

原 著

医学部解剖実習生におけるホルムアルデヒド
—ヘモグロビン付加体測定松 井 康 人^{1, 5)} 傳 田 拓 也¹⁾ 櫛 田 尚 樹²⁾
菊 田 彰 夫³⁾ 嵐 谷 奎 一⁴⁾ 内 山 巖 雄¹⁾

- 1) 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻環境衛生学講座
- 2) 産業医科大学産業保健学部保健情報科学講座
- 3) 産業医科大学医学部第一解剖学講座
- 4) 産業医科大学産業保健学部第二環境管理学講座
- 5) JSPS 特別研究員

Determinant of formaldehyde hemoglobin adducts
in blood of medical students studying anatomy dissectionYasuto Matsui^{1, 4)} Takuya Denda¹⁾ Naoki Kunugita²⁾
Akio Kikuta³⁾ Keiichi Arashidani²⁾ Iwao Uchiyama¹⁾

- 1) Department of Urban and Environmental Engineering,
Graduate School of Engineering, Kyoto University
- 2) Department of Health Information Science, School of Health Science,
University of Occupational and Environmental Health, Japan
- 3) Department of Anatomy, School of Medicine, University of Occupational and
Environmental Health, Japan
- 4) Department of Environmental Management II, School of Health Sciences,
University of Occupational and Environmental Health, Japan
- 5) Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science

要約

アルデヒド類が血中に侵入すると、ヘモグロビンと付加体を形成する。血中ホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体 (Fah-Hb) は、ヘモグロビンの寿命を考慮すると、過去数ヶ月間の曝露状況を把握できることが期待される。医学部解剖実習生の実習時のホルムアルデヒド曝露状況は深刻で、実習開始時には平均で約600ppbを示し、中盤の開腹時には平均値が1 ppmを超えていた。本研究では、インフォームドコ

受付：平成18年4月18日 採用：平成18年5月15日

別刷請求宛先：松井康人

〒606-8501 京都市左京区吉田本町 京都大学工学研究科 都市環境工学専攻 環境衛生学講座

Received: April 18, 2006 Accepted: May 15, 2006

Reprint Requests to Yasuto Matsui, Department of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshida Honcho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501 Japan

ンセントをおこなって協力を得た医学部解剖実習生25名と、解剖に従事しない学生8名を対象とし、血中Fah-Hb測定を試みた。解剖実習は、週に3回、午後におこなわれ、3ヶ月間の実習が終了した時点で採血をおこなった。弱陽イオン交換カラムを用いることで、付加体を形成したヘモグロビンを分離し、総ヘモグロビン量に対する比率として評価した。その結果、解剖実習に従事しない学生に対し、医学部解剖実習生は有意にFah-Hb値が増加していた。

(臨床環境15:50~57, 2006)

Abstract

Once aldehyde invade blood vessel, these bind chemically to hemoglobin in red blood cell. It's hoped that hemoglobin associated with Formaldehyde (Fah-Hb) is biological exposure index of formaldehyde. Fah-Hb shows the amount of exposure for a few months, because a red blood cell usually lives for about 120 days. We measured formaldehyde concentration in an anatomy dissection room. It showed about 600 ppb when medical students started practice. And, it showed more than 1 ppm in the middle of dissection practice. We selected two groups which consisted of medical students (n=25) and non-medical students (n=8). Medical students practiced dissection three times a week in the afternoon through three months. We collected blood samples at the end of practice. Non porous cation-exchange column is able to separate Fah-Hb from kinds of hemoglobin in human. Fah-Hb was estimated ratio of area of chromatogram. The amount of Fah-Hb in medical students more increased significantly than those of non-medical students.

(Jpn J Clin Ecol 15:50~57, 2006)

《Key words》 formaldehyde hemoglobin adducts (Fah-Hb), cation exchange column, schiff base, anatomy dissecting room

I. 緒言

本研究では、化学物質過敏症の曝露指標開発を最終的な目標とし、ホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体 (Fah-Hb) の定量を試みた。ホルムアルデヒドは1997年に、厚生労働省よりガイドライン値が制定され、近年、室内濃度は減少傾向にある¹⁾。一方で、保健所などに寄せられた化学物質由来の健康障害に対する相談件数は、増加傾向にあるという相反する動向をみせており、従来の曝露評価だけでは対応できない現状があることが指摘されている。

化学物質過敏症は疾病としての登録はされていないが、これらの症状に悩まされる方々には共通の特徴がある。過去に大量の曝露を受けていること、ごく微量の化学物質との接触によって多臓器にわたるいろいろな症状を発することなどである。

著者らはこの特徴に対応できる指標を開発するため、ヘモグロビンの寿命を利用した曝露指標を考案し、その手法の確立をおこなった。ヘモグロビンの寿命を利用した累積的曝露指標としては、糖

化ヘモグロビンがあり、臨床において広く利用されている。Fah-Hbにおいても同様に、化学物質過敏症の主要因子と考えられているホルムアルデヒドの累積的曝露指標としての確立が期待できる。

1. 医学部解剖実習室の曝露調査

本研究では、高濃度ホルムアルデヒド曝露の可能性のある医学部解剖実習生を測定対象者とし、その曝露状況を気中濃度と血中Fah-Hb値を用いて評価した。諸外国では早い時期から、遺体の固定方法や解剖実習室の換気に関する改善がおこなわれてきた^{2~6)}。我国でも2001年の文部科学省の通知⁷⁾をもとに、実習室の改善が進んでおり、本調査をおこなった産業医科大学においてもホルムアルデヒド濃度の減少が報告されている⁸⁾。

2. 既存の研究

アルデヒド類とヘモグロビンとの付加体の測定は、1980年代よりおこなわれてきた^{9~12)}。既存の方法では、遠心分離により得た赤血球を、等張液にて洗浄後、溶血させ、2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) 等で誘導体化し、最終試料液とし

ている。これを逆相カラムにより分離し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析をおこなっている^{13~17)}。このような方法では、実際にはヘモグロビンに付加していたホルムアルデヒドを再度解離させ、それを誘導体化することで検出をおこなっており、Fah-Hb そのものを定量していない。したがって、ヘモグロビン付加体解離の比率の誤差、解離したホルムアルデヒドの誘導体化の比率の誤差が生じる。また、ヘモグロビンとホルムアルデヒドの結合と、誘導体化物質とホルムアルデヒドの結合は共に schiff 結合であり、解離と誘導体化がスムーズに進むとは考えにくい。血球に進入した未代謝ホルムアルデヒドや、生体内で解離しているホルムアルデヒドも同時に測定している可能性もあり、得られた値がヘモグロビン付加体の値を反映しているかは疑問である。著者らは、弱陽イオン交換カラムを用いた HPLC 法を用いることで、Fah-Hb を直接検出し、定量する方法を開発した。

II. 方法

1. 解剖実習室のホルムアルデヒド濃度測定

産業医科大学医学部解剖学実習室において、気中のホルムアルデヒド濃度測定をおこなった。解剖実習室 (19.5×24×3 m, 1400m³) は、地上8階、地下1階の建物の地下1階に位置している。実習室において、計4回の室内空気の捕集をおこなった。1回目は実習期間初日に、2回目は実際に実習の始まった日に、3回目は最も放散量が多いと推測される開胸、開腹時に、4回目は実習の終期に捕集をおこなった。室内濃度測定は作業環境測定法に準じ、A測定が12点、B測定は解剖台の周囲で実習をしている学生のすぐ隣で、3点選定した (図1)。測定高はすべて1.5m とし、実習生の呼吸高に合わせた。解剖実習時の解剖室内の窓はすべて閉じられており、換気は中央管理により100%外気を給気し、再循環をおこなわない換気システムとなっていた。天井に均等に配置された12箇所の給気口から給気され、排気は教卓後方および、前方側壁に設置された排気口からされ

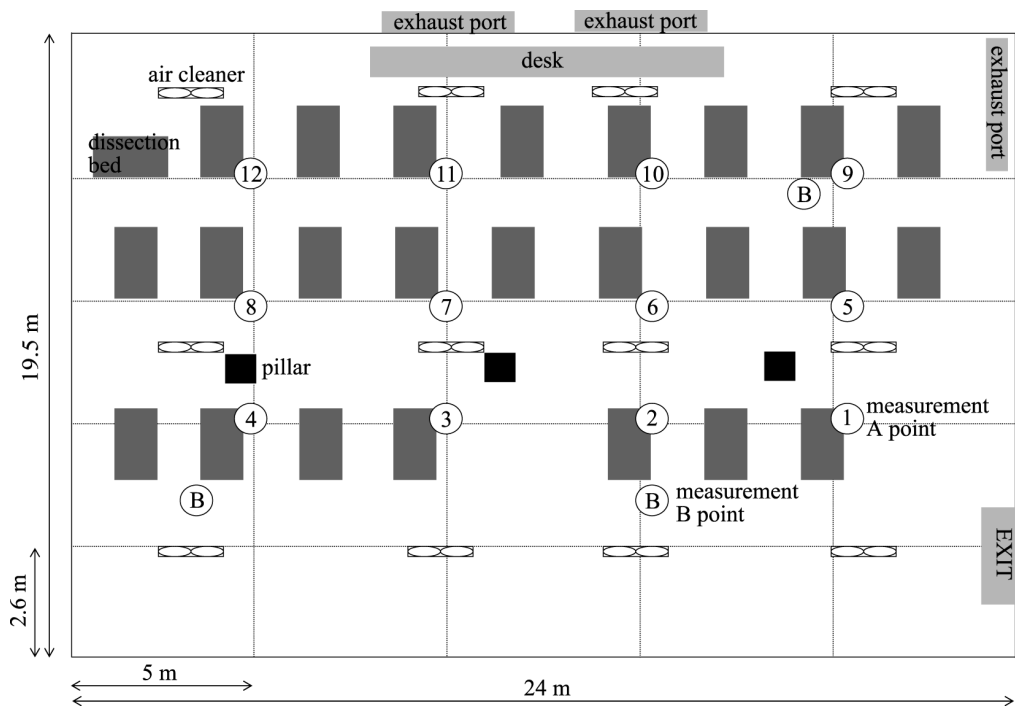


図1 Design for air sampling in the gross anatomy laboratory, University of Occupational and Environmental Health, Japan

ていた。

2. 協力者への採血

解剖実習終了直後に採血をおこなった。医学部学生には、インフォームドコンセントをおこなった上で、協力を得られた方より、約10mLヘパリン加採血した。採血をおこなった場所は、実習室とは別の部屋とした。今回の測定では、解剖実習に参加している医学部解剖実習生（解剖実習生、25名）と、解剖実習に参加していない他学部の学生（一般学生、8名）に協力を得た。

3. 解剖実習生における Fah-Hb 測定

医学部解剖実習は、週に約3日間、午後の数時間おこなわれる。約3ヶ月間の実習が終了した直後に採血をおこなった。血液試料はディープフリーザーにて保存した。これを水浴にて解凍したものを使用した。解凍後のヘパリン（Novo Heparin, Aventis Pharma）加血液を攪拌し、マイクロチューブに分注した。超純水で10mMに調整したDithiothreitol（DTT, Wako）を加え、5倍希釈血液とした。これを37℃にて1hrインキュベートし、100mMのIodoacetamide（IAA, Wako）を添加し、再び37℃、1hrインキュベートした。カルボキサミドメチル化することで最終的には血液の100倍希釈液とし、これを遠心濾過（ ϕ 0.22 μ m）し、HPLCに導入した。

本法に用いた分析機器はLC-8020 Model 2（TOSOH）である。カラムにはイオン交換ゲルTSKgel（TOSOH）を充填したものを、Good's Buffer中で塩濃度、等電点を変化させるリニアグラジュエント溶出法により、ヘモグロビ

ンたんぱくを分離した。流路を短く、径孔を小さくすることで目的成分の拡散を抑える、セミマイクロ分析とした（表1）。データユニットで処理されたデータは総ヘモグロビンのクロマトグラムとして表示され、総ヘモグロビン分画の面積百分率としてFah-Hb値（area%）を得た。

III. 結果

1. 解剖実習室のホルムアルデヒド濃度測定

気中濃度の結果を表2に示す。解剖実習室内のホルムアルデヒド濃度は、ほぼ均一の状態を示しており、幾何平均、算術平均ともに近い値を示した。実習初日（1st time）に、すでに基準値を超えており、解剖中期（2nd）には幾何平均値が基準値の約7.5倍を示した。開胸、開腹時の最も飛散面積の大きくなる時期（3rd）においては約17倍の値を示し、終期（4th）においても高い値が続いた。B測定では、実習生の呼吸高において、高いときには約2ppmを示し、目がチカチカする、喉が乾燥するなどの訴えもあった¹⁸⁾。

2. 解剖実習室における Fah-Hb 測定

血液を分析したクロマトグラムを図2に示す。リテンションタイム（ t_R ）が27minのピーク（図2中の黒色の塗潰し部分、peakA）と、 t_R が34.5minのピーク（図2中の灰色の塗潰し部分、peakB）が、ピーク面積値に群間で有意に差のあったピークである。他にもピークの面積の増加が確認された部分があるが、明確な量-反応がみられなかったことや、試料ごとのばらつきが大きいこと、異常ヘモグロビンなどのminor component

表1 Analytical Method

Column :	TSK-gel GlycoHSi. 4.6 × 100 mm (TOSOH)										
Mobile Phase :	A-MES 20mmol, HEPES 20mmol, NaN ₃ 0.01%, pH5.20										
	B-MES 20mmol, HEPES 20mmol, NaN ₃ 0.01%, NaCl 400mM, pH7.00										
Gradient :	min	0	10	16	17	35	36	38	39	50	
	B%	16	17	18	20	23	80	80	16	stop	
Flow Rate :	0.4mL/min										
Column Temp. :	25										
Det. :	415nm										
Inj. :	4 μ L										

表2 Summary of formaldehyde concentration (ppb) at an anatomy laboratory

	No.	1st time Oct/04/2001	2nd time Oct/05/2001	3rd time Nov/12/2001	4th time Dec/14/2001
Measurement A (Environmental measurement)	1	95	501	1261	1266
	2	104	552	1158	872
	3	116	443	1273	813
	4	75	621	1378	1173
	5	91	559	1391	912
	6	92	747	1303	859
	7	108	476	1491	1078
	8	99	691	1401	1020
	9	82	727	1412	722
	10	85	702	1329	1125
	11	72	568	1653	1084
	12	111	668	1580	910
mean		94	605	1386	986
SD		14	103	138	163
Geometric mean		93	596	1380	974
Geometric SD		1.2	1.2	1.1	1.2
Measurement B (Personal measurement)	1	-	883	2060	1087
	2	-	883	1409	1709
	3	-	914	1574	-

Measurement A and B are measurement methods to assess working environment. "A" examines a concentration of harmful matter to humans in working place. The value for measurement "B" was defined as the maximum value shown in bold. SD; standard deviation.

である可能性が高いことから、前述の2箇所に着目した。着目部のピークでも、試料によっては分離が悪く、分離条件の改善を試みた。また、 t_R の変動も大きく、標準血液として、東ソー HbA1c コントロール HSi レベル 1 (TOSOH) を添加することで、時間の補正をおこなった。最終的には、目的エリア付近の分離をさらに改善するため、グラジュエントステップは維持し、検出器のレスポンスを上げ、分析条件を決定した。測定方法の確立には、ヒト標準ヘモグロビン (Hemoglobin Human Lyophilized powder, SUPELCO) を用い、分離条件を検討した。

着目したピークは、一般学生群においても一定の面積値を示した。ホルムアルデヒドは内因性の物質でもあり、一般健常者においても一定の area % 値を示すことは充分に考えられる。

著者らが以前におこなった、DNPH 誘導体化測定法では、今回と同じ試料を用いたところ、有意な差は得られなかった。しかし、本法において、Wilcoxon 順位と検定をおこなったところ、peakA では $p=.061$ (両側)、peakB では $p=.005$

(両側) となった。両ピークで、解剖実習生において有意に area % 値が大きい値を示した。その結果を図3に示す。図3の上図が peakA、下図が peakB となっている。

IV. 考察

ホルムアルデヒドに高濃度で曝露された医学部解剖実習生と、他学部の学生の間で、有意に Fah-Hb 値に差が認められた。これにより、ホルムアルデヒドの曝露評価として、ヘモグロビン付加体が有用である可能性が確認できた。著者らは、Steven ら¹⁰⁾の研究から、ホルムアルデヒドが付加する部位は beta chain N-terminal Val と推測してきた。健常成人の主要ヘモグロビンであるヘモグロビン A (HbA, alpha2beta2) が血中の 97% を占めており、著者らは globin beta chain に着目してきた。しかし、総ヘモグロビン中に有意に増加するピークが2箇所、その他にも有意ではないが増加するピークが数箇所検出され、beta chain N-terminal 以外にも付加する可能性が示唆される。alpha chain N-terminal も同様に

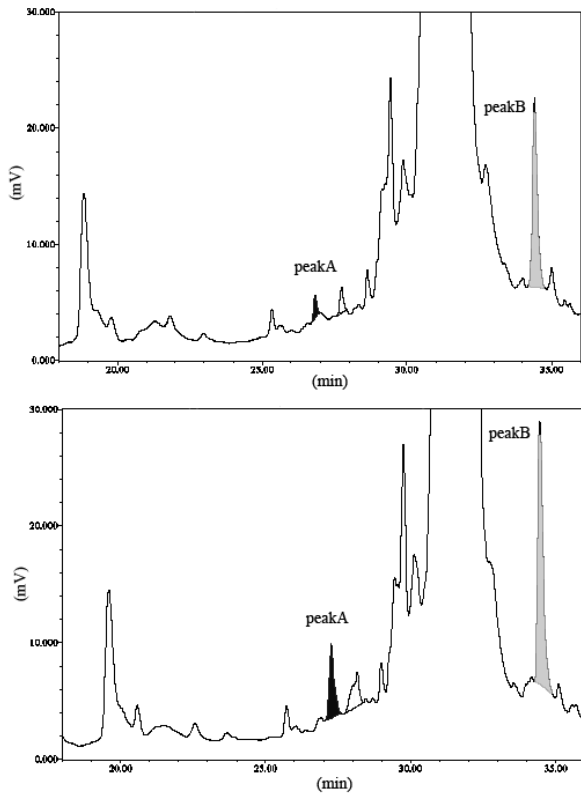


図2 Chromatogram of human hemoglobin. Black-out parts show significant increase between two groups.

Upper: non-Medical students
Lower: Medical students during their dissection course

Valであり、これに付加する可能性も考えられる。著者らのおこなった質量分析における結果でも、これらが共に検出できた。globinたんぱくの二次構造を考えると、他にもホルムアルデヒドが付加する可能性の高い部位がある。beta chainの一次構造は、N末端側から Val, His, Leu, Thr, Pro, Gluとなっており、5番目のProからヘリックス構造を取っている。4番目までのアミノ酸には、塩基性R基を持つHisが含まれており、求核付加反応が起きる可能性が高い。alpha chainは、ヘリックス構造を取る前のアミノ酸に、塩基性アミノ酸は存在しない。

ヘモグロビン付加体は、検討を要する課題も多い。曝露濃度に対するFah-Hb値の変化に関する

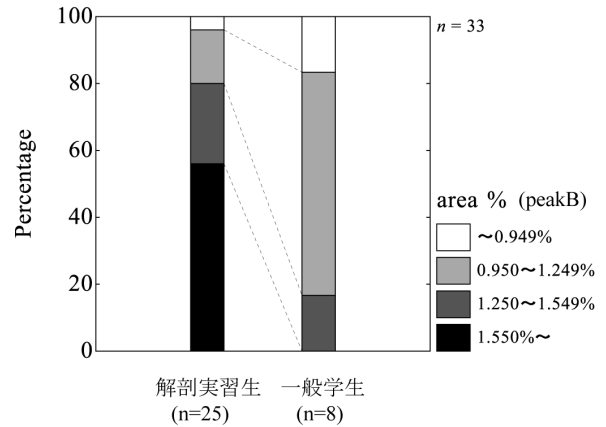
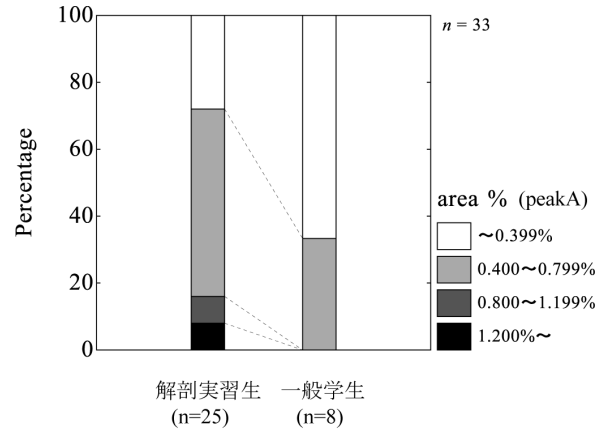


図3 The ratio of area% between medical students and non medical students

Upper: peakA
Lower: peakB

る研究は、多量なデータの蓄積により評価が可能となる。Fah-Hbは、累積的曝露指標である可能性が高い。したがって、今回得られたFah-Hb値から、単純に曝露量を推計することはできない。曝露量、曝露期間(時間)、Fah-Hb値の関係を調査し、付加体形成までのメカニズムを明確にした上で、曝露量の推計が可能となる。糖尿病の指標であるグリコヘモグロビンは、Aldimine(不安定型)からKetoamine(安定型)までの期間が実験から得られており、付加体形成までのメカニズムが明らかになっている。また、糖の負荷試験などにより、時間との関係も明確になっている。

図3では、Fah-Hbのarea%値は、peakA、peakBともに1%以下の変動であった。協力を

いただいた医学部解剖実習生は、週に約3日間、1 ppm を超える濃度のホルムアルデヒドを、午後の数時間、3ヶ月間曝露されており、Fah-Hb値はある一定の高値に収束していることが推測される。室内環境指針値が0.08ppmであることを考慮すると、一般の室内空気では曝露を受けた方への曝露指標としての適用は、現時点では難しい。一般的な室内環境では、ホルムアルデヒドなどの化学物質を、長期に低濃度で曝露されるケースが多い。解剖実習室の約1000分の1の濃度で、数ヶ月間ホルムアルデヒドに曝された時に、Fah-Hb値がどのような変動を示すかを検証する必要がある。

著者らは現在、マウスを用いた低濃度長期曝露実験を進めている。その結果をもとにFah-Hb値の動態シミュレーションをおこない、曝露量、曝露期間との関連を明らかにしていく予定である。さらに、イオン交換カラムを用いたHPLC法に加え、globin beta chain methylated N-terminal抗体を用いた免疫測定法も開発中であり、簡易測定法の開発を急いでいる。

謝辞

本研究は、「化学物質過敏症患者に対する生物学的曝露指標の開発」として、日本学術振興会科学研究費補助金(特別研究員奨励費)によりおこなわれました。また、分析に関しては、東ソー株式会社の新藤義之様、中村孝様、寺延実様、京都大学大学院の栢谷清太様(現在株式会社日立製作所)にご尽力いただきました。心より感謝申し上げます。

文献

- 1) 大貫文、齋藤育江、他：新築住宅におけるホルムアルデヒド及び揮発性有機化合物濃度の年次推移。東京衛研年報53、2002
- 2) Skisak CM: Formaldehyde vapor exposures in anatomy laboratories. Am Ind Hyg Assoc J 44: 948-950, 1983
- 3) Perkins JL, Kimbrough JD: Formaldehyde exposure in a gross anatomy laboratory. J Occup Med 27: 813-815, 1985
- 4) Pabst R: Exposure to formaldehyde in anatomy. an occupational health hazard. Anatomical Record 219: 109-112, 1987
- 5) Chia SE, Ong CN, et al: Medical students' exposure to formaldehyde in a gross anatomy dissection laboratory. J Am Coll Health 41: 115-119, 1992
- 6) Akbar-Khazandeh F, Vaquerano MU, et al: Formaldehyde exposure, acute pulmonary response, and exposure control options in a gross anatomy laboratory. Am J Ind Med 26: 61-75, 1994
- 7) 文部科学省高等教育局：医学生及び歯学生の系統解剖実習時の環境向上について。13高医第4号、2001
- 8) Yamato H, Nakashima T, et al: A novel local ventilation system to reduce the levels of formaldehyde exposure during a gross anatomy dissection course and its evaluation using real-time monitoring. J Occup Health 47: 450-453, 2005
- 9) C Fred, T Cantillana, et al: Adducts of N-terminal valines in hemoglobin with isoprene diepoxide, a metabolite of isoprene. Mass Spectrom 18: 2177-2184, 2004
- 10) Victor J Stevens, Wendy J Fantl, et al: Acetaldehyde Adducts with Hemoglobin. J Clin Invest 67: 361-369, 1981
- 11) Richard C San George, Henry D Hoberman: Reaction of Acetaldehyde with Hemoglobin. J Bio Chem 261: 6811-6821, 1986
- 12) Susan E Hazelett, Robert A Liebelt, et al: Improved Separation of Acetaldehyde-Induced hemoglobin. Alcohol Clin Exp Res 17: 1107-1111, 1993
- 13) Yu P H Cauglin C, et al: A novel sensitive high-performance liquid chromatography/electrochemical procedure for measuring formaldehyde produced from oxidative deamination of methylamine and in biological samples. Anal Biochem 15: 285-290, 2003

- 14) Kozutsumi D, Arita M, et al: An improved method for acetaldehyde determination in blood by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *J Chromato Sci* 40: 477-482, 2002
- 15) Charles M Peterson, Catherine M Polizzi: Improved Method for Acetaldehyde in Plasma and Hemoglobin-associated Acetaldehyde. *Alcohol* 4: 477-480, 1987
- 16) E Sawicki, R A Carns: Spectrophotofluorimetric Determination of Aldehydes with Dimedone and Other Reagents. *Micro Chem*: 148-159, 1967
- 17) Digenis G A, Sandefer E P, et al: Bioequivalence study of stressed and nonstressed hard gelatin capsules using amoxicillin as a drug marker and gamma scintigraphy to confirm time and GI location of in vivo capsule rupture. *Pharm Res* 5: 572-582, 2000
- 18) 樺田 尚樹、中島 民治、他：解剖実習室における気中ホルムアルデヒド濃度評価と自覚症状調査. *産業医科大学雑誌* 26 : 337-348、2004