VOCs of sick building syndrome(SBS) and be associated with increased sense of smell. The goal of this investigation is to clarify histopathological changes due to subchronic inhalation exposure to 2E1H on the olfactory system, especially olfactory epithelium (OE) of the nasal cavity and the olfactory bulb (OB). Male ICR mice were exposed to 0, 20, 60, or 150 ppm of 2E1H, 8 hours per day, for continuous 1 week, 1 month, or 3 months and sacrificed for histopathological evaluation of OE and OB.

2E1H inhalation induced inflammation, degeneration, necrosis, desquamation or disarranged alteration in OE after exposure for 1 week and 3 months, and 3-month exposure resulted in the subsequent alteration in the number of functional cell components in OB which olfactory nerves innervate. Thus it might be suggested that the findings were associated with 2E1H-induced SBS.

研究分野：環境毒性学

キーワード：2-エチル-1-ヘキサノール

### 1. 研究開始当初の背景

シックビル症候群は、新築あるいはリフォームした建物内の空気質、とりわけ空気中の化学物質が原因となって引き起こされる様々な健康障害で、1990年代に顕在化した。行政による揮発性有機化合物 (VOC) の室内濃度指針値の設定や建築基準法改正による使用制限などの取り組み、住宅関連産業によるシックビル対策製品の開発や普及などにより、今日では指針値設定物質が基準を大幅に上回る建物を見ることは少なくなった。しかし、室内濃度指針値が設定された室内 VOC 類の濃度は低いが、指針値のない 2EH の濃度がきわめて高濃度である場合のあることが明らかになっている (Kamijima et al., 2002)。この事例のきっかけとなったのは、ある大学のビル校舎で 2EH の室内濃度が他の VOC 類に比べ突出して高く、外気導入量の少ない部屋の濃度が  $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$  を超えて検出されたことであった。この校舎の新築時期と同じくして、咳や眼、鼻、咽頭の刺激感、悪心などの症状が一人の教職員に出現した。これらの症状は問題となった建物を離れると軽減するものの、日常生活上触れる広範な化学製品によっても症状は誘発され、患者は既に化学物質過敏症とみなされる状態であった。 (Kamijima et al., 2002)。高濃度の 2EH が検出された会議室では、部屋を使用する当該患者を含む複数の教職員に咳や眼、鼻、咽頭の刺激感、頭痛、悪心などの症状がみられ、2EH 濃度の高さで発症者の症状の強さが対応していたことから、これらの自覚症状が 2EH によるシックビル症状であることは明らかであった。症状の出る部屋の 2EH 濃度と床からの 2EH 放散量を定量した結果、放散量と室内濃度の多少は一致し、2EH の主要な発生源は床であることが確認された (上島ら, 2005)。2EH 放散量の多い部屋の床は、タイルカーペットまたはプラスチック長尺シートがコンクリート下地に接着施工されており、会議室ではカーペットをはがした下地面からの放射量はカーペット表面からの放散量の約 5 倍に達し、2EH 放散の原因が床材と下地との接触にあることが証明された (上島ら, 2003, 酒井ら, 2004)。

シックビル症候群の患者の中には、不定愁訴の訴えも多々見られ、また 2EH によるシックビル症候群患者が、化学物質過敏症に移行した事例があるため、におい刺激を介した脳への影響も推察される。

一方、2EH の毒性実験は、ペルオキシゾームの増殖等の肝毒性の解明を目的としたもの以外は少なく、シックビル症状との関連は明確になっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では 2EH 吸入曝露マウスで鼻腔の嗅上皮および嗅神経の投射先である嗅球

の変化を組織学的に検討した。

### 3. 研究の方法

9 週齢の雄 ICR マウスを 1 週間馴化した後、新鮮空気のみを対照群、低、中、高濃度群の 4 群に分け、吸入曝露装置を用いて 2EH を 1 日 8 時間 1 週間連日、1 ヶ月間、または 3 ヶ月間 (5 日/週) 曝露を行った。マウスの匹数は 1 週間が各群 6 匹、1 ヶ月が各群 5 匹、3 ヶ月が各群 6 または 7 匹使用した。2EH はバブリング法で気化させ、曝露濃度は、曝露期間中毎日 2 回、各曝露濃度チャンバー内にチャコールチューブ (柴田科学, Saitama, Japan) を差し込み、チューブに接続したミニポンプ (MP-Σ300 柴田科学) で 10 分間吸引した。取りはずしたチューブから、測定対象物質 (2EH) を  $\text{CS}_2$  を用いて溶出させ、これをキャピラリーカラムに導入して GC/MS により分離、定量して (Kamijima et al., 2002)。曝露濃度がそれぞれ 0、20、60、150 ppm となるように設定した。また、曝露期間中は、1 週間ごとにマウスの体重を測定した。すべてのマウスは、23-4℃、一定の湿度下、12 時間明暗サイクルの部屋で飼われた。曝露終了の翌日に 1 週間曝露群は断頭し、1 ヶ月及び 3 ヶ月曝露群は 4% パラホルムアルデヒド (Wako, Osaka, Japan) で還流固定を行った後解剖し、脳と鼻腔を摘出して重量を測定した。

嗅球は、ビプラトームで厚さ  $50 \mu\text{m}$  の連続切片を作成した (Sawamoto et al., 2006; Kaneko et al., 2001)。切片を 10 mM のクエン酸バッファ (pH 6.0) に浸し、80℃、40 分インキュベートし、ブロッキング溶液 (10% normal donkey serum and 0.2% Triton X-100 in Dullbecco's Phosphate Buffered Saline) に 30 分浸したあと 4℃で一晩、一次抗体を施した。使用した一次抗体は、rabbit anti-olfactory marker protein (OMP) polyclonal IgG antibody 1:800 (abcam, Cambridge, UK); mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) monoclonal IgG antibody, 1:800 (Millipore Bioscience Research Reagents, MA, USA); rabbit anti-Iba1 polyclonal antibody, 1:2000 (Wako, Osaka, Japan); goat anti-doublecortin (Dcx) polyclonal IgG antibody, 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Tx, USA) である。二次抗体は、Alexa 568 donkey anti-rabbit IgG antibody は OMP、Iba1 に使用、Alexa488 donkey anti-mouse IgG antibody は TH に、Alexa488 donkey anti-goat antibody は Dcx に使用した。すべての二次抗体は、Invitrogen (CA, USA) の製品で、1:500 で使用した。

鼻腔は、脱灰後、パラフィン包埋を経て、ミクロトームで厚さ  $5 \mu\text{m}$  の切片を作成した。嗅粘膜切片には、HE 染色、高鉄ジアミン染色を行い、浸潤細胞や構成細胞及び嗅細胞の免疫染色には、DAB 染色を施した。

抗原賦活化は、クエン酸バッファー内で電子レンジ 500 w 5 分を 1 回処置したあと、70 40 分加温した。3%過酸化水素メタノールに 15 分浸した後、一次抗体を 30 分処置し、その後ヒストファイン シンプルステインキット（株式会社ニチレイバイオサイエンス）で、DAB 染色を行った。使用した一次抗体は、rabbit anti-CD45 または anti-CD3 polyclonal IgG antibody, 1:100 (abcam); rabbit anti-neutrophil elastase polyclonal IgG antibody, 1:100 (Calbiochem, Darmstadt, Germany); rabbit anti-olfactory marker protein OMP) polyclonal IgG antibody, 1:200 (abcam); rabbit anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) polyclonal IgG antibody, 1:50 (Santa Cruz Biotechnology) である。

嗅球系球体の OMP と TH は、蛍光顕微鏡、Axiovert S100 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) の Axio Vision 4.2 を使用して測定し、嗅上皮の組織観察は、光学顕微鏡 BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

嗅球系球体の Iba1 と Dcx の定量には、共焦点レーザー顕微鏡、LSM 700 (Carl Zeiss) により、2 μm 感覚でスキャンして撮影し、その後、stereo investigator system (SEN; Carl Zeiss) で陽性細胞をカウントした。

#### 4. 研究成果

2EH 1 週間曝露後の嗅上皮の粘液層及び嗅細胞が消失し、基底膜が不鮮明になり、上皮及び粘膜固有層への炎症細胞浸潤が観察された。この反応は曝露濃度に依存していた。2EH 1 ヶ月曝露後の嗅上皮の組織変化は、どの濃度も見られなかった。2EH 3 ヶ月曝露後の嗅上皮及び粘膜固有層への細胞浸潤が曝露濃度に依存して見られた。また、3 ヶ月曝露後の鼻粘膜のボウマン腺が、曝露濃度に依存して膨張した結果、嗅上皮及び粘膜固有層の間隙が大きくなったように見られた。

2EH を 1 週間、3 ヶ月曝露した後のマウス嗅上皮への白血球浸潤が、免疫染色により示された。CD45 は白血球を、CD3 はリンパ球を、NE は好中球を検出するのに使われた。2EH 1 週間曝露後の嗅上皮の CD45 の発現は、濃度に依存して増加した。2EH 3 ヶ月曝露後の嗅上皮の CD45 の発現は濃度に依存して増加した。2EH 1 週間曝露後の嗅上皮の NE の発現は濃度に依存して増加した。1 週間後の CD3 染色については、変化が見られなかった。2EH 3 ヶ月曝露後の嗅上皮の CD3 の発現は濃度に依存して増加した。2EH 3 ヶ月曝露後の NE 染色については、変化が見られなかった。2EH 1 ヶ月曝露後は、CD45、NE、CD3 は検出されなかった。

嗅神経マーカーの発現は、1 週間及び 3 ヶ月後の嗅上皮で濃度依存的に減少したが、

1 ヶ月曝露後は、変化が見られなかった。球形基底細胞は、2EH 曝露 1 週間後に減少し、1 ヶ月後には増加し、3 ヶ月後には再び減少した。

3 ヶ月曝露後の嗅球では、系球体の厚さは、曝露濃度依存的に減少していた。系球体の OMP 及び TH の発現も濃度依存的に減少していた。一方、系球体の Iba1 の発現は、曝露濃度依存的に増加していた。系球体の Dcx の発現は、高濃度群のみで数が増加していた。

これらの結果より、2EH 曝露 1 週間後の嗅上皮に急性の炎症が起こり、1 ヶ月後に回復し、3 ヶ月後には、慢性の炎症に移行したことが推察される。2EH 曝露により、2EH が直接作用する嗅上皮の嗅神経の数だけでなく、その投射先である嗅球系球体に到達している嗅神経数も減少していた。ミクログリアの増殖により、嗅球の新生ニューロンが増加するという報告があり、今回の 2EH の 3 ヶ月曝露による新生ニューロンの増加もミクログリアの増加によって引き起こされたことが考えられる。この新生ニューロンによる神経のターンオーバーが正常に起こるかどうかは、今後の検討課題である。

本実験では 2EH 曝露による影響は嗅上皮のみに観察され、呼吸上皮には見られなかった。これは過去の報告（佐藤ら、2006）と一致した。一方、シックビル症候群の原因物質であるホルムアルデヒドは、呼吸上皮のみに傷害が見られるとの報告がある（Patterson et al, 1986）。この違いは溶解度が異なることが関与しているのかもしれない。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

2-エチル-1-ヘキサノール吸入曝露によるマウス嗅覚器への影響

三宅美緒、伊藤由起、澤田雅人、酒井潔、鈴木日美子、坂本龍雄、澤本和延、上島通浩  
2014 年 10 月 25 日～26 日 第 42 回産衛中毒・生物学的モニタリング研究会 松本市中央公民館（長野県）

マウスにおける 2-エチル-1-ヘキサノール吸入曝露後の嗅球への影響

三宅美緒、伊藤由起、澤田雅人、酒井潔、鈴木日美子、坂本龍雄、澤本和延、上島通浩  
2014 年 5 月 21 日～24 日 第 87 回日本産業衛生学会 岡山コンベンションセンター 岡山県

2-エチル-1-ヘキサノール曝露によるマウス鼻粘膜の構造変化と炎症細胞浸潤  
三宅美緒、伊藤由起、坂本龍雄、布目真梨、鈴木日美子、富澤元博、榎原毅、上島通浩  
2013年5月14日~17日 第86回日本産業衛生学会 ひめぎんホール(愛媛県)

2-エチル-1-ヘキサノールによるマウス気道への影響  
三宅美緒、伊藤由起、坂本龍雄、劉明、榎原毅、上島通浩  
2012年5月30日~6月2日 第85回日本産業衛生学会 名古屋国際会議場 愛知県

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

三宅美緒 (Miyake Mio)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科 研究員  
研究者番号：80128610

##### (2)研究分担者

坂本龍雄 (Sakamoto Tatsuo)  
中京大学・スポーツ科学部 教授  
研究者番号：60262896

##### (3)連携研究者

上島通浩 (Kamijima Michihiro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科 教授  
研究者番号：80281070

伊藤由起 (Ito Yuki)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科 講師  
研究者番号：80452192