

## 第5章

### 有機酸類吸入ばく露動物試験

## 第5章 有機酸類吸入ばく露動物試験

### I 目的

本試験では、有機酸類の中長期的な吸入ばく露の一般毒性学的知見を得ること及びぜん息等アレルギー症状への影響を推測する基礎知識を得ることを目的とした。健常ラットを用い、酢酸及びギ酸を単独で、あるいは混合して28日間又は6か月間の吸入ばく露試験を実施し、病理組織学、生化学及び免疫学等の手法により、生体影響を総合的に評価した。

### II 方法

#### 1 実験動物

28日間ばく露には8週齢の、6か月間ばく露には5週齢のF344系雄ラットを購入し（日本チャールス・リバー）、1週間の順化飼育後、発育良好なラットを層別化ランダム法により清浄空気群（対照群）とばく露群に分け、各群10匹の動物に実験を行った。5匹ごとにチャンバー内で飼育し、給餌・給水は通常の方法で行い、1週間に1度の体重測定を行った。

飼育及び動物実験は、東京都健康安全研究センターの研究調整委員会および動物実験委員会による事前審査を受け、その管理のもと、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠して行った。

#### 2 ばく露濃度及びばく露システム

ばく露濃度は、作業環境許容濃度を「中濃度」として設定し、その1/10の濃度を「低濃度」、10倍の濃度を「高濃度」（一部実験のみ）として設定した。設定目標濃度を表1にまとめた。各群ともにラットは10匹を用い、個体番号は表1に示すとおりである。

給気はコンプレッサー又は空気ボンベにより行い、パーミエーター（PB-1B、ガステック）内で揮発させた酢酸あるいはギ酸を各チャンバーに導入した。チャンバーの容積は53L、換気回数は7.4回/h、給気流量は酢酸が4L/min、ギ酸が4L/min、混合ばく露は酢酸6L/min及びギ酸6L/minで行った（第4章、P.34から35の表1から3参照）。目標濃度を維持できるよう、パーミエーターの水槽温度は30℃から50℃の間で、拡散用チューブ径は13mmから22.5mmの間で調節した。

動物は5匹ずつ2つのチャンバーに入れ、チャンバー間の条件の差異を無くすため、毎日5匹ずつの動物を入れ替えた。

表1 有機酸類ばく露実験のばく露濃度目標値 (ppm) 及び個体番号

実験名		対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
酢酸ばく露	28日間	0	1	10	—
	6か月間	0	1	10	—
ギ酸ばく露	28日間	0	0.5	5	—
	6か月間	0	0.5	5	50
混合ばく露(28日間)	酢酸	0	1	10	100
	ギ酸	0	0.5	5	50
ばく露個体番号		101-110	201-210	301-310	401-410

各実験のばく露期間は、28日間（亜急性）あるいは6か月間（慢性）のいずれかであり、ばく露は5日/週、5時間/日の間欠ばく露とした。酢酸あるいはギ酸の単独ばく露時には、1日2回、定時に検知管（ガステック）を用いた簡易測定によりばく露チャンバー内の酢酸、あるいはギ酸濃度を測定するとともに、週1回イオンクロマトグラフによる精密なチャンバー内濃度を測定した（第4章参照）。酢酸とギ酸の混合ばく露時には、週2回のイオンクロマトグラフによる精密なチャンバー内濃度測定を実施した（第4章参照）。

### 3 解剖及び試料採取

動物は、ばく露最終日の翌日にイソフルラン吸入麻酔下で腹大動脈から採血した後、解剖に供した。肺及び気管については、各群2匹ずつ写真撮影を行った。

脳、眼球、鼻腔、気管、肺、心臓、縦隔リンパ節、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、精巣上部、凝固腺及び前立腺を摘出した。脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓及び精巣については臓器重量を測定した。各臓器の相対重量は体重100gあたりの臓器重量として算出した。肺は各葉ごとに切り分け、各々の実験に供した。

全血は抗凝固剤EDTA-2Kを入れた試験管に採取した。血清は、全血を凝固促進シリカ粒子・血清分離剤入りの採血管に全血を採取し、室温で30分間放置後、3000rpmで15分間冷却遠心することによって得た。

### 4 病理組織学

摘出した臓器は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。肺は気管からのホルマリリン注入により固定した。包埋、薄切、H&E染色は定法により実施し、光学顕微鏡にて観察を行った。

## 5 血液学

全血は、多項目自動血球計数装置 (KX-21NV、シスメックス) にて分析し、赤血球数、白血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度及び血小板数を算出した。また、新鮮血から血液塗抹標本を作製し、メイグリュンワルドギムザ染色を行い、白血球百分率を算定した。

リンパ球サブセット検査は、赤血球を溶血させた後に白血球を分離し、各種の色素標識抗体で標識後、フローサイトメーター (Cell Labo Quanta SC、ベックマンコールター) で計測した。

対照群とばく露群との統計解析には、Dunnet の多重比較検定を用いた。

## 6 免疫学

免疫グロブリン濃度及びサイトカイン濃度の測定は ELISA 法により行い、各キットのメーカー推奨の手法に従った。HRP 標識二次抗体を用い 96 穴マイクロプレートリーダー (SpectraMax Paradigm、Molecular Devices) により、シグナルを検出した。全てのサンプルについて 2 回以上の実験を実施し、結果の値は平均値を採用した。対照群とばく露群との統計解析には、Dunnet の多重比較検定を用いた。

用いた ELISA キットは以下の通りである。Bethyl Laboratories の IgE 及び IgG、Thermo Scientific の IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、MCP-1、TNF- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$ 、Diacclone の IL-2、Invitrogen の IL-4 及び IL-12、R&D Systems の IL-8。

## 7 生化学 (過酸化脂質)

血清あるいは肺組織について、定法によりチオバルビツール酸反応物質としてのマロンジアルデヒド (MDA) 濃度を測定した。なお、血清及び肺組織は分析直前まで -80°C で凍結保存した。肺右葉の中葉は 1.15% KCl でホモジェナイズしたものをサンプルとした (ポリトロン、KINEMATICA)。対照群とばく露群との統計解析には、Dunnet の多重比較検定を用いた。

## 8 プロテオーム

本研究の 5 つのばく露実験のうち、酢酸 6 か月間、ギ酸 6 か月間及び混合 28 日間の 3 つのばく露実験では、肺組織あるいは血清を用いてプロテオーム解析を行った。網羅的なタンパク質発現変動の比較対象は、対照群と最高濃度のばく露群との 2 群の間で行うこととした。すなわち、酢酸ばく露については「中濃度群」を、ギ酸ばく露及び混合ばく露実験については、「高濃度群」をばく露群として解析に使用した。基本的には、各群とも、写真撮影に用いた 2 個体を除く 8 個体を用いているが、二次元電気泳動や蛍光画像取込の際に異常のあったゲルを除外し、7 個体で行った解析もある (表 2)。なお、混合ばく露の肺組織の解析では、面積の大きい電気泳動

槽を用いており、一斉に展開が可能な検体が6個であるため、6個体による解析を実施した。

表2 プロテオーム解析で比較対象とした群及び個体番号

解析対象	対照群	ばく露群
6か月間酢酸ばく露	肺組織 8個体; 103-110	8個体; 303-310
	血清 7個体; 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110	7個体; 302, 304, 306, 307, 308, 309, 310
6か月間ギ酸ばく露	肺組織 8個体; 103-110	8個体; 403-410
	血清 8個体; 103-110	8個体; 403-410
28日間混合ばく露	肺組織 6個体; 104, 105, 106, 107, 108, 109	6個体; 405, 406, 407, 408, 409, 410
	血清 7個体; 103, 104, 105, 106, 108, 109, 110	7個体; 402, 403, 405, 406, 408, 409, 410

※6か月酢酸ばく露のばく露群では、タンパク質の可溶化が不十分なサンプルを除外し、302を実験に用いた

肺は右葉の副葉を用いた。摘出直後に液体窒素により凍結し、多検体型破砕機（マルチビーズショッカー、安井器械）により粉砕した。血清は、アルブミン及びIgGを除去後（Albumin & IgG Depletion SpinTrap、GEヘルスケア）、アセトン沈殿により精製した。肺の凍結粉末あるいは、血清の沈殿物は一般的な尿素含有のタンパク質溶解液により溶解し、可溶画分を得た。

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動（Ettan DIGE システム、GEヘルスケア）により、2群間で発現変動のあるタンパク質を検出した。画像取込は、蛍光スキャナー（Typhoon Trio+、GEヘルスケア）、画像解析・統計解析は専用ソフトであるDeCyder（GEヘルスケア）によりメーカー推奨の通りに実施した。Studentのt検定により発現量に有意差のあったタンパク質スポットを特定し、定法により銀染色した二次元電気泳動ゲルからスポットを切り出した。切り出したゲル片はトリプシン（Trypsin Gold、プロメガ）処理によりタンパク質を断片化したペプチドを抽出した。抽出産物は、LC/Q-TOF/MS（nano Acquity UPLC/Synapt MS、ウォータース）で分析し、専用ソフト（ProteinLynx™ Global SERVER、ウォータース）により、タンパク質を同定した。

## 9 ウェスタンブロッティング

プロテオーム解析で変動のあったタンパク質について、発現の変動を確認するために、一部のタンパク質についてウェスタンブロッティングを行った。セミドライで6分間のトランスファーを行い（iBlot Gel Transfer System、インビトロジェン）、各種の1次抗体（RAGE、Abcam: ab3611、 $\beta$ -アクチン、Abcam: ab6276）と、HRP結合型2次抗体を用いて検出し、化学発光のシステムによりバンドを検出した（ECL prime、GEヘルスケア）（Lumino Graph、アトー）。

### Ⅲ 結果

#### 1 酢酸ばく露

##### (1) 酢酸濃度

図1aに、簡易測定及び精密測定による28日間の酢酸ばく露期間中のチャンバー内濃度推移を示した。

予備実験により動物のいない状態で濃度調整を行い、中濃度群 10ppm、低濃度群 1ppm となるように条件を設定したが、実際に動物を入れてばく露を開始すると、チャンバー内濃度は目標濃度よりも低い状況が観察された。そこで、ばく露期間後半は、パーミエーターの温度を上げて（中濃度群は 40℃から 50℃へ、低濃度群 30℃から 35℃へ変更）、チャンバー内の濃度上昇を図った。28日間の酢酸ばく露濃度の精密分析による平均値は、中濃度群 5.4ppm±3.0ppm、低濃度群 0.7ppm±0.3ppm であり、目標濃度（p.44 表1）の 54%と 70%の濃度であった。なお、簡易測定による結果は中濃度群 5.2ppm±2.0ppm、低濃度群 0.7ppm±0.2ppm であり、精密測定による結果と良く一致していた。

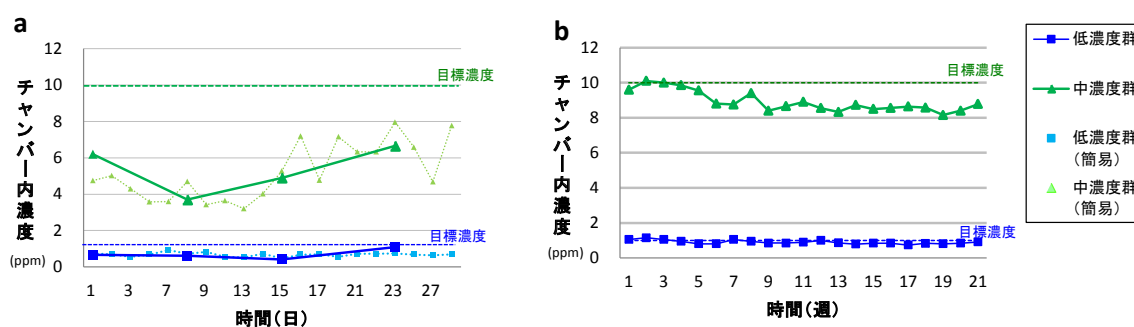


図1 酢酸のチャンバー内濃度推移

a 28日間ばく露。実線の折れ線グラフはイオンクロマトグラフによる精密分析の結果を、点線の折れ線グラフは検知管による簡易測定の結果を示す。

b 6か月間ばく露。精密分析の結果を示す。

なお、数値は各ばく露濃度群の2つのチャンバーの平均値である。点線の直線は目標濃度を示す。

図1bに6か月間の酢酸ばく露期間中のチャンバー内濃度推移を示した。6か月間の各群の平均値は、低濃度群 0.9±0.1 ppm、中濃度群 9.0±0.8 ppm であり、目標濃度に近い濃度を維持してばく露を実施することができた。酢酸ガスを導入していない対照群では、酢酸の濃度平均値は 0.1 ppm 未満であった。

## (2) 体重及び臓器重量

28日間ばく露及び6か月間ばく露における体重の絶対重量の推移を図2に示した。28日間ばく露実験において、開始時の対照群、低濃度群及び中濃度群の体重(平均値±SD)はそれぞれ、179.4g(±3.7)、176.2g(±5.6)及び175.1g(±5.9)であり、終了時はそれぞれ、247.9g(±5.5)、246.4g(±7.7)及び248.0g(±6.7)であった。

6か月間ばく露実験において、開始時の対照群、低濃度群及び中濃度群の体重はそれぞれ、109.8g(±5.7)、109.6g(±5.6)及び108.4g(±6.1)であり、終了時はそれぞれ、367.9g(±22.9)、371.8g(±10.7)及び369.6g(±18.8)であった。いずれの期間のばく露実験においても、対照群と、低濃度あるいは中濃度群との間には、体重の大きな変化は認められなかった(図2)。

また、解剖時の主要臓器絶対重量及び相対重量についても、28日間ばく露(表3-1)及び6か月間ばく露(表3-2)ともに、特記する変動は認められなかった。

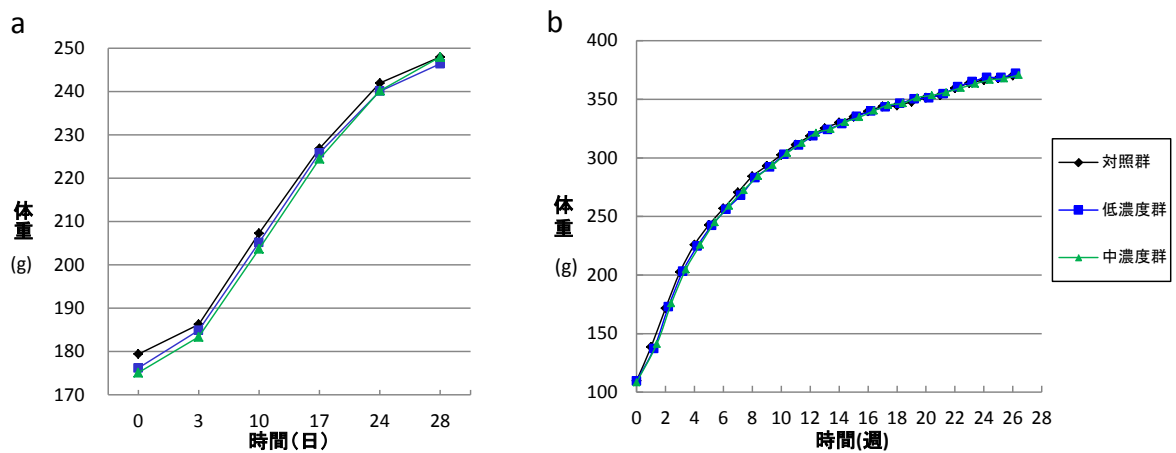


図2 酢酸ばく露ラットの体重推移

a 28日間ばく露、b 6か月間ばく露。各群10個体の平均値を示す。

表 3-1 28 日間酢酸ばく露ラットの主要臓器重量

絶対重量	対照群	低濃度群	中濃度群
解剖時体重 (g)	247.9 ± 5.5	246.4 ± 7.7	248.0 ± 6.7
副腎 (左) (mg)	17.0 ± 1.3	16.9 ± 2.0	17.3 ± 1.1
副腎 (右) (mg)	15.1 ± 0.8	15.2 ± 1.2	15.1 ± 1.2
胸腺 (mg)	230.7 ± 15.8	230.0 ± 17.1	237.8 ± 22.0
脾臓 (mg)	566.6 ± 13.6	560.8 ± 17.3	569.1 ± 23.6
精巣 (左) (mg)	1441.3 ± 48.4	1440.0 ± 49.5	1435.4 ± 53.2
精巣 (右) (mg)	1409.7 ± 57.1	1412.3 ± 41.9	1399.9 ± 44.4
腎臓 (左) (mg)	809.3 ± 26.0	812.9 ± 36.0	805.1 ± 40.3
腎臓 (右) (mg)	808.7 ± 23.3	816.3 ± 39.8	810.6 ± 33.3
心臓 (mg)	725.5 ± 36.3	709.7 ± 30.1	725.4 ± 26.7
肝臓 (g)	8.7 ± 0.3	8.7 ± 0.5	8.5 ± 0.4
肺 (mg)	717.8 ± 47.7	675.1 ± 57.4	702.2 ± 59.8
脳 (mg)	1902.1 ± 16.0	1912.8 ± 28.0	1896.8 ± 27.4
相対重量	対照群	低濃度群	中濃度群
副腎 (左) (mg)	6.9 ± 0.5	6.9 ± 0.7	7.0 ± 0.4
副腎 (右) (mg)	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.4	6.1 ± 0.4
胸腺 (mg)	93.1 ± 5.8	93.4 ± 7.2	95.9 ± 8.5
脾臓 (mg)	228.5 ± 3.1	227.7 ± 6.3	229.5 ± 6.93
精巣 (左) (mg)	581.5 ± 23.0	585.1 ± 29.3	579.0 ± 18.1
精巣 (右) (mg)	568.8 ± 25.2	573.8 ± 25.5	564.7 ± 15.8
腎臓 (左) (mg)	326.5 ± 9.6	330.0 ± 10.6	324.7 ± 12.1
腎臓 (右) (mg)	326.3 ± 10.3	331.3 ± 11.9	327.0 ± 11.5
心臓 (mg)	292.6 ± 12.3	288.1 ± 8.6	292.6 ± 6.3
肝臓 (mg)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1
肺 (mg)	289.6 ± 19.8	274.1 ± 22.7	283.1 ± 22.0
脳 (mg)	767.5 ± 20.5	777.2 ± 29.4	765.4 ± 19.3

平均値 ± SD

表 3-2 6 か月間酢酸ばく露ラットの主要臓器重量

絶対重量	対照群	低濃度群	中濃度群
解剖時体重 (g)	367.9 ± 22.9	371.8 ± 10.7	369.6 ± 18.8
副腎 (左) (mg)	17.7 ± 1.2	18.0 ± 1.2	18.2 ± 1.8
副腎 (右) (mg)	16.3 ± 1.3	15.2 ± 1.5	16.3 ± 0.8
胸腺 (mg)	96.2 ± 10.0	104.9 ± 13.6	99.3 ± 16.3
脾臓 (mg)	670.5 ± 34.0	682.4 ± 32.0	678.4 ± 37.7
腎臓 (左) (mg)	1091.1 ± 69.9	1080.0 ± 65.8	1080.4 ± 88.1
腎臓 (右) (mg)	1098.9 ± 95.9	1059.2 ± 69.3	1101.5 ± 78.9
精巣 (左) (mg)	1662.5 ± 74.7	1645.0 ± 55.0	1663.7 ± 55.2
精巣 (右) (mg)	1625.4 ± 36.7	1525.7 ± 206.4	1616.2 ± 54.5
心臓 (mg)	931.6 ± 51.9	933.2 ± 47.8	939.1 ± 40.5
脳 (mg)	2063.4 ± 33.0	2068.7 ± 33.9	2053.6 ± 43.6
肝臓 (g)	10.2 ± 1.0	10.1 ± 0.6	10.1 ± 0.7
肺 (mg)	969.1 ± 63.4	989.6 ± 190.8	951.0 ± 50.0
相対重量	対照群	低濃度群	中濃度群
副腎 (左) (mg)	4.8 ± 0.5	4.8 ± 0.3	4.9 ± 0.4
副腎 (右) (mg)	4.4 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.4 ± 0.2
胸腺 (mg)	26.2 ± 2.8	28.2 ± 3.3	27.0 ± 4.8
脾臓 (mg)	182.4 ± 7.0	183.5 ± 7.3	183.7 ± 8.3
腎臓 (左) (mg)	297.1 ± 20.0	290.4 ± 15.0	292.3 ± 17.9
腎臓 (右) (mg)	298.7 ± 19.1	284.8 ± 15.9	298.2 ± 17.7
精巣 (左) (mg)	453.2 ± 32.0	442.7 ± 19.2	450.8 ± 18.2
精巣 (右) (mg)	443.2 ± 27.7	410.9 ± 57.7	437.9 ± 18.3
心臓 (mg)	253.5 ± 11.4	251.0 ± 11.8	254.3 ± 7.5
脳 (mg)	562.5 ± 32.5	556.7 ± 15.5	556.7 ± 23.6
肝臓 (g)	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1
肺 (mg)	263.8 ± 16.2	265.9 ± 47.9	257.4 ± 5.6

平均値 ± SD



### (3) 病理組織学的解析

#### ア 28日間酢酸ばく露

気管及び肺の肉眼的所見では、低濃度群、中濃度群ともに特記すべき変化は認められなかった。

鼻腔は、重層扁平上皮(I)、呼吸上皮(II)、嗅上皮(III)が存在する3か所の部位(レベル)について観察した(図3)。いずれの部位においても、粘膜上皮における炎症細胞の浸潤や杯細胞の増加及び各上皮細胞変性等の酢酸ばく露に関連した変化は認められなかった(表4)。

また、各部位の上皮細胞の高さも、対照群と比べて、低濃度群、中濃度群ともに顕著な差は認められなかった(表5)。

気管は気管支部を含め、気管を上部(部位I)及び下部(部位II)と気管支部(部位III)の3部位について

観察した。各部位の粘膜上皮における炎症細胞の浸潤、杯細胞の増加等の変化に注目したが、低濃度群、中濃度群ともに、対照群と比べて変化は認められなかった(表4)。また、各部位の上皮細胞高は、対照群と比べて低濃度群、中濃度群ともに差は認められなかった(表5)。

肺実質においても、対照群、低濃度及び中濃度群の間に顕著な差異のある変化は認められなかった。酢酸ばく露の有無にかかわらず、肺泡領域における炎症性病変、肺泡内マクロファージの集簇、骨化生及び血管壁



図3 鼻腔観察部位

ラットの頭部を左側から見たもの。I: 切歯直後、II: 切歯乳頭部、III 第一臼歯部

表4 28日間酢酸ばく露ラットの呼吸器系の組織変化

		対照群	低濃度群	中濃度群
観察動物数		10	10	10
観察項目/観察部位				
<b>気道系: 鼻腔~細気管支粘膜</b>				
炎症細胞浸潤				
鼻腔	I~III <sup>a)</sup>	— <sup>b)</sup>	10 <sup>c)</sup>	10
気管	I~III	—	10	10
細気管支	I~II	—	10	10
杯細胞の増加				
鼻腔	I~III	—	10	10
気管	I~III	—	10	10
細気管支	I~II	—	10	10
<b>肺: 肺泡管~肺泡</b>				
炎症性病変				
炎症細胞の浸潤 肺泡上皮細胞の肥大, 増生 肺泡壁 軽度肥厚	近位部	—	3	0
		+	7	10
		++	0	0
	胸膜下	—	4	3
		+	5	7
		++	1	0
マクロファージの集簇				
	近位部	—	10	10
		+	0	0
	胸膜下	—	4	5
		+	6	5
肺泡内骨化生				
		—	8	9
		+	2	1
血管壁石灰化				
		—	8	9
		+	2	1
出血				
		—	3	2
		+	7	8

a) 観察部位: 鼻腔(I 切歯直後, II 切歯乳頭部, III 第一臼歯部), 気管(I 上部, II 下部, III 気管支部), 細気管支(I 管径200~300 μm, II 呼吸細気管支)  
 b) 組織変化の程度, — 変化なし, + 軽度, ++ 中等度  
 c) 変化が見られた動物数

の石灰化などの変化が認められた(表4)。このうち、各群に共通して比較的多く見られた変化は、肺胞の炎症性病変、マクロファージの集簇<sup>しゅうぞく</sup>及び血管壁の石灰化であった。

炎症性病変は、肺胞腔及び肺胞壁におけるマクロファージや炎症性細胞の浸潤、肺胞上皮細胞の腫大及び増生による肺胞壁の肥厚を認めるものであり、肺胞を1から数個含む軽度な微小変化(+)から、より多くの肺胞を含み、肺胞上皮細胞の増生を伴った肺胞壁の肥厚の程度が中程度の病変(++)まで認められた。

肺胞領域におけるマクロファージは、各群に共通して肺組織全体にわたって存在し、特に胸膜下の肺胞で多く見られ、より近位部<sup>しゅうぞく</sup>での顕著な集簇は認められなかった。

表5 28日間酢酸ばく露ラットの呼吸器系の粘膜上皮細胞高(μm)

	対照群	低濃度群	中濃度群
観察動物数	10	10	10
鼻 腔 I <sup>a)</sup> (重層扁平上皮)	15.53 ± 0.82	15.90 ± 0.77	15.99 ± 1.12
II (呼吸上皮)	15.40 ± 1.06	16.35 ± 1.17	16.90 ± 1.19
III (嗅上皮)	52.16 ± 5.21	49.70 ± 4.20	50.13 ± 2.10
気 管 I	14.63 ± 0.66	15.08 ± 1.17	16.16 ± 1.05
II	10.62 ± 0.46	11.09 ± 0.93	9.85 ± 1.27
III	6.70 ± 0.38	6.83 ± 0.59	7.18 ± 0.46
細気管支 I	9.24 ± 0.44	9.20 ± 0.48	9.65 ± 0.44
II	5.90 ± 0.62	5.65 ± 0.53	5.67 ± 0.53

平均値±SD

a) 観察部位: 鼻腔(I 切歯直後, II 切歯乳頭部, III 第一臼歯部), 気管(I 上部, II 下部, III 気管支部), 細気管支(I 管径200~300μm, II 呼吸細気管支)

血管壁の石灰化は、自然発生病変として知られている血管中膜が石灰化した微小変性巣であり、血管の1から数か所に認められるごく軽度な変化であった。以上の組織変化の各群における発生率の増加や病変の発現頻度

及び程度の強さに、酢酸ばく露との関連は認められなかった。肺胞内骨化生についても、自然発生病変として知られている変化であり、発現頻度も低く、ごく軽度な変化であり、酢酸ばく露の関連は認められなかった。

肺内細気管支の各部位(I 管径200から300μmまで、II 細気管支)における粘膜上皮の厚さは、対照群と比べて低濃度群及び中濃度群で有意な差は認められなかった(表5)。

呼吸器系以外の臓器では、自然発生病変として知られる心筋の炎症性病変及び腎尿細管の変性等の変化が、対照群及びばく露群に共通して見られたが、いずれも発現頻度は低く、また軽度な変化であった。その他の臓器では特に変化は認められなかった。

## イ 6か月間酢酸ばく露

6か月間のばく露個体の気管及び肺も、低濃度及び中濃度群ともに対照群と比べて、肉眼的異常は認められなかった(P.85 写真1a)。

鼻腔は、レベルI、II及びIIIの3か所の部位について観察した(図3)。いずれの部位においても、粘膜上皮における炎症細胞の浸潤や杯細胞の増加及び各上皮細胞変性等の、酢酸ばく露に関連した変化は認められなかった。

気管及び気管支は、低濃度群、中濃度群ともに、粘膜上皮における炎症細胞の浸潤、杯細胞の肥大等のばく露に関連した変化は認められなかった（表 6-1）。

表 6-1 6 か月間酢酸ばく露ラットの呼吸器系の組織所見（気管～細気管支）

		変化の強さ <sup>a)</sup>	対照群	低濃度群	中濃度群	
上皮細胞高の増加/杯細胞の肥大						
気管	I <sup>b)</sup>	-	10	10	10	
		+	0	0	0	
	II	-	10	10	10	
		+	0	0	0	
	III	-	10	10	10	
		+	0	0	0	
細気管支	I <sup>c)</sup>	-	10	10	10	
		+	0	0	0	
	II	-	10	10	10	
		+	0	0	0	
	粘膜内炎症細胞浸潤					
	気管	I <sup>b)</sup>	-	10	10	10
+			0	0	0	
II		-	10	10	10	
		+	0	0	0	
III		-	10	10	10	
		+	0	0	0	
細気管支	I <sup>c)</sup>	-	10	10	10	
		+	0	0	0	
	II	-	10	10	10	
		+	0	0	0	

n=10

a) 病変の程度：- 変化なし，+ ごく軽度

b) 気管 I，上部，II，下部，III，気管支

c) 細気管支：I 管径200-300 $\mu$ m II 終末～呼吸細気管支

表 6-2 6 か月間酢酸ばく露ラットの呼吸器系の組織所見（肺実質）

	変化の強さ <sup>a)</sup>	対照群	低濃度群	中濃度群
炎症性病変(肺胞壁/肺胞腔) ;炎症細胞浸潤	-	8	8	7
	+	2	2	3
血管周囲の細胞集簇	-	10	9	8
	+	0	1	2
マクロファージの集簇	-	9	7	9
	+	1	3	1
上皮細胞増生 (呼吸細気管支/肺胞)	-	9	9	10
	+	1	1	0
胸膜肥厚 ;細胞浸潤，線維化	-	7	4	5
	+	3	6	4
出血(肺胞)	-	9	10	10
	+	1	0	0

n=10

a)変化の強さ：- 変化なし，+ ごく軽度

気管上部について上皮細胞高を測定したが、対照群と比べて低濃度群、中濃度群ともに差は認められなかった（表 7）。肺内細気管支（管径 200 から 300 $\mu$ m まで）の粘膜上皮の高さも、対照群と比べて低濃度群、中濃度群で有意な差は認められ

なかった (表 7)。

肺実質は、対照群、低濃度群及び中濃度群に共通して、肺胞腔及び肺胞壁における好中球等の浸潤 (炎症性病変)、肺胞腔内のマクロファージの集簇、血管壁の石灰化などが見られた。いずれもごく軽度な変化であった (表 6-2)。

呼吸器系以外の臓器では、心筋の炎症性病変及び腎尿細管の変性等が対照群及びばく露群に共通して見られた。いずれも各群における発現頻度は低く、変化の程度も軽度であった。また、解剖時に、ハーダー腺表面に暗赤色の微小斑点が低濃度群及び中濃度群の各 2 例に見られた (P. 86 写真 2)。組織学的には、軽度な腺房細胞の変性や細胞浸潤が各群に共通して散見されたが、肉眼所見との関連は明らかでなかった。

表 7 6 か月間酢酸ばく露ラットの呼吸器系の粘膜上皮細胞高 ( $\mu\text{m}$ )

部 位	対照群	低濃度群	中濃度群
観察動物数	5	5	5
気管	14.1 $\pm$ 1.7	13.7 $\pm$ 1.7	14.7 $\pm$ 1.2
細気管支	9.4 $\pm$ 0.6	9.1 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.6
平均値 $\pm$ SD			
測定部位: 気管, I 上部, 細気管支: 径 200-300 $\mu\text{m}$			

#### (4) 免疫学的解析

28 日間及び 6 か月間ばく露実験における、血液学的検査の結果を表 8 及び 9 に示す。いずれのばく露実験においても、各種の白血球数について、対照群とばく露群を比較して有意差のある変化は認められなかった。各項目の有意差は認められないものの、6 か月間ばく露において、ばく露濃度に関連した白血球数の増加傾向が認められ、リンパ球サブセットの数も増加傾向が窺われた (表 8-2)。

表 8-1 28 日間酢酸ばく露ラットの血液学的検査結果 (白血球数)

	対照群	低濃度群	中濃度群
白血球数 ( $\times 10^2 / \mu\text{L}$ )	62.8 $\pm$ 6.7	60.8 $\pm$ 6.9	64.9 $\pm$ 6.3
リンパ球数	51.3 $\pm$ 6.7	50.0 $\pm$ 8.1	53.0 $\pm$ 9.5
好中球数	10.1 $\pm$ 3.8	9.7 $\pm$ 4.7	10.7 $\pm$ 4.4
好酸球数	0.3 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.7
単球数	1.3 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.7
リンパ球 B 細胞数	5.7 $\pm$ 1.1	5.2 $\pm$ 1.1	6.8 $\pm$ 2.0
リンパ球 T 細胞数	48.3 $\pm$ 5.7	52.4 $\pm$ 5.4	46.4 $\pm$ 18.6
CD4+	27.1 $\pm$ 2.1	27.4 $\pm$ 3.7	28.7 $\pm$ 3.4
CD8+	14.8 $\pm$ 3.2	14.4 $\pm$ 3.0	12.9 $\pm$ 4.6
CD4+CD8+	2.2 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 4.3

平均値  $\pm$  SD, n=10、リンパ球 B 細胞以下は n=6

表 8-2 6 か月間酢酸ばく露ラットの血液学的検査結果 (白血球数)

	対照群	低濃度群	中濃度群
白血球数 ( $\times 10^2 / \mu\text{L}$ )	55.4 $\pm$ 21.8	62.6 $\pm$ 16.0	69.8 $\pm$ 18.6
リンパ球数	38.8 $\pm$ 9.9	48.5 $\pm$ 13.0	50.6 $\pm$ 16.1
好中球数	12.2 $\pm$ 10.2	11.4 $\pm$ 4.7	15.1 $\pm$ 3.7
好酸球数	1.6 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 1.0
単球数	2.5 $\pm$ 1.1	1.9 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.9
リンパ球 B 細胞数	6.9 $\pm$ 2.2	7.8 $\pm$ 2.1	8.2 $\pm$ 4.4
リンパ球 T 細胞数	21.0 $\pm$ 5.3	28.5 $\pm$ 6.1	31.0 $\pm$ 8.4
CD4+	19.4 $\pm$ 3.2	22.2 $\pm$ 5.4	25.3 $\pm$ 7.2
CD8+	10.8 $\pm$ 2.3	13.1 $\pm$ 2.9	15.1 $\pm$ 4.5
CD4+CD8+	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.4

平均値  $\pm$  SD, n=5

赤血球系指標については、28 日間及び6 か月間いずれも特記すべき変化は認められず、有意差のある項目は無かった（表 9）。

表 9-1 28 日間酢酸ばく露ラットの血液学的検査結果（赤血球系指標）

	対照群	低濃度群	中濃度群
赤血球数 (× 10 <sup>4</sup> / μ L)	932 ± 22	917 ± 12	925 ± 15
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.3 ± 0.3	15.0 ± 0.2	15.2 ± 0.2
ヘマトクリット値 (%)	48.9 ± 1.2	48.2 ± 0.5	48.6 ± 0.7
平均血球容積 (fL)	52.4 ± 0.3	52.6 ± 0.3	52.5 ± 0.3
平均血球ヘモグロビン量 (pg)	16.5 ± 0.2	16.4 ± 0.2	16.4 ± 0.1
平均血球ヘモグロビン濃度 (g/dL)	31.4 ± 0.4	31.2 ± 0.2	31.2 ± 0.2
血小板数 (× 10 <sup>4</sup> / μ L)	80.0 ± 2.8	74.3 ± 4.9	75.3 ± 2.8

平均値 ± SD、n=10

表 9-2 6 か月間酢酸ばく露ラットの血液学的検査結果（赤血球系指標）

	対照群	低濃度群	中濃度群
赤血球数 (× 10 <sup>4</sup> / μ L)	892 ± 16	910 ± 13	918 ± 28
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.1 ± 0.3	15.4 ± 0.3	15.3 ± 0.4
ヘマトクリット値 (%)	45.3 ± 0.7	46.6 ± 0.9	46.6 ± 1.4
平均血球容積 (fL)	50.8 ± 0.3	51.2 ± 0.6	50.8 ± 0.2
平均血球ヘモグロビン量 (pg)	17.0 ± 0.3	16.9 ± 0.2	16.7 ± 0.1
平均血球ヘモグロビン濃度 (g/dL)	33.4 ± 0.4	33.0 ± 0.3	32.9 ± 0.2
血小板数 (× 10 <sup>4</sup> / μ L)	60.4 ± 2.8	58.3 ± 4.1	50.3 ± 4.1

平均値 ± SD、n=5

28 日間及び6 か月間ばく露実験における、ラット血清中の免疫グロブリン濃度の測定結果を表 10 に示す。28 日間ばく露では IgE 値、IgG 値ともに中濃度群でわずかに高値を示す傾向が認められたが、統計学的な差は見られなかった（表 10）。6 か月間ばく露においては、IgE 値が対照群と比べて、ばく露群でやや低下する傾向が見られたが、いずれの変動も微量な変化であった。

表 10 28 日間及び6 か月間酢酸ばく露ラットの血清中免疫グロブリン濃度

	酢酸 28日間			酢酸 6か月間		
	対照群	低濃度群	中濃度群	対照群	低濃度群	中濃度群
IgE(ng/mL)	3.12±2.00	3.95±3.13	5.35±4.80	1.68±2.09	0.75±0.60	0.51±0.36
IgG(mg/mL)	4.00±2.04	4.19±1.36	4.51±1.51	8.16±1.44	9.70±1.41	9.64±1.23

n=10

n=5

6 か月間酢酸ばく露実験については、サイトカインの測定を実施した。各群 5 匹ずつのサンプルを用いた。IL-4、5、6、13 及び TNF-α は、対照群、ばく露群ともに検出限界未満であった。また、他の測定可能なサイトカインのいずれも対照群とばく露群との間に有意差を認めなかった。IL-2、IL-10 は、ばく露群の値が対照群に比べて増加傾向を示していたが、ばらつきが大きく有意差はつかない程度であった（表 11）。

表 11 6 か月間酢酸ばく露ラットの血清中サイトカイン濃度

	対照群	低濃度群	中濃度群
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	56.1 $\pm$ 14.6	42.1 $\pm$ 6.7	58.5 $\pm$ 14.7
IL-2 (pg/mL)	ND	30.6 $\pm$ 42.4	78.4 $\pm$ 127.4
IL-4 (pg/mL)	ND	ND	ND
IL-5 (pg/mL)	ND	ND	ND
IL-6 (pg/mL)	ND	ND	ND
CINC-1 (IL-8) (pg/mL)	3.3 $\pm$ 3.3	8.6 $\pm$ 8.6	4.7 $\pm$ 5.3
IL-10 (pg/mL)	1.0 $\pm$ 0.8	5.4 $\pm$ 3.4	5.6 $\pm$ 3.7
IL-13 (pg/mL)	ND	ND	ND
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	ND	ND	ND
MCP-1 (ng/mL)	3.18 $\pm$ 0.53	2.94 $\pm$ 0.37	2.47 $\pm$ 0.55
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	1.4 $\pm$ 1.3	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.2

平均値  $\pm$  SD、n=5、ND：検出限界未満

### (5) 生化学的解析

28 日間酢酸ばく露したラット血清中の過酸化脂質は、用量に相関した血清過酸化脂質濃度の増加傾向が認められ、中濃度群は対照群に比べ、有意に高い値であった (図 4a)。一方、6 か月間酢酸ばく露したラット血清中及び肺組織での過酸化脂質濃度は対照群とばく露群の間で有意差はなく、増加あるいは抑制傾向も認められなかった (図 4b)。

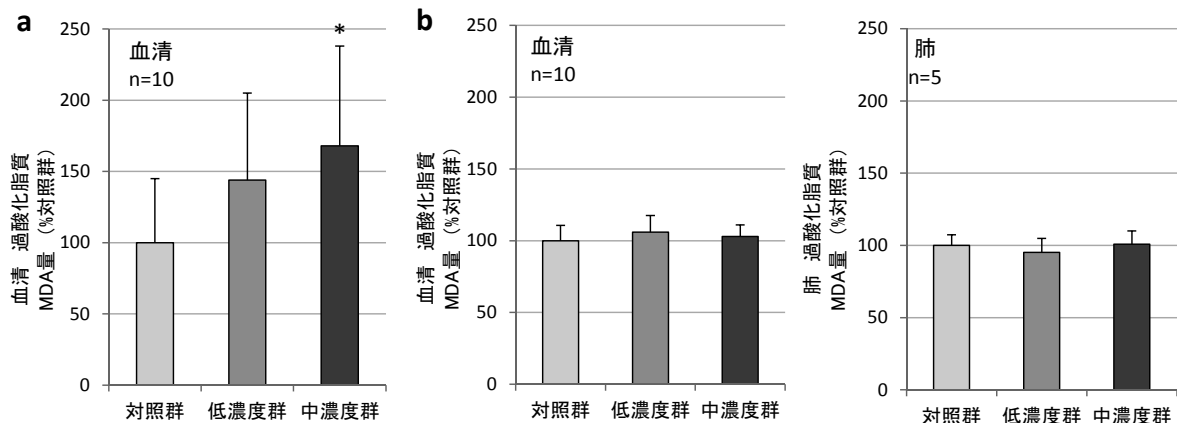


図 4 酢酸ばく露ラット血清あるいは肺組織中の過酸化脂質の濃度

a 28 日間ばく露：血清のみ各群 10 個体の平均値を示す。b 6 か月間ばく露。血清は各群 10 個体の平均値、肺は各群 5 個体の平均値を示す。いずれも、対照群を 100 とした各群の割合で示してある。エラーバーは標準偏差を示す。\*対照群に対して有意差有り ( $p < 0.05$ )

### (6) プロテオーム解析

6 か月間酢酸ばく露したラットの肺及び血清では、対照群及び中濃度群各 7 検体について解析を行った。二次元電気泳動の結果をそれぞれ示す (図 5)。画像解析に用いた複数のゲル画像の一致は良好であり、発現の変動が認められたタンパク質スポットのうち、肺で 13 個、血清で 49 個のスポットが LC/Q-TOF/MS の分析により同定された (表 12)。また、肺のタンパク質発現変動割合は 0.8 倍から 1.2 倍程度と小さかったが、血清のタンパク質の解析結果では、0.3 倍から 2 倍程度

まで、比較的大きな変動を示すスポットがいくつか存在した（表 13）。

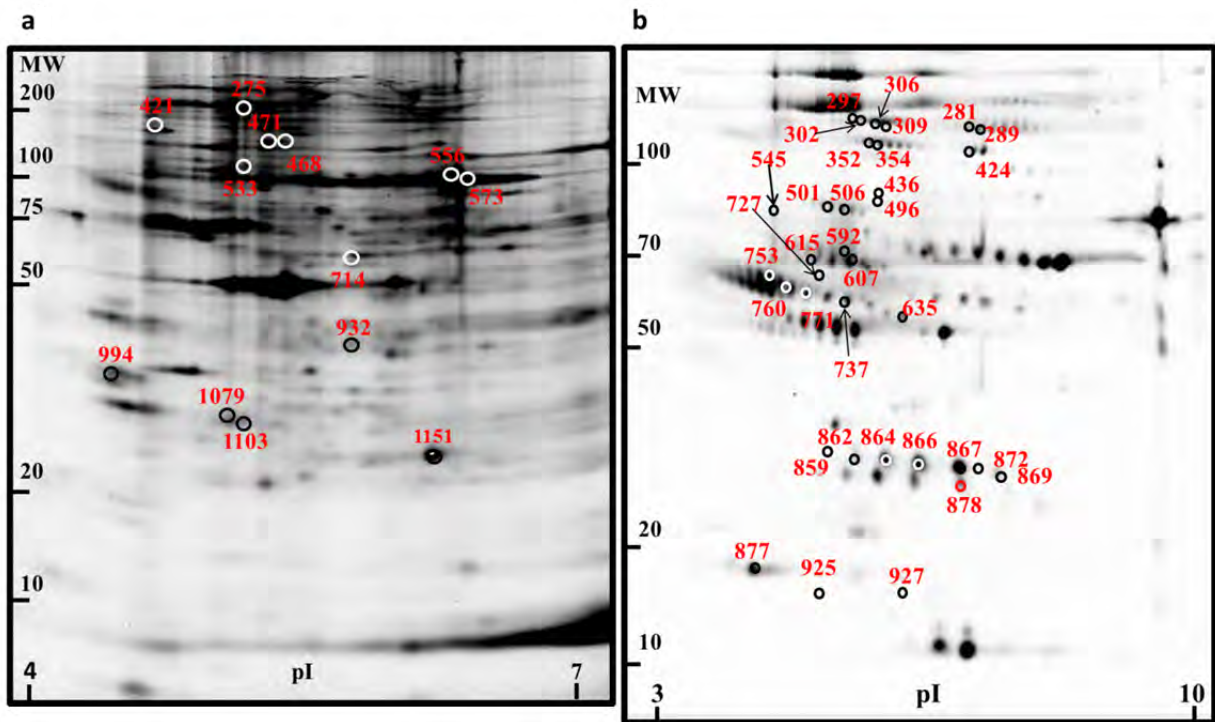


図5 6か月酢酸ばく露のラット試料を用いた二次元電気泳動像

a 肺組織の解析。b 血清の解析。縦方向はMW:分子量、横方向はpI:等電点の値（概算）を示す。同定されたスポットについてスポット番号を示している。ただし、同一のタンパク質が複数のスポットに分かれて存在している場合、一部は省略している。

表 12 6か月酢酸ばく露ラットのプロテオーム解析結果の概要

	検出(最大)	半数以上の ゲルで一致	有意差あり	同定
肺組織	1370	964	46	13
血清	941	665	110	49

数値は二次元電気泳動ゲル上のタンパク質スポットを表す

表 13-1 6か月酢酸ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質（肺組織）

スポット 番号	変動 割合	タンパク質名	機能及び関連する生物学的現象
421	1.14	熱ショックタンパク質 71	シャペロン、ストレス応答、恒常性維持
533	1.19	チューブリン $\alpha$ 1鎖	細胞骨格
994	1.14	14-3-3タンパク質	シグナル伝達経路、小胞輸送、アポトーシス、細胞周期、
1079	1.19	Rho GDP脱離インヒビター1	Rhoタンパク質の制御(細胞運動、細胞極性、細胞接着、細胞分裂)
1103	1.19	アンジオテンシン変換酵素2	血圧
1151	1.11	ホスホリパーゼA2	酸化還元酵素
275	0.81	熱ショックタンパク質 70	シャペロン、ストレス応答、恒常性維持
471	0.91	アネキシン A6	細胞膜・小胞輸送、Ras-GTPase活性化経路(MAPキナーゼ・細胞増殖)
468	0.89	アネキシン A6	
556	0.89	チューブリン $\alpha$ 1鎖	
573	0.92	アルコール脱水素酵素	アルコール代謝
714	0.90	グアニン脱アミノ酵素	核酸の分解、肝障害のマーカー
932	0.90	アネキシン A6	

表 13-2 6 か月間酢酸ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質（血清）

スポット 番号	変動 割合	タンパク質名	機能及び関連する生物学的現象
281	1.21	プラスミノゲン	凝固・線溶系
289	1.20	プラスミノゲン	
297	1.22	アルブミン	浸透圧調整、イオン類や脂質等との結合・運搬、急性応答
302	1.14	アルブミン	
306	1.18	B因子(アイソフォームCRAb)	免疫
309	1.17	B因子(アイソフォームCRAb)	
352	1.37	ゲルゾリン	アクチンの重合
354	1.44	ゲルゾリン	
424	1.19	トランスフェリン	鉄イオンの輸送、急性応答、細胞増殖
436	1.16	トランスフェリン	
496	1.73	アルブミン	
500	1.95	アルブミン	
588	1.20	フェチュインB	プロテアーゼインヒビター、骨化、炎症
592	1.45	フェチュインB	
603	1.20	フェチュインB	
607	1.44	フェチュインB	
615	1.17	ビタミンD結合タンパク質	ビタミンD・カルシウムイオン結合、ホルモンへの応答
624	1.39	フェチュインB	
692	1.10	未知	
720	1.17	トランスフェリン	
753	1.17	$\alpha$ -1マクログロブリン	プロテアーゼインヒビター、ヒト $\alpha$ -2マクログロブリンに相当、急性応答
760	1.23	$\alpha$ -1マクログロブリン	
767	1.23	$\alpha$ -1マクログロブリン	
768	1.22	$\alpha$ -1マクログロブリン	
771	1.25	$\alpha$ -1マクログロブリン	
779	1.22	$\alpha$ -1マクログロブリン	
802	1.21	ハプトグロビン	抗酸化、ヘモグロビン除去、急性応答
808	1.17	$\alpha$ -1マクログロブリン	
814	1.17	$\alpha$ -1マクログロブリン	
815	1.14	$\alpha$ -1マクログロブリン	
877	1.19	C反応性タンパク(CRP; ペントラキシン)	急性応答、カルシウムイオン結合
927	1.11	グルタチオンペルオキシダーゼ	グルタチオン結合、酸化ストレス応答
857	1.25	C反応性タンパク(CRP; ペントラキシン)	
501	0.83	アルブミン	
506	0.85	ヘモペキシン	血中ヘムの回収、糖タンパク質
545	0.87	セリンプロテアーゼインヒビターA3L	プロテアーゼインヒビター
635	0.65	$\alpha$ -1 アンチプロテイナーゼ	プロテアーゼインヒビター
727	0.68	補体C3	免疫
737	0.78	補体C4	免疫
842	0.56	トランスフェリン	
859	0.68	$\alpha$ -1マクログロブリン	
862	0.67	補体C3	
864	0.64	補体C3	
866	0.49	$\alpha$ -1マクログロブリン	
867	0.35	$\alpha$ -1マクログロブリン	
869	0.57	炭酸脱水酵素1	二酸化炭素の水和反応
872	0.52	補体C4	
878	0.34	C反応性タンパク(CRP; ペントラキシン)	
925	0.74	グルタチオンペルオキシダーゼ	



## 2 ギ酸ばく露

### (1) ギ酸濃度

図 6a に、簡易測定及び精密測定による 28 日間のギ酸ばく露期間中のチャンバー内濃度推移を示す。ギ酸ばく露時においても、動物を入れた場合には、チャンバー内濃度が目標濃度（中濃度群 5ppm、低濃度群 0.5ppm）よりも低い状況が確認されたため、ばく露開始 1 週間後からパーミエーターの温度を上げて濃度調節を行った（中濃度群 35℃から 50℃へ、低濃度群 35℃から 40℃へ変更）。その結果、28 日間のギ酸ばく露濃度の精密分析による平均値は、中濃度群 4.9ppm±2.1ppm、低濃度群 0.9ppm±0.7 ppm であり、中濃度群では目標濃度に近く、低濃度群では目標濃度の 1.8 倍程度高い濃度であった。また、簡易測定による結果は、中濃度群 4.0ppm±1.8ppm、低濃度群 0.4ppm±0.4ppm となり、精密測定よりも低い値が得られた。

図 6b に 6 か月間ギ酸ばく露期間中のチャンバー内濃度推移を示す。各群の平均値は、低濃度群が 0.8 ± 0.2 ppm、中濃度群が 7.6 ± 1.1 ppm、高濃度群が 57.0 ± 14.4 ppm であり、目標濃度（p. 44 表 1）に近い濃度を維持してばく露を実施することができた。ただし、12 週目の濃度については、高濃度群で 2 倍近くのギ酸が検出されているが、原因は不明である。なお、ギ酸を導入していない対照群では、ギ酸の濃度平均値は 0.1 ppm 未満であった。

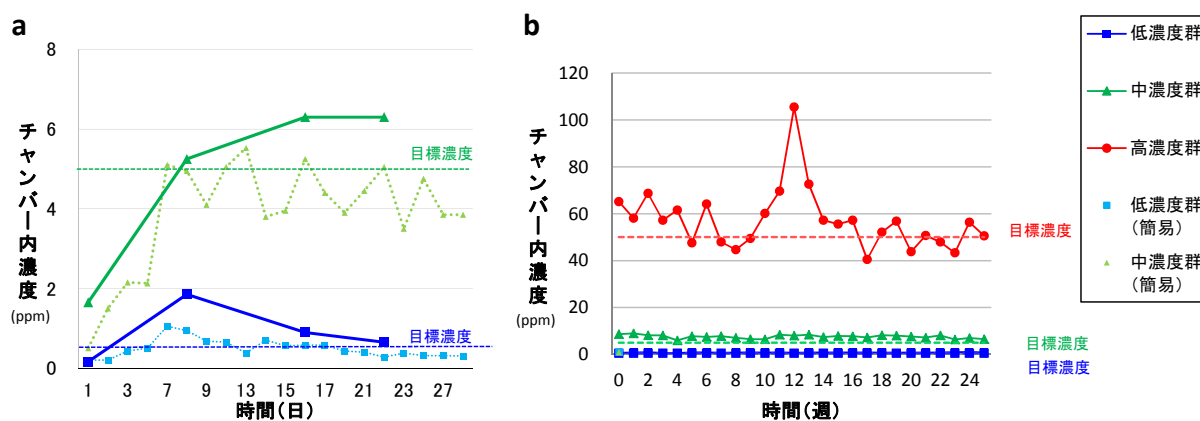


図 6 ギ酸のチャンバー内濃度推移

a 28 日間ばく露。実線の折れ線グラフはイオンクロマトグラフによる精密分析の結果を、点線の折れ線グラフは検知管による簡易測定の結果を示す。

b 6 か月間ばく露。精密分析の結果を示す。高濃度の 12 週目に異常な高値が確認された。パーミエーターあるいは測定に問題があったと思われるが、原因は不明であった。イオンクロマトグラフ用のサンプル採取時の検知管での測定値には異常は見られなかった。なお、数値は各ばく露濃度群の 2 つのチャンバーの平均値である。点線の直線は目標濃度を示す。

## (2) 体重及び臓器重量

28 日間ばく露及び 6 か月間ばく露における体重の絶対重量の推移を図 7 に示した。28 日間ばく露実験において、開始時の対照群、低濃度群及び中濃度群の体重 (平均値 $\pm$ SD) はそれぞれ、177.0g ( $\pm$ 5.3)、178.1g ( $\pm$ 5.4) 及び 177.6g ( $\pm$ 5.1) であり、終了時はそれぞれ、252.4g ( $\pm$ 12.7)、245.9g ( $\pm$ 11.9) 及び 248.0g ( $\pm$ 11.5) であった。6 か月間ばく露実験において、開始時の対照群、低濃度群、中濃度群及び高濃度群の体重はそれぞれ、100.3g ( $\pm$ 3.9)、99.9g ( $\pm$ 2.8)、97.7g ( $\pm$ 3.9) 及び 98.7 ( $\pm$ 3.0) であり、終了時はそれぞれ、376.3g ( $\pm$ 14.5)、371.6g ( $\pm$ 15.4)、370.1 ( $\pm$ 14.4) 及び 370.0g ( $\pm$ 13.3) であった。いずれの期間のばく露実験においても、対照群と、低濃度あるいは中濃度ばく露群との間には、体重の大きな変化は認められなかった (図 7)。

解剖時の主要臓器絶対重量及び相対重量について表 14 に示す。28 日間及び 6 か月間のいずれの実験においても、ばく露群に特記する変動は認められなかった。

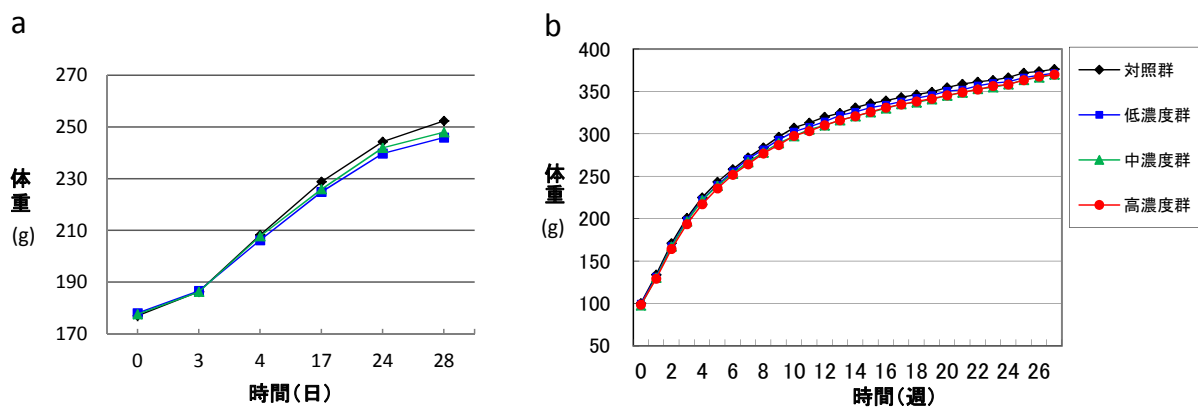


図 7 ギ酸ばく露ラットの体重推移

a 28 日間ばく露、b 6 か月間ばく露。各群 10 個体の平均値を示す。

表 14-1 28 日間ギ酸ばく露ラットの主要臓器重量

絶対重量	対照群	低濃度群	中濃度群
解剖時体重 (g)	252.4 ± 12.7	245.9 ± 11.9	248.0 ± 11.5
副腎 (左) (mg)	17.6 ± 1.3	18.0 ± 0.9	17.2 ± 1.2
副腎 (右) (mg)	15.9 ± 1.5	16.1 ± 0.8	15.6 ± 1.3
胸腺 (mg)	236.0 ± 9.6	236.0 ± 17.2	237.4 ± 12.7
脾臓 (mg)	574.9 ± 31.6	563.4 ± 21.9	565.8 ± 22.4
精巣 (左) (mg)	1492.2 ± 78.1	1446.0 ± 58.1	1451.7 ± 58.4
精巣 (右) (mg)	1441.5 ± 60.2	1406.0 ± 58.8	1367.5 ± 60.0*
腎臓 (左) (mg)	832.6 ± 35.7	827.2 ± 44.6	833.3 ± 25.4
腎臓 (右) (mg)	832.6 ± 39.1	819.3 ± 49.4	856.0 ± 79.4
心臓 (mg)	728.3 ± 36.5	714.5 ± 34.3	718.7 ± 40.5
肝臓 (mg)	9.00 ± 0.7	8.6 ± 0.5	8.8 ± 0.8
肺 (g)	772.3 ± 37.4	733.3 ± 55.7	745.5 ± 39.4
脳 (mg)	1912.2 ± 32.7	1892.2 ± 37.6	1895.5 ± 32.0

相対重量	対照群	低濃度群	中濃度群
副腎 (左) (mg)	7.0 ± 0.5	7.3 ± 0.6	7.0 ± 0.5
副腎 (右) (mg)	6.3 ± 0.5	6.6 ± 0.4	6.3 ± 0.5
胸腺 (mg)	93.7 ± 6.2	96.0 ± 5.7	95.8 ± 5.7
脾臓 (mg)	228.0 ± 11.7	229.3 ± 6.1	228.3 ± 7.1
精巣 (左) (mg)	591.4 ± 19.0	589.0 ± 32.2	586.2 ± 30.3
精巣 (右) (mg)	571.6 ± 19.3	572.6 ± 30.7	553.0 ± 41.3
腎臓 (左) (mg)	330.1 ± 9.7	336.4 ± 11.6	335.4 ± 13.2
腎臓 (右) (mg)	330.0 ± 6.3	333.2 ± 12.0	345.5 ± 32.0
心臓 (mg)	288.7 ± 7.2	290.8 ± 12.9	289.9 ± 12.3
肝臓 (g)	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2
肺 (mg)	306.5 ± 17.8	298.2 ± 18.6	300.8 ± 15.0
脳 (mg)	758.9 ± 29.6	770.7 ± 33.0	765.5 ± 29.3

平均値 ± SD、\*p<0.05

表 14-2 6 か月間ギ酸ばく露ラットの主要臓器重量

絶対重量	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
解剖時体重 (g)	376.3 ± 14.5	371.6 ± 15.4	370.1 ± 14.4	370.0 ± 13.3
副腎 (左) (mg)	18.0 ± 0.8	18.3 ± 1.0	18.4 ± 0.8	17.5 ± 1.1
副腎 (右) (mg)	15.8 ± 1.3	16.3 ± 0.8	16.0 ± 0.6	16.5 ± 1.9
胸腺 (mg)	107.4 ± 19.6	100.4 ± 6.7	105.8 ± 20.2	103.4 ± 9.7
脾臓 (mg)	694.6 ± 38.3	707.8 ± 52.0	697.8 ± 29.0	679.5 ± 21.8
精巣 (左) (mg)	1626.0 ± 36.7	1567.0 ± 247.9	1639.5 ± 44.2	1645.0 ± 58.2
精巣 (右) (mg)	1592.6 ± 37.2	1596.0 ± 46.9	1584.3 ± 37.9	1585.1 ± 54.4
腎臓 (左) (mg)	1118.5 ± 103.8	1101.0 ± 64.9	1106.3 ± 72.9	1073.8 ± 88.1
腎臓 (右) (mg)	1110.9 ± 91.8	1107.1 ± 72.0	1096.0 ± 63.6	1053.4 ± 63.6
心臓 (mg)	941.6 ± 39.3	920.0 ± 31.2	932.0 ± 35.5	907.0 ± 41.1
脳 (mg)	2092.0 ± 22.2	2106.1 ± 21.4	2107.2 ± 28.1	2103.1 ± 24.7
肝臓 (mg)	10.1 ± 0.7	10.4 ± 0.8	10.2 ± 0.5	10.1 ± 0.5
肺 (mg)	961.5 ± 62.8	963.7 ± 66.2	946.3 ± 67.3	943.3 ± 49.6

相対重量	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
副腎 (左) (mg)	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.3	4.7 ± 0.4
副腎 (右) (mg)	4.2 ± 0.4	4.4 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.4 ± 0.5
胸腺 (mg)	28.5 ± 4.8	27.1 ± 2.3	28.7 ± 5.9	28.0 ± 2.8
脾臓 (mg)	184.5 ± 5.0	190.4 ± 9.2	188.7 ± 7.2	183.7 ± 4.8
精巣 (左) (mg)	432.6 ± 15.6	420.9 ± 61.2	443.9 ± 26.8	444.9 ± 17.1
精巣 (右) (mg)	423.9 ± 21.6	430.0 ± 18.0	428.5 ± 14.7	428.9 ± 22.1
腎臓 (左) (mg)	297.1 ± 22.9	296.5 ± 15.9	298.9 ± 15.9	290.1 ± 18.6
腎臓 (右) (mg)	295.2 ± 20.5	298.0 ± 14.9	296.2 ± 14.7	284.8 ± 15.5
心臓 (mg)	250.3 ± 7.8	247.8 ± 8.6	252.0 ± 9.8	245.2 ± 8.8
脳 (mg)	556.8 ± 23.3	567.5 ± 18.4	570.1 ± 22.9	569.0 ± 20.4
肝臓 (g)	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1
肺 (mg)	255.5 ± 13.2	259.2 ± 11.1	231.2 ± 82.9	255.0 ± 10.7

平均値 ± SD

### (3) 病理組織学的解析

#### ア 28 日間ギ酸ばく露

肺の肉眼的所見では、低濃度群、中濃度群ともに特記すべき変化は認められなかった。

鼻腔は、レベル I、II 及び III の 3 か所の部位について観察した (P. 50 図 3)。いずれの部位においても、粘膜上皮における炎症細胞の浸潤や杯細胞の増加及び各上皮細胞変性等の、ギ酸ばく露に関連した変化は認められなかった (表 15)。各部位の粘膜上皮細胞の高さも、対照群と比べて、低濃度群、中濃度群ともに顕著な差はなかった (表 16)。

気管は気管支部を含め、部位 I から部位 III の 3 部位について観察した。各部位の粘膜上皮における炎症細胞の浸潤、杯細胞の増加等の変化に注目したが、低濃度群、中濃度群ともに、対照群と比べて変化は認められなかった (表 15)。各部位の上皮細胞高は、対照群と比べて、低濃度群、中濃度群ともに差は認められなかった (表 16)。

肺において、対照群、低濃度群及び中濃度群で認められた変化は、肺泡領域における炎症性病変、肺泡内のマクロファージの集簇、骨化生、血管壁の石灰化、出血及び上皮細胞の過形成など、酢酸ばく露実験の結果と同様のものではなかった (表 15)。

このうち各群に共通して比較的多く見られた変化は、肺泡の炎症性病変、マクロファージの集簇及び血管壁の石灰化であった。炎症性病変は、微小変化から中程度の病変まで認められた。肺泡領域におけるマクロファージは、各群で共通して肺組織全体にわたって存在し、特に胸膜下の肺泡で多く

表 15 28 日間ギ酸ばく露ラットの呼吸器系の組織変化

		対照群	低濃度群	中濃度群
観察動物数		10	10	10
観察項目/観察部位				
<b>気道系: 鼻腔~細気管支粘膜</b>				
炎症細胞浸潤				
鼻腔	I~III <sup>a)</sup>	— <sup>b)</sup>	10 <sup>c)</sup>	10
気管	I~III	—	10	10
細気管支	I~II	—	10	10
杯細胞の増加				
鼻腔	I~III	—	10	10
気管	I~III	—	10	10
細気管支	I~II	—	10	10
<b>肺: 肺泡管~肺泡</b>				
炎症性病変	近位部	—	2	0
〔炎症細胞の浸潤 肺泡上皮細胞の肥大・増生 肺泡壁 軽度肥厚〕		+	7	9
		++	1	1
	胸膜下	—	8	6
		+	2	3
		++	0	1
マクロファージの集簇	近位部	—	10	10
		+	0	0
	胸膜下	—	6	7
		+	4	3
細気管支・肺泡上皮増生		—	9	9
		+	1	0
肺泡内骨化生		—	8	8
		+	2	2
血管壁石灰化		—	0	5
		+	10	5
出血		—	8	8
		+	2	2

a) 観察部位: 鼻腔 (I 切歯直後, II 切歯乳頭部, III 第一臼歯部), 気管 (I 上部, II 下部, III 気管支部), 細気管支 (I 管径 200~300 μm, II 呼吸細気管支)

b) 組織変化の程度, — 変化なし, + 軽度, ++ 中等度

c) 変化が見られた動物数

見られ、より近位部での顕著な集簇<sup>しゅうぞく</sup>は認められなかった。血管壁の石灰化は、血管の1から数か所に認められるごく軽度な変化であった。以上の組織変化の各群における発生率の増加や、病変の発現頻度及び程度の強さにギ酸ばく露との関連は認められなかった。

細気管支・肺胞上皮過形成及び肺胞内出血は、いずれも発現例数は少なく、程度の低い病変であった。

また肺内細気管支の各部位における粘膜上皮の高さは、対照群と比べて低濃度群及び中濃度群で有意な差は認められなかった(表16)。

表 16 28日間ギ酸ばく露ラットの呼吸器系の粘膜上皮細胞高(μm)

	対照群	低濃度群	中濃度群
観察動物数	10	10	10
鼻腔 I <sup>a)</sup> (重層扁平上皮)	15.43 ± 0.73	15.49 ± 0.73	15.35 ± 0.76
II(呼吸上皮)	14.95 ± 0.63	15.86 ± 0.59	15.42 ± 0.78
III(嗅上皮)	51.42 ± 1.90	49.11 ± 2.76	50.45 ± 3.62
気管 I	15.10 ± 1.13	15.35 ± 1.58	15.08 ± 1.20
II	9.69 ± 1.21	9.32 ± 1.43	9.63 ± 1.40
III	6.23 ± 0.47	6.19 ± 0.13	6.37 ± 0.31
細気管支 I	9.38 ± 0.28	9.00 ± 0.35	9.14 ± 0.52
II	5.54 ± 0.21	5.24 ± 0.45	5.24 ± 0.40

平均値±SD

a) 観察部位: 鼻腔(I切歯直後, II切歯乳頭部, III第一臼歯部), 気管(I上部, II下部, III気管支部), 細気管支(I管径200~300μm, II呼吸細気管支)

呼吸器系以外の臓器では、自然発生病変として知られている心筋の炎症性病変及び腎尿細管の変性等の変化が、対照群及びばく露群に共通して見られたが、いずれも発現頻度は低く、軽度な変化であった。

#### イ 6か月間ギ酸ばく露

気管及び肺は、低濃度及び中濃度群ともに対照群と比べて、肉眼的異常は認められなかった(P.58写真1-b)。なお、酢酸の6か月間ばく露において見られたハーダー腺表面の暗赤色微小斑点は、いずれのギ酸ばく露群においても見られなかった。

鼻腔は、レベルI、II及びIIIの3か所について観察した(P.50図3)。いずれの部位においても、粘膜上皮における炎症細胞の浸潤や杯細胞の増加及び各上皮細胞変性等のギ酸ばく露に関連した変化は認められなかった(表17)。各部位の上皮細胞の高さも、対照群と比べて、低濃度群から高濃度群において顕著な差は認められなかった。

気管及び気管支は、各ギ酸ばく露群とも組織学的に対照群の組織と同様であり、粘膜上皮における炎症細胞の浸潤、杯細胞の肥大等のばく露に関連した変化は認められなかった(表17)。気管上部について上皮細胞高を測定したが、対照群と比べて低濃度及び中濃度群ともに差は認められなかった。

肺実質は、対照群及び低濃度群から高濃度群に共通して、肺胞腔及び肺胞壁における炎症性病変、肺胞腔内のマクロファージの集簇<sup>しゅうぞく</sup>、血管壁の石灰化などが見

られた。いずれもごく軽度な変化であり、また各群における発現数も少なかった（表 17）。胸膜下の変化については、ごく軽度な変化（±）を含めると、高濃度群で、対照群の 2 倍程度の例数が観察されたが、中濃度群での例数が 0 であり、用量依存性は認められなかった。

表 17 6 か月間ギ酸ばく露ラットの呼吸器系の組織変化

		対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群		
観察動物数		10	10	10	10		
観察項目／観察部位							
<b>気道系：鼻腔～細気管支粘膜</b>							
炎症細胞浸潤							
鼻腔	I～Ⅲ <sup>a)</sup> — <sup>b)</sup>	10 <sup>c)</sup>	10	10	10		
気管	I～Ⅲ —	10	10	10	10		
細気管支	I～Ⅱ —	10	10	10	10		
杯細胞の増加							
鼻腔	I～Ⅲ —	10	10	10	10		
気管	I～Ⅲ —	10	10	10	10		
細気管支	I～Ⅱ —	10	10	10	10		
<b>肺：肺泡管～肺泡</b>							
炎症性病変		近位部	—	6	5	5	8
マクロファージの集簇 炎症細胞の浸潤 肺泡上皮細胞の肥大、増生 肺泡壁 軽度肥厚	}		±	3	2	4	2
			+	1	3	1	0
		胸膜下	—	8	7	10	5
			±	0	0	0	2
		+	2	3	0	3	
肺泡内骨化生			—	10	9	9	10
		+	0	1	1	0	
血管壁鈣質沈着			—	7	7	8	8
		+	3	3	2	2	

a) 観察部位：鼻腔（Ⅰ切歯直後，Ⅱ切歯乳頭部，Ⅲ第一臼歯部），気管（Ⅰ上部，Ⅱ下部，Ⅲ気管支部），細気管支（Ⅰ管径200～300 μm，Ⅱ呼吸細気管支）

b) 組織変化の程度，—変化なし，±ごく軽度，+軽度

c) 変化が見られた動物数

呼吸器系以外の臓器では、心筋の炎症性病変及び腎尿細管の変性等の変化が、対照群及びばく露群に共通して見られた。また、酢酸 6 か月ばく露で認められたハーダー腺の暗赤色微小斑点は、いずれのばく露群においても解剖時に認められず、組織学的にも異常は見られなかった。

#### (4) 免疫学的解析

28 日間及び 6 か月間のギ酸ばく露実験において、白血球数、リンパ球サブセット検査において（表 18）、対照群とばく露群の間に統計的有意差は認められなかった。ただし、全てのばく露群において CD8 (+) 細胞数のわずかな増加傾向が見られた。

28 日間及び 6 か月間のギ酸ばく露実験において、赤血球系指標及び血小板数では、対照群とばく露群との間に統計的有意差は認められなかった（表 19）。

表 18-1 28 日間ギ酸ばく露ラットの血液学的検査の結果（白血球数）

	対照群	低濃度群	中濃度群
白血球数 ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	63.2 $\pm$ 6.1	66.1 $\pm$ 8.9	68.8 $\pm$ 13.1
リンパ球数	51.8 $\pm$ 6.7	54.4 $\pm$ 8.8	55.0 $\pm$ 13.7
好中球数	9.1 $\pm$ 3.1	9.4 $\pm$ 3.3	11.8 $\pm$ 4.2
好酸球数	0.4 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.3
単球数	1.9 $\pm$ 1.2	1.6 $\pm$ 1.3	1.8 $\pm$ 0.8
リンパ球 B 細胞数	9.1 $\pm$ 4.3	6.9 $\pm$ 1.2	8.0 $\pm$ 1.8
リンパ球 T 細胞数	37.5 $\pm$ 4.0	37.9 $\pm$ 4.9	36.2 $\pm$ 6.0
CD4+	26.2 $\pm$ 2.3	27.0 $\pm$ 3.7	25.8 $\pm$ 4.4
CD8+	10.6 $\pm$ 3.4	12.1 $\pm$ 2.6	11.2 $\pm$ 3.0
CD4+CD8+	4.8 $\pm$ 3.2	3.2 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 1.4

平均値  $\pm$  SD、n=10、リンパ球 B 細胞以下は n=6

表 18-2 6 か月間ギ酸ばく露ラットの血液学的検査の結果（白血球数）

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
白血球数 ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	38.5 $\pm$ 5.7	39.6 $\pm$ 10.0	36.9 $\pm$ 5.1	37.6 $\pm$ 8.7
リンパ球数	26.0 $\pm$ 6.0	26.0 $\pm$ 9.2	24.9 $\pm$ 6.7	25.7 $\pm$ 8.9
好中球数	10.5 $\pm$ 1.9	10.8 $\pm$ 4.1	10.1 $\pm$ 3.8	9.9 $\pm$ 3.6
好酸球数	0.5 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.5
単球数	1.5 $\pm$ 0.9	2.2 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.7
リンパ球 B 細胞数	5.3 $\pm$ 1.9	4.9 $\pm$ 3.3	5.0 $\pm$ 1.9	5.3 $\pm$ 2.4
リンパ球 T 細胞数	14.5 $\pm$ 3.2	12.3 $\pm$ 6.2	13.1 $\pm$ 3.3	13.5 $\pm$ 5.0
CD4+	14.3 $\pm$ 3.0	15.5 $\pm$ 4.4	14.3 $\pm$ 2.6	14.1 $\pm$ 3.7
CD8+	7.9 $\pm$ 1.9	8.2 $\pm$ 2.4	8.2 $\pm$ 1.9	8.5 $\pm$ 3.0
CD4+CD8+	0.7 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3

平均値  $\pm$  SD、n=10

表 19-1 6 か月間ギ酸ばく露ラットの血液学的検査の結果（赤血球系指標）

	対照群	低濃度群	中濃度群
赤血球数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	915 $\pm$ 18	927 $\pm$ 15	917 $\pm$ 14
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.1 $\pm$ 0.3	15.3 $\pm$ 0.2	15.2 $\pm$ 0.2
ヘマトクリット値 (%)	47.9 $\pm$ 1.1	48.5 $\pm$ 0.7	47.9 $\pm$ 0.6
平均血球容積 (fL)	52.3 $\pm$ 0.3	52.3 $\pm$ 0.3	52.8 $\pm$ 1.7
平均血球ヘモグロビン量 (pg)	16.5 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.1	16.5 $\pm$ 0.2
平均血球ヘモグロビン濃度 (g/dL)	31.5 $\pm$ 0.3	31.5 $\pm$ 0.3	31.6 $\pm$ 0.3
血小板数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	75.6 $\pm$ 4.5	73.4 $\pm$ 4.3	71.6 $\pm$ 9.1

平均値  $\pm$  SD、n=10

表 19-2 6 か月間ギ酸ばく露ラットの血液学的検査の結果（赤血球系指標）

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
赤血球数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	916 $\pm$ 21	925 $\pm$ 15	923 $\pm$ 17	929 $\pm$ 15
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.1 $\pm$ 0.3	15.3 $\pm$ 0.3	15.2 $\pm$ 0.2	15.4 $\pm$ 0.1
ヘマトクリット値 (%)	47.1 $\pm$ 1.0	47.8 $\pm$ 0.8	47.6 $\pm$ 0.8	48.0 $\pm$ 0.7
平均血球容積 (fL)	51.5 $\pm$ 0.3	51.7 $\pm$ 0.4	51.7 $\pm$ 0.3	51.6 $\pm$ 0.4
平均血球ヘモグロビン量 (pg)	16.5 $\pm$ 0.2	16.6 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.3
平均血球ヘモグロビン濃度 (g/dL)	32.1 $\pm$ 0.5	32.1 $\pm$ 0.2	31.9 $\pm$ 0.3	32.0 $\pm$ 0.4
血小板数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	65.1 $\pm$ 3.6	63.8 $\pm$ 5.0	63.4 $\pm$ 6.4	63.8 $\pm$ 3.6

平均値  $\pm$  SD、n=10、低濃度群のみ n=9

28日間及び6か月間のギ酸ばく露実験において、血清中の免疫グロブリン IgG 及び IgE 濃度に、有意差は認められなかった（表 20）。

表 20 28日間及び6か月間ギ酸ばく露ラットの血清中免疫グロブリン濃度

	ギ酸 28日間			ギ酸 6か月間			
	対照群	低濃度群	中濃度群	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
IgE(ng/mL)	2.72±1.48	4.25±3.36	4.99±2.14	1.75±1.24	1.27±0.68	1.16±0.42	1.56±1.16
IgG(mg/mL)	5.43±2.49	4.62±0.81	4.35±0.47	8.92±1.88	8.80±0.92	8.33±1.32	9.64±2.31
n=10				n=10			

6か月間ばく露におけるサイトカイン測定の結果を表 21 に示した。IL-12 は、低濃度群から高濃度群まで用量相関性に上昇し、高濃度群で有意差が認められた。その他、有意差の認められる項目はなかった。

表 21 6か月間ギ酸ばく露ラットの血清中サイトカイン濃度

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	33.6 ± 39.7	17.0 ± 19.5	3.4 ± 10.7	ND
IL-2 (pg/mL)	15.4 ± 48.6	46.5 ± 95.2	86.6 ± 190.8	ND
IL-4 (pg/mL)	ND	ND	ND	ND
IL-6 (pg/mL)	20.0 ± 63.1	ND	ND	ND
CINC-1 (IL-8) (pg/mL)	178.6 ± 48.9	169.4 ± 43.7	163.7 ± 35.6	192.3 ± 81.0
IL-10 (pg/mL)	5.5 ± 7.3	8.2 ± 17.1	2.1 ± 5.2	4.9 ± 7.9
IL-12 (+p40) (pg/mL)	63.4 ± 11.5	54.6 ± 12.6	76.3 ± 10.9	146.3 ± 66.4*
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	16.0 ± 16.1	6.6 ± 6.2	6.6 ± 5.3	5.0 ± 5.1
MCP-1 (ng/mL)	4.81 ± 0.40	4.53 ± 0.33	4.40 ± 0.39	4.17 ± 0.30
IFN $\gamma$ (pg/mL)	4.4 ± 11.3	9.3 ± 26.3	ND	4.7 ± 11.9

平均値 ± SD、n=10、低濃度のみ n=8、ND: 検出限界未満、\*: p<0.05

## (5) 生化学的解析

28日間ギ酸ばく露したラット血清中の過酸化脂質濃度は、ばく露濃度に相関した増加傾向を示し、中濃度群は、対照群に比べ、有意に高い値であった（図 8a）。

一方、6か月間ギ酸ばく露したラット血清中及び肺組織での過酸化脂質濃度は、対照群とばく露群の間で有意差はなく、増加あるいは減少傾向も認められなかった（図 8b）。



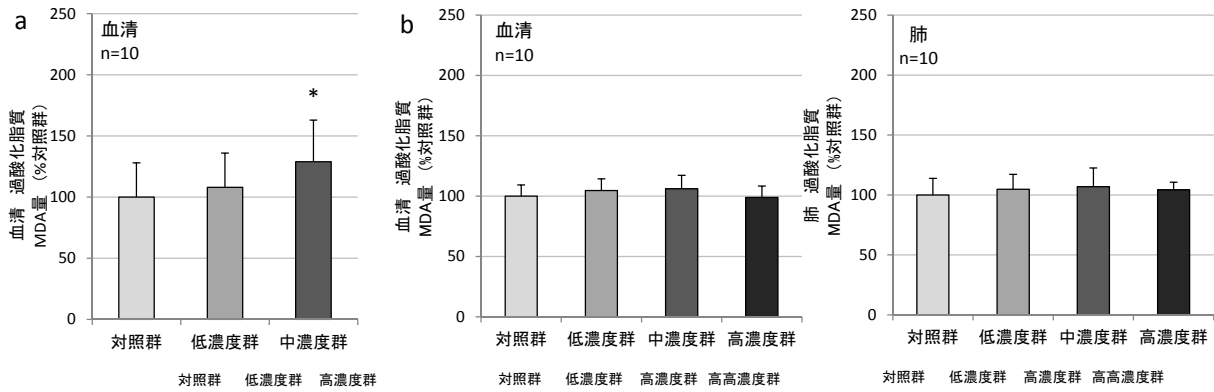


図8 ギ酸ばく露ラットの血清あるいは肺組織中の過酸化脂質の濃度

a 28日間ばく露。血清のみ10個体の平均値。b 6か月間ばく露。血清及び肺ともに10個体の平均値を示す。いずれも、対照群を100とした各群の割合で示してある。エラーバーは標準偏差を示す。\*対照群に対して有意差有り ( $p < 0.05$ )

## (6) プロテオーム解析

6か月間ギ酸ばく露したラットの肺及び血清では、対照群及び高濃度群各8検体について解析を行った。二次元電気泳動の結果を図9に、概要を表22に示した。画像解析に用いた複数のゲル画像の一致は良好であり、発現の変動が認められたタンパク質スポットのうち、肺で8個、血清で27個のスポットがLC/Q-TOF/MSの分析により同定された(表22)。肺組織及び血清のどちらの解析においても、タンパク質の発現変動の割合は0.8倍程度から1.2倍程度と小さかった。同定されたタンパク質の一覧を表23に示す。また、高濃度ばく露群で発現上昇が見られたタンパク質のひとつであるRAGEをウエスタンブロットにて解析したところ、ばく露群での発現上昇が確認された(図10)。

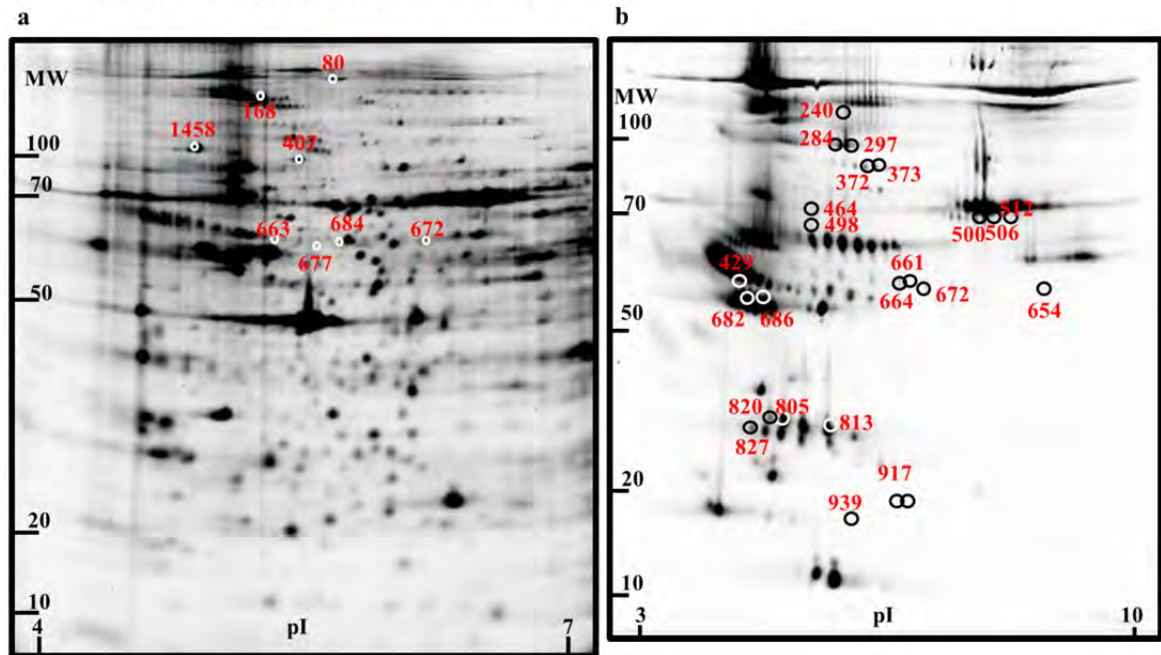


図9 6か月間ギ酸ばく露のラット試料を用いた二次元電気泳動像

a 肺組織の解析。b 血清の解析。縦方向はMW:分子量、横方向はpI:等電点の値(概算)を示す。番号は、同定されたスポットについてスポット番号を示している。ただし、同一のタンパク質が複数のスポットに分かれて存在している場合、一部は省略している。

表 22 6 か月間ギ酸ばく露ラットのプロテオーム解析結果の概要

	検出(最大)	半数以上の ゲルで一致	有意差あり	同定
肺組織	1469	998	35	8
血清	1060	675	70	27

数値は二次元電気泳動ゲル上のタンパク質スポットを表す。

表 23-1 6 か月間ギ酸ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質 (肺組織)

スポット 番号	変動 割合	タンパク質名	機能及び関連する生物学的現象
663	1.10	チューブリン	細胞骨格
672	1.20	終末糖化産物受容体 (RAGE)	糖化産物の受容体、酸化ストレス
677	1.10	チューブリン	細胞骨格
684	1.20	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 交換輸送体制御因子	イオン輸送
80	0.81	コラーゲン 6A1	細胞外マトリクス
168	0.84	セルロプラスミン	銅イオン輸送、急性応答
407	0.96	小胞体ATPase (VCP)	ユビキチン、小胞体、ゴルジ体
1458	0.95	エンドプラスミン(熱ショックタンパク質90)	シャペロン、ストレス応答

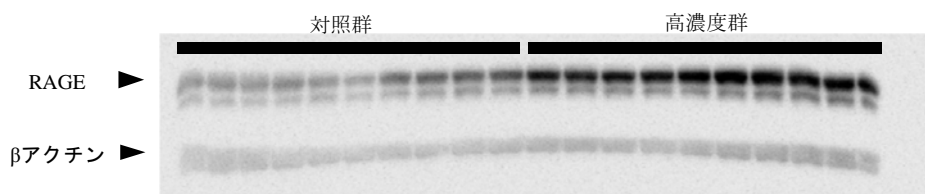


図 10 6 か月間ギ酸ばく露ラットの肺組織の RAGE タンパク質の発現変動

肺組織から抽出したタンパク質を用いたウエスタンブロットの結果を示す。対照群と高濃度群の 10 個体ずつを比較した。サンプルは、左から、個体番号 101-110、401-410 となっている。β-アクチンはデータ標準化のためのタンパク質である。シグナル強度の相対値 (RAGE の強度/β-アクチンの強度) の平均値は、高濃度群が 4.12、対照群が 2.69 であり、高濃度群でおよそ 1.5 倍の発現上昇が確認された。

表 23-2 6 か月間ギ酸ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質（血清）

スポット 番号	変動 割合	タンパク質名	機能及び関連する生物学的現象
240	1.39	$\alpha$ -1マクログロブリン	プロテアーゼインヒビター
284	1.21	$\alpha$ -1マクログロブリン	
297	1.27	$\alpha$ -1マクログロブリン	
300	1.27	$\alpha$ -1マクログロブリン	
372	1.10	B因子	免疫
373	1.09	補体C2	免疫
464	1.08	補体C3	免疫
498	1.09	補体C3	
500	1.12	トランスフェリン	鉄イオンの輸送、急性応答、細胞増殖
506	1.16	トランスフェリン	
512	1.19	トランスフェリン	
654	1.10	アポリポタンパク質H	脂質代謝
661	1.11	フェチュインB	プロテアーゼインヒビター、骨化、炎症
664	1.12	アポリポタンパク質H	脂質代謝
672	1.14	アポリポタンパク質H	
759	1.06	トランスフェリン	
904	1.35	$\alpha$ -1マクログロブリン	プロテアーゼインヒビター
915	1.45	$\alpha$ -1マクログロブリン	
917	1.28	$\alpha$ -1マクログロブリン	
939	1.24	$\alpha$ -1マクログロブリン	
429	0.93	血清内トランスフェリン	鉄代謝など
682	0.86	$\alpha$ 1アンチトリプシン	プロテアーゼインヒビター
686	0.86	$\alpha$ 1アンチトリプシン	
805	0.82	ハプトグロビン	抗酸化、ヘモグロビン除去、急性応答
813	0.88	$\alpha$ 1マクログロブリン	
820	0.91	ハプトグロビン	
827	0.92	アポリポタンパク質E	脂質代謝

### 3 酢酸・ギ酸混合ばく露

#### (1) 酢酸・ギ酸濃度

図 11 に 28 日間の酢酸・ギ酸混合ばく露期間中のチャンバー内濃度推移を示す。目標濃度は、低濃度群は酢酸 1ppm・ギ酸 0.5ppm、中濃度群は酢酸 10ppm・ギ酸 5ppm、高濃度群は酢酸 100ppm・ギ酸 50ppm であり、高濃度の酢酸を維持するためには、パーミエーターの注入容器にろ紙を用いるなどの調整が必要であった (p. 35 表 4)。精密分析による平均値は、低濃度群で酢酸 1.8ppm±0.2ppm、ギ酸 0.7ppm±0.2ppm、中濃度群で酢酸 13.5ppm±3.6ppm、ギ酸 4.5ppm±0.9ppm、高濃度群で酢酸 145ppm±42.5ppm、ギ酸 57.8ppm±20.3ppm であった。酢酸濃度は変動がやや大きく、高めの濃度で推移したが、概ね目標濃度以上の濃度を維持することができた (図 11)。

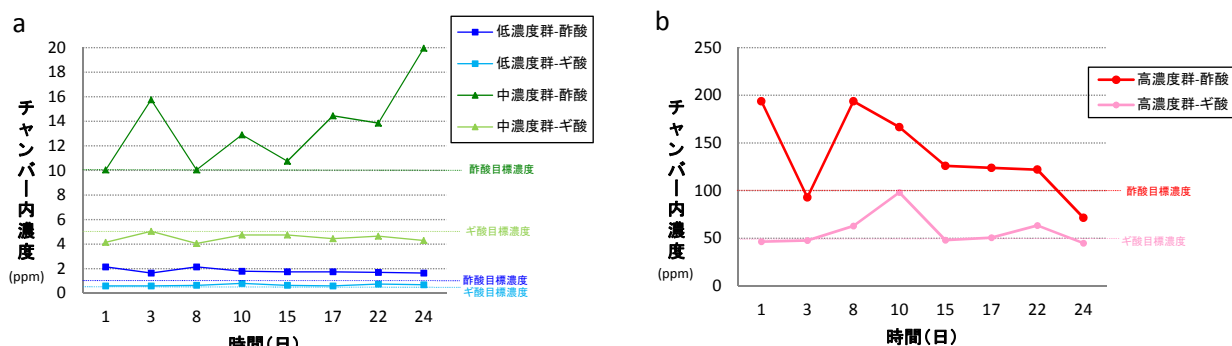


図 11 酢酸及びギ酸のチャンバー内濃度推移

a 低濃度及び中濃度の結果。b 高濃度の結果。いずれもイオンクロマトグラフによる精密検査の結果を示す。なお、数値は各ばく露群の 2 つのチャンバーの平均値を表す。点線の直線は目標濃度を示している。

#### (2) 体重及び臓器重量

28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露における体重の推移を図 12 に示す。開始時の対照群、低濃度群、中濃度群及び高濃度群の体重 (平均値±SD) はそれぞれ、165.6g (±9.5)、170.4g (±8.0)、169.0g (±8.4) 及び 167.9g (±7.4) であり、終了時はそれぞれ、254.1g (±12.1)、257.9g (±8.8)、255.5g (±7.2) 及び 234.0g (±12.9) であった。

低濃度群及び中濃度群では、対照群と同様の体重増加を示したが、高濃度群の体重増加は有意に低く、ばく露 1 週間目からすでに他の群と比べて低い

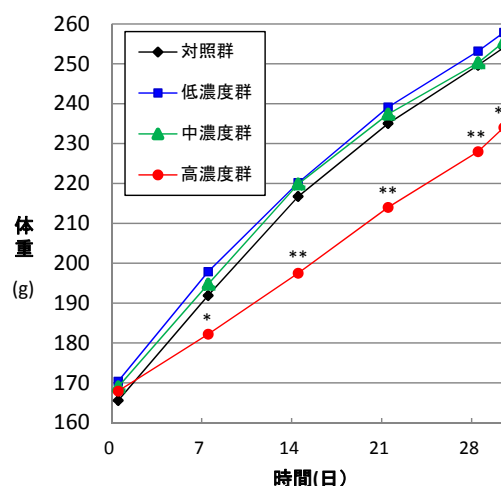


図 12 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの体重推移  
各群 10 個体の平均値を示す。\*: 対照群に比べて有意差あり (p<0.05)、\*\*: 対照群に比べて有意差あり (p<0.01)

値となっていた。

主要臓器絶対重量については、体重と同様に低濃度群及び中濃度群では対照群との違いは見られないが、高濃度群において、胸腺、脾臓、腎臓（左右）、心臓、肝臓、肺が有意に軽かった（表 24）。

一方、相対重量では、高濃度群において、絶対重量で減少の見られなかった臓器、すなわち副腎（左右）、精巣（左右）、脳が、有意に高い結果となった（表 24）。

表 24 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの主要臓器重量

絶対重量	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
解剖時体重 (g)	254.1 ± 12.1	257.9 ± 8.8	255.5 ± 7.2	234.0 ± 12.9**
副腎 (左) (mg)	16.2 ± 2.5	16.3 ± 1.4	17.7 ± 1.5	17.6 ± 1.2
副腎 (右) (mg)	14.5 ± 1.0	14.4 ± 1.9	15.7 ± 1.6	15.8 ± 1.6
胸腺 (mg)	214.6 ± 37.5	222.8 ± 12.2	221.2 ± 27.8	188.6 ± 26.4*
脾臓 (mg)	573.4 ± 27.1	580.8 ± 20.4	572.9 ± 27.6	525.0 ± 39.2**
精巣 (左) (mg)	1434.3 ± 61.6	1419.2 ± 94.6	1444.9 ± 44.2	1423.3 ± 49.7
精巣 (右) (mg)	1405.3 ± 37.4	1410.7 ± 56.4	1412.7 ± 46.4	1388.6 ± 43.9
腎臓 (左) (mg)	827.7 ± 52.9	853.9 ± 32.5	853.6 ± 59.1	771.5 ± 46.8*
腎臓 (右) (mg)	844.3 ± 58.1	841.8 ± 52.0	852.6 ± 52.2	769.4 ± 54.9**
心臓 (mg)	755.5 ± 50.1	745.1 ± 39.8	767.3 ± 29.1	684.7 ± 33.2**
脳 (mg)	1902.0 ± 47.4	1913.5 ± 35.8	1902.1 ± 27.2	1878.9 ± 43.2
肝臓 (g)	8.8 ± 1.2	9.0 ± 0.6	9.0 ± 0.5	7.9 ± 0.6*
肺 (mg)	781.6 ± 37.4	796.3 ± 31.6	786.3 ± 27.1	744.3 ± 47.1*
相対重量	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
副腎 (左) (mg)	6.3 ± 0.9	6.3 ± 0.6	6.9 ± 0.7	7.5 ± 0.8**
副腎 (右) (mg)	5.7 ± 0.4	5.6 ± 0.8	6.2 ± 0.7	6.8 ± 0.8**
胸腺 (mg)	84.7 ± 15.1	86.5 ± 6.1	86.6 ± 10.6	80.4 ± 8.8
脾臓 (mg)	225.9 ± 8.5	225.4 ± 8.5	224.2 ± 7.9	224.2 ± 7.4
精巣 (左) (mg)	565.3 ± 28.1	551.4 ± 45.8	565.7 ± 13.5	609.8 ± 38.4*
精巣 (右) (mg)	553.9 ± 22.1	547.6 ± 27.3	553.4 ± 22.7	594.6 ± 30.5**
腎臓 (左) (mg)	325.8 ± 15.0	331.2 ± 7.6	333.9 ± 16.2	329.7 ± 10.5
腎臓 (右) (mg)	332.3 ± 16.4	326.3 ± 13.3	333.5 ± 12.6	328.8 ± 14.9
心臓 (mg)	297.2 ± 7.4	289.0 ± 12.5	300.4 ± 7.9	292.9 ± 12.6
脳 (mg)	749.9 ± 34.1	742.8 ± 25.9	745.0 ± 16.4	804.5 ± 36.7**
肝臓 (g)	3.5 ± 0.4	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1
肺 (mg)	307.8 ± 10.0	308.9 ± 9.9	307.8 ± 8.1	318.0 ± 9.8

平均値 ± SD、\*p<0.05 \*\*p<0.01

### (3) 病理組織学的解析

肺の肉眼的所見では、低濃度群、中濃度群、高濃度群ともに特記すべき変化は認められなかった (p. 85 写真 1c)。

鼻腔は、レベル I、II 及び III の 3 か所の部位について観察した (p. 50 図 3)。各ばく露群の鼻腔では、いずれの部位においても、好中球や好酸球の浸潤、上皮細胞の変性等、ばく露に関連した顕著な変化や有意差のある変化は認められなかった (p. 83 写真 3-1)。ただし、高濃度群の 10 匹中 2 例のみ呼吸上皮の一部に変性像が観察された。対照群の正常な上皮に比べると、上皮が菲薄化しており、一部では好中球の浸潤が見られたり、細胞死 (アポトーシス) も認められた (p. 89 写真 4)。

気管は気管支部を含め、3 部位について観察した。各部位の粘膜上皮における炎症細胞の浸潤、杯細胞の増加等の変化に注目したが、各ばく露群ともに、対照群と比べて変化は認められなかった (P. 88 写真 3)。

鼻腔、気管、呼吸細気管支まで、各部位の上皮細胞の高さを測定したが、対照群と比べて、各ばく露群ともに差は認められなかった (表 25)。

表 25 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの呼吸器系の粘膜上皮細胞高 ( $\mu\text{m}$ )

観察部位	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群	
鼻 腔	I (重層扁平上皮)	15.04 $\pm$ 1.00	14.89 $\pm$ 1.35	14.53 $\pm$ 0.75	15.01 $\pm$ 1.04
	II (呼吸上皮)	21.45 $\pm$ 2.06	20.21 $\pm$ 2.03	21.32 $\pm$ 2.53	25.18 $\pm$ 6.70
	III (嗅上皮)	49.43 $\pm$ 2.42	50.65 $\pm$ 3.43	48.65 $\pm$ 1.96	50.00 $\pm$ 1.80
気 管	上部 (甲状腺部)	15.26 $\pm$ 2.09	15.96 $\pm$ 1.8	15.46 $\pm$ 1.87	15.39 $\pm$ 1.54
肺細気管支	呼吸細気管支	6.72 $\pm$ 0.64	7.05 $\pm$ 0.51	6.94 $\pm$ 0.46	6.72 $\pm$ 0.37

平均値  $\pm$  SD

観察部位：鼻 腔、I 切歯直後、II 切歯乳頭部、III 第一臼歯部

肺実質では、炎症細胞の浸潤など、酢酸、ギ酸の単独ばく露実験で見られた変化がわずかに見られたが、各群の間に差異は認められなかった。ただし、肺の胸膜下で見られるマクロファージの集簇<sup>しゅうぞく</sup>が、ばく露群でやや多く認められた。胸膜下の肺胞に、印環状のマクロファージ (細胞内に豊富な空胞が認められ、細胞質及び核が細胞の端に薄く観察される細胞) の集簇<sup>しゅうぞく</sup>が、ばく露群において比較的多く観察された (表 26. P. 90 写真 5)。ただし、集簇<sup>しゅうぞく</sup>は各群で観察され、ばく露群に特異的な変化ではなく、用量依存的な変化は認められなかった。

表 26 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの胸膜下マクロファージの集簇

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
集簇が認められた個体数	3	6	1	5
集簇の数の合計	3	8	2	19

n=10

呼吸器系以外の臓器では、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、副腎、精巣及び副生殖器について組織観察を行ったが、顕著な変化は認められなかった。

#### (4) 免疫学的解析

白血球数及びリンパ球サブセット検査では、B 細胞にあまり変動は見られなかったのに対し、T 細胞は中濃度群及び高濃度群で低下傾向が見られ、中濃度群では有意な低下を示した (表 27)。

表 27 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの血液学的検査の結果 (白血球数)

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
白血球数 ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	42.3 $\pm$ 10.2	42.3 $\pm$ 8.3	35.2 $\pm$ 7.4	36.7 $\pm$ 8.8
リンパ球数	36.1 $\pm$ 9.9	36.1 $\pm$ 8.0	29.5 $\pm$ 6.6	29.8 $\pm$ 10.2
好中球数	5.7 $\pm$ 1.2	5.2 $\pm$ 1.6	5.1 $\pm$ 1.4	6.2 $\pm$ 2.8
好酸球数	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.2
単球数	0.4 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.3
リンパ球 B 細胞数	5.1 $\pm$ 2.7	4.9 $\pm$ 2.1	6.5 $\pm$ 5.4	4.6 $\pm$ 2.3
リンパ球 T 細胞数	18.0 $\pm$ 6.2	17.8 $\pm$ 4.1	11.2 $\pm$ 6.1*	14.7 $\pm$ 5.2
CD4+	14.9 $\pm$ 3.6	15.0 $\pm$ 3.7	11.9 $\pm$ 3.5	12.2 $\pm$ 3.5
CD8+	7.1 $\pm$ 2.1	7.3 $\pm$ 1.7	6.0 $\pm$ 2.0	6.1 $\pm$ 2.0
CD4+CD8+	0.9 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.6

平均値  $\pm$  SD、n=10、\*p<0.05

また、中濃度群と対照群との比較において、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値に有意に増加していたが、高濃度群での増加は認められなかった。一方、血小板数は、ばく露濃度が高くなるにつれて減少傾向が認められ、中濃度群及び高濃度群において有意に減少していた (表 28)。

表 28 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの血液学的検査の結果 (赤血球系指標)

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
赤血球数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	882 $\pm$ 21	885 $\pm$ 13	906 $\pm$ 12*	899 $\pm$ 21
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.3 $\pm$ 0.3	15.3 $\pm$ 0.2	15.6 $\pm$ 0.2*	15.5 $\pm$ 0.3
ヘマトクリット値 (%)	46.8 $\pm$ 1.0	46.8 $\pm$ 0.7	47.8 $\pm$ 0.7*	47.4 $\pm$ 1.0
平均血球容積 (fL)	53.0 $\pm$ 0.2	52.9 $\pm$ 0.2	52.8 $\pm$ 0.3	52.7 $\pm$ 0.2**
平均血球ヘモグロビン量 (pg)	17.3 $\pm$ 0.2	17.3 $\pm$ 0.2	17.2 $\pm$ 0.2	17.2 $\pm$ 0.2
平均血球ヘモグロビン濃度 (g/dL)	32.7 $\pm$ 0.3	32.7 $\pm$ 0.3	32.7 $\pm$ 0.3	32.6 $\pm$ 0.3
血小板数 ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	75.7 $\pm$ 3.3	74.5 $\pm$ 3.6	71.0 $\pm$ 5.0*	66.9 $\pm$ 3.9**

平均値  $\pm$  SD、n=10、\*p<0.05、\*\*p<0.01

血清中の免疫グロブリン IgG 及び IgE 濃度は、群間での有意差は認められなかった (表 29)。

表 29 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの血清中免疫グロブリン濃度

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
IgE(ng/mL)	2.72 $\pm$ 2.11	3.27 $\pm$ 1.84	2.83 $\pm$ 2.64	2.09 $\pm$ 1.20
IgG(mg/mL)	3.30 $\pm$ 0.54	3.41 $\pm$ 0.54	3.24 $\pm$ 1.16	3.50 $\pm$ 0.94

n=10

サイトカイン濃度の測定結果を表 30 に示す。6 か月間ギ酸ばく露時と同様に IL-12 が用量依存的に増加傾向を示し、中濃度群及び高濃度群で有意に上昇したが、その増加量は 2 倍弱程度であった。IFN- $\gamma$  もばく露濃度に従って増加傾向を示し、高濃度群で有意な増加を示した。その増加量は、対照群の約 20 倍であった。

表 30 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの血清中サイトカイン濃度

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	37.7 $\pm$ 28.8	50.5 $\pm$ 33.1	50.8 $\pm$ 24.7	20.5 $\pm$ 23.1
IL-2 (pg/mL)	ND	5.6 $\pm$ 17.6	ND	ND
IL-6 (pg/mL)	ND	29.4 $\pm$ 93.0	ND	ND
IL-10 (pg/mL)	2.6 $\pm$ 3.6	2.4 $\pm$ 3.5	0.1 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 2.7
IL-12 (+p40) (pg/mL)	8.5 $\pm$ 1.4	11.4 $\pm$ 3.0	14.2 $\pm$ 3.7***	13.0 $\pm$ 2.5**
MCP-1 (ng/mL)	10.4 $\pm$ 1.3	9.7 $\pm$ 1.4	10.1 $\pm$ 1.2	10.7 $\pm$ 1.1
IFN $\gamma$ (pg/mL)	0.79 $\pm$ 1.21	1.76 $\pm$ 2.30	2.65 $\pm$ 5.80	15.79 $\pm$ 10.09*

平均値  $\pm$  SD、n=10、ND: 検出限界未満、\*、\*\* or \*\*\*: p<0.05, 0.01 or 0.001

## (5) 生化学的解析

肺及び血清中の過酸化脂質濃度は、低濃度群、中濃度群、高濃度群とも、対照群と有意な差は認められなかった (図 13)。

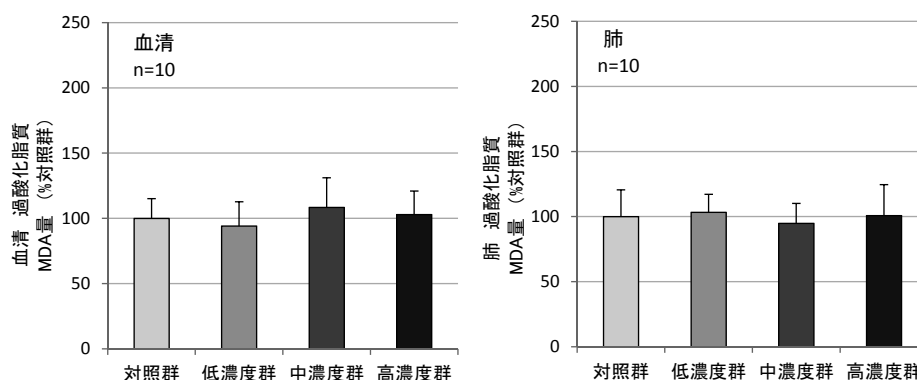


図 13 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの肺あるいは血清中の過酸化脂質濃度  
血清及び肺ともに 10 個体の平均値を示す。いずれも、対照群を 100 とした各群の割合で示してある。エラーバーは標準偏差を示す。

## (6) プロテオーム解析

肺組織では、対照群、高濃度群を 6 検体ずつ用いて解析を行った (P. 46 表 2)。概要を表 31 に、二次元電気泳動の像を図 14 に示した。画像解析に用いた複数のゲル画像の一致は良好であり、発現の変動が認められたタンパク質スポットのうち、肺で 55 個、血清で 19 のスポットが LCMS の解析で同定された (表 31)。なお、他の実験とは異なり、本ばく露実験の肺組織の解析のみ、面積の大きな電気泳動ゲルを使用したことから (図 14)、検出スポット数が多い結果となった (表 31)。



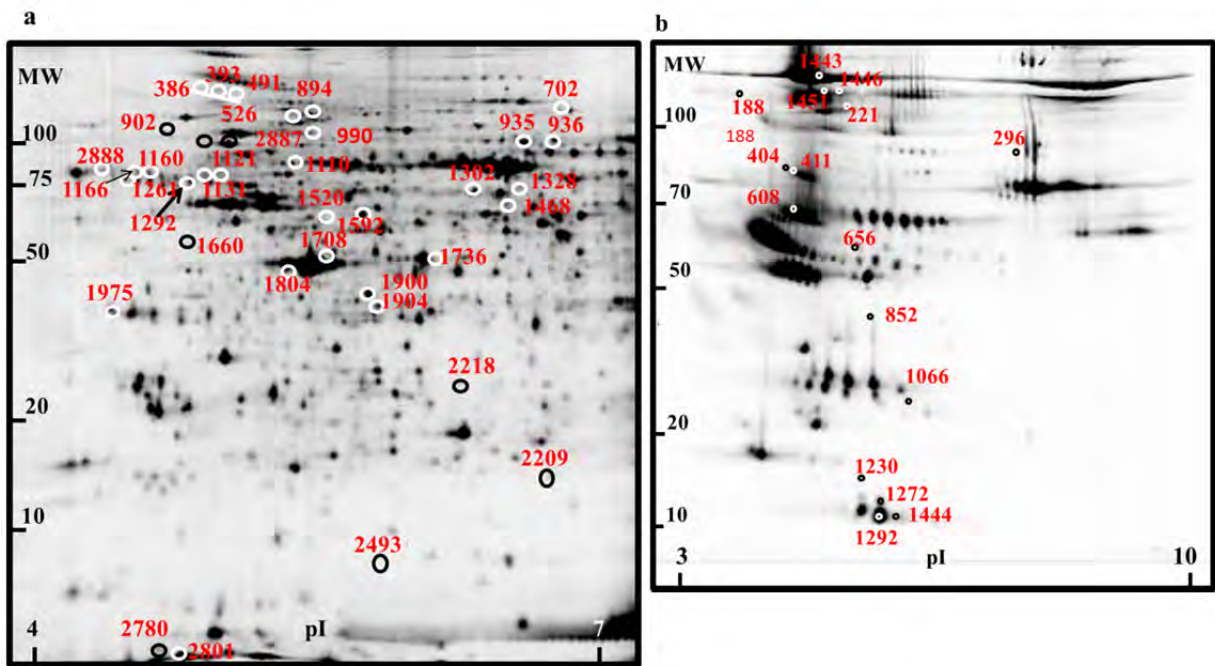


図 14 混合ばく露 28 日間のラット試料を用いた二次元電気泳動像  
 a 肺組織の解析。b 血清の解析。縦方向は MW・分子量、横方向は pI・等電点の値（概算）を示す。同定されたスポットの一部についてスポット番号を示している。

表 31 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットのプロテオーム解析結果の概要

	検出(最大)	半数以上の ゲルで一致	有意差あり	同定
肺組織	2890	2383	122	55
血清	1451	982	50	19

数値は二次元電気泳動ゲル上のタンパク質スポットを表す

肺組織及び血清のどちらの解析においても、ほとんどのスポットの変動割合は 0.8 倍程度から 1.2 倍程度と小さかったが、ラミン B1 や細胞質アクチン等、比較的大きな変動を示したものもあった (表 32)。

発現変動のあったタンパク質を表 32 に示した。また、肺組織の解析結果について、各個体の変動を視覚化するため、クラスター図を作成した (図 15)。ばく露群 (高濃度) で増加したクラスターが 2 つ、減少したクラスターが 2 つに配置された。クラスター 1 (例えばニドゲン—1 やムリノグロブリン—1) は、比較的個体差が少ないのに対し、クラスター 4 (例えばラミン B1 や細胞質アクチン 2) では、個体差が大きかった。全体として、ばく露群では発現が増加したタンパク質が少ないことがわかる。

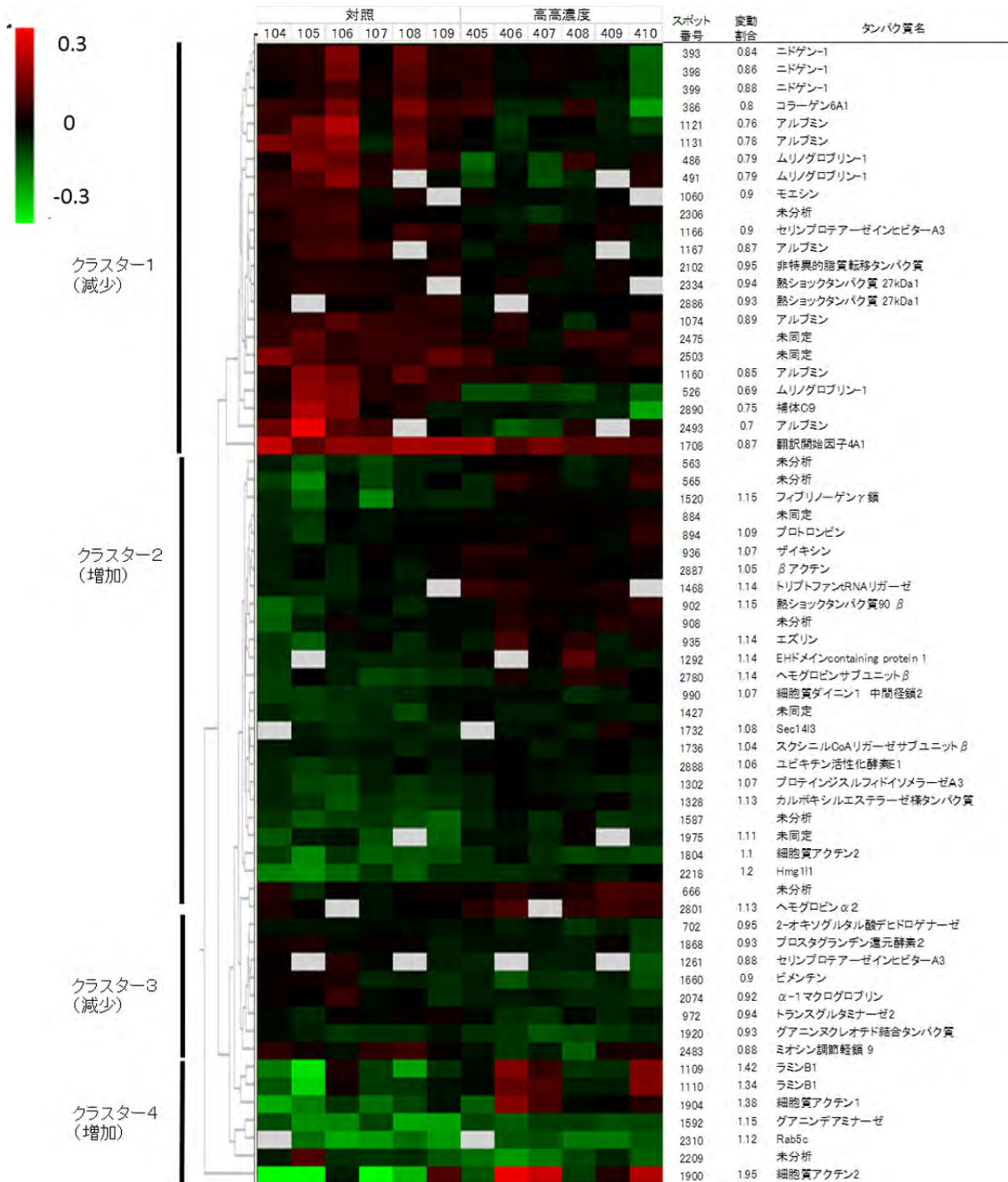


図15 28日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質（肺組織）  
 プロテオーム解析の結果、有意な発現変動があり（12個； $p < 0.05$ ）、かつ、スポット形状などから有力な発現変動の候補であると判断された64個について、クラスター解析により変動パターンを可視化した（同定された55個のスポットを含む。）。ヒートマップは全12個体の平均に対し、発現が上昇しているものが赤色、減少しているものが緑色として表示されている（0.3倍から-0.3倍の表記）。大きく4つのクラスターに分配され、クラスター1、2、3、4はそれぞれ、高濃度群が対照群に対して減少したものの、増加したものの、減少したものの、増加したものとなっている。未分析：LC/Q-TOF/MS分析を行っていないスポット、未同定：分析で同定できなかったスポット。

表 32-1 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質（肺組織）

スポット 番号	変動 割合	タンパク質名	機能及び関連する生物学的現象
894	1.09	プロトロンビン	凝固・線溶系
902	1.15	熱ショックタンパク質90 $\beta$	シャペロン、ストレス応答、恒常性維持
935	1.14	エズリン	アクチン繊維の構造に関与
936	1.07	ザイキシシ	アクチン重合調節(ストレスファイバー)、炎症、TGFシグナル
990	1.07	細胞質ダイニン1 中間径鎖2	細胞骨格、微小管、運動性
1109	1.42	ラミンB1	核膜
1110	1.34	ラミンB1	
1292	1.14	EHDドメインcontaining protein 1	纖毛、増殖因子応答、エンドサイトーシス
1302	1.07	プロテインジスルフィドイソメラーゼA3	小胞体ストレス、酸化還元ホメオスタシス、
1328	1.13	カルボキシルエステラーゼ様タンパク質	カルボン酸エステルの加水分解
1468	1.14	トリプトファンtRNAリガーゼ	タンパク質合成
1520	1.15	フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖	凝固・線溶系
1592	1.15	グアニンデアミナーゼ	拡散の代謝、慢性肝炎・脂肪肝などのマーカー
1732	1.08	Sec14I3	トランスポーター
1736	1.04	スクシニルCoAリガーゼサブユニット $\beta$	脂肪酸代謝
1804	1.10	細胞質アクチン2	細胞骨格、細胞移動
1900	1.95	細胞質アクチン2	
1904	1.38	細胞質アクチン1	細胞骨格、細胞移動
1975	1.11	HNRNPD	核酸代謝
2218	1.20	Hmg111	転写因子活性、DNA修復、炎症応答、血管内皮透過性
2310	1.12	Rab5c	シグナル伝達、エンドサイトーシス
2780	1.14	ヘモグロビンサブユニット $\beta$	酸素の運搬
2801	1.13	ヘモグロビン $\alpha$ 2	酸素の運搬
2887	1.05	$\beta$ アクチン	細胞骨格、細胞移動
2888	1.06	ユビキチン活性化酵素E1	翻訳後修飾、転写制御、アポトーシス、ストレス応答
386	0.80	コラーゲン6a1	細胞外マトリクス
393	0.84	ニドゲン-1	細胞外マトリクス(ラミニンとの相互作用)
398	0.86	ニドゲン-1	
399	0.88	ニドゲン-1	
486	0.79	ムリノグロブリン-1	プロテアーゼインヒビター
491	0.79	ムリノグロブリン-1	
526	0.69	ムリノグロブリン-1	
702	0.95	2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ	クエン酸回路、ミトコンドリア
972	0.94	トランスグルタミナーゼ2	タンパク質架橋、アポトーシス、小胞体
1060	0.90	モエシン	アクチン繊維の構造に関与
1074	0.89	アルブミン	浸透圧調整、イオン類や脂質等との結合・運搬、急性応答
1121	0.76	アルブミン	
1131	0.78	アルブミン	
1160	0.85	アルブミン	
1166	0.90	セリンプロテアーゼインヒビターA3	プロテアーゼインヒビター
1167	0.87	アルブミン	
1261	0.88	セリンプロテアーゼインヒビターA3	
1660	0.90	ビメンチン	細胞骨格、中間径フィラメント
1708	0.87	翻訳開始因子4A1	翻訳、TGF- $\beta$ シグナル

表 32-1 (続き) 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質 (肺組織)

スポット 番号	変動 割合	タンパク質名	機能及び関連する生物学的現象
1920	0.93	グアニンスクレオチド結合タンパク質	Gタンパク質、Gnai2、細胞周期、MAPキナーゼ経路
2036	0.95	アポリポタンパク質A1結合タンパク質	NAD(P)HX代謝、アポリポタンパク質結合
2074	0.92	$\alpha$ -1マクログロブリン	プロテアーゼインヒビター
2102	0.95	非特異的脂質転移タンパク質	細胞移動、細胞分裂の抑制性調節
2209	0.83	Fアチンキャッピングタンパク質 サブユニット $\beta$	細胞骨格(アクチン繊維)の制御
2334	0.94	熱ショックタンパク質 27kDa1	シャペロン、ストレス応答、恒常性維持
2483	0.88	ミオン調節経路 9	平滑筋、細胞骨格、細胞分裂、細胞移動
2493	0.70	アルブミン	
2886	0.93	セリンプロテアーゼインヒビターA3	
2890	0.75	補体C9	免疫

表 32-2 28 日間酢酸・ギ酸混合ばく露ラットの解析で発現変動の認められたタンパク質 (血清)

スポット 番号	変動 割合	タンパク質名	機能及び関連する生物学的現象
217	1.08	セルロプラスミン	銅イオン輸送、急性応答
221	1.09	セルロプラスミン	
296	1.08	補体C3	免疫
1066	1.22	ハプトグロビン	抗酸化、ヘモグロビン除去、急性応答
1230	1.16	LOC100912012(名称なし)	骨化、TGF $\beta$ 経路、プラスミノゲン活性の正の制御
1272	1.10	アポリポタンパク質A1	脂質代謝、炎症、血管内皮
1292	1.08	アポリポタンパク質A1	
1444	1.07	アポリポタンパク質A1	
1446	1.07	ムリノグロブリン-1	プロテアーゼインヒビター
188	0.90	$\alpha$ 1マクログロブリン	プロテアーゼインヒビター
404	0.91	ムリノグロブリン-1	
411	0.93	ムリノグロブリン-1	プロテアーゼインヒビター
608	0.88	$\alpha$ 1インヒビター-3(ムリノグロブリン)	プロテアーゼインヒビター
656	0.92	$\alpha$ 1インヒビター-3(ムリノグロブリン)	
852	0.94	$\alpha$ 2アンチプラスミン	凝固・線溶系
863	0.89	$\alpha$ 2アンチプラスミン	
1443	0.88	$\alpha$ 1インヒビター-3(ムリノグロブリン)	
1449	0.88	$\alpha$ 1インヒビター-3(ムリノグロブリン)	
1451	0.88	ムリノグロブリン-2	プロテアーゼインヒビター

## IV 考 察

### 1 混合ばく露による体重及び臓器重量の減少

酢酸、ギ酸の単独ばく露においては、実験中のラットの体重増加、臓器の変化、肺組織の変化は認められず、大きな生体影響は無かったと考えられる。また、28日間と6か月間のばく露期間の違いがあるものの、いずれも顕著な変化を与えるものでなかったと考えられる。

混合ばく露においては、高濃度群で顕著な体重の減少が認められた。体重の減少に伴って各臓器の重量が低下しており、一般的に比較的变化しにくい副腎、精巣及び脳の重量のみが相対的に上昇したと考えられる。体重の低下については、障害による疲弊よりも有機酸の刺激による摂食の減少の可能性が考えられるが、今回の実験では、摂餌量との関係が明らかでなく、詳細は不明である。マウスを用いたギ酸ばく露の実験でも、中濃度 128ppm のばく露群のみで、体重推移の顕著な減少が報告されている<sup>1)</sup>。ただし、同報告で、ラットを用いた 128ppm のばく露群では体重推移の減少は認められなかった。

なお、体重変化や血液学的検査、病理組織学的解析など、酢酸あるいはギ酸の単独 28 日間ばく露では見られなかった変化が、混合ばく露で認められた。二つの酸の混合による何らかの相乗効果があったかどうかは不明であるが、低濃度群や中濃度群では明確な変化が無いことから、混合ばく露の高濃度は、酢酸あるいはギ酸単独ばく露に比べると、絶対的な吸入の負荷量が多くなったことが原因と思われる。

### 2 呼吸器系への影響

病理組織学的に、酢酸ばく露、ギ酸ばく露、さらに混合ばく露の短期あるいは長期実験において、ばく露の影響として認められる変化はほとんど無く、呼吸器へ与える影響は極めて微小なものであったと考えられる。酢酸・ギ酸を含む、高濃度の酸の吸入ばく露による急性毒性としては、直接的な上皮細胞等へのダメージである炎症や壊死などが考えられるが、本実験条件下ではこうした変化はほとんど見られなかった。また、酢酸あるいはギ酸の単独ばく露の病理学的解析において、28 日間ばく露（亜急性）と 6 か月間ばく露（慢性）のばく露期間の違いによる差異は認められなかった。

鼻腔は、吸気中に含まれる粉塵やガスなどの異物を吸着し、線毛運動によって排除することで、下部気道及び肺を守る機能があるため、気道の中で最も大気中の外来因子の影響を受けやすい。ヒトに比べ、げっ歯類は呼吸量に対する表面積の割合が大きく、鼻腔構造も複雑であるため、多くの化学物質や粒子状物質が鼻腔内に吸着する。化合物の種類、部位、ばく露期間によって組織の感受性は異なるが、粘膜上皮が再生することも知られている<sup>2)</sup>。特に、種々の化学物質の障害を受けやすい部位が鼻腔のレベル II 付近であり<sup>2)</sup>、Thompson らの 90 日間ギ酸ばく露実験でも、

128ppm の高濃度では嗅上皮の変性が明確に認められている<sup>1)</sup>。今回の混合ばく露実験の高濃度群で、レベル II 付近の呼吸上皮にわずかな変性像が認められたが、例数は 2 例と少なく、顕著な壊死像や、再生、扁平上皮化生等は認められず、一時的な反応性の変化と考えられる。

塩酸や硝酸のような刺激性ガスは、高濃度のばく露により、非免疫的な喘息様症状、すなわち反応性の気道機能障害症候群 (reactive airways dysfunction syndrome: RADS) を引き起すと言われる<sup>3)</sup>。酢酸も例外ではなく、ラット<sup>4)</sup>やモルモット<sup>5)</sup>を用いた急性ばく露の実験では、一時的に肺抵抗や伸縮性の変化を引き起すが、ほとんどの場合、ばく露後には症状が回復すると報告されている。また、ヒトのぜん息患者へのばく露が RADS のような症状を引き起こしたという報告がある<sup>6)</sup>。酢酸がぜん息患者のアレルゲンとなったという報告は少ないが、症例報告として、職業的ばく露が、ぜん息患者に数十年ぶりにぜん息の症状を惹起したというものがある<sup>7)</sup>。

本研究では、肺機能に関しての動物試験を行っておらず、RADS のような反応性の症状があったかどうかは不明であり、また、ぜん息症状の増悪に関しては、健常ラットを用いているため議論できない。少なくとも、いずれのばく露実験においても、気管支の筋層の変化や、炎症細胞の顕著な集簇<sup>しゅうぞく</sup>はばく露群で認められず、免疫系の変化も非常に少なく、一般的なぜん息と診断される結果は見られなかった。

作業環境許容濃度の 10 倍程度のレベルであれば、6 か月間の慢性的なばく露は健常ラットの気管支にほとんど影響を与えないことが明らかになり、有機酸類によるアレルギーとの関連を考えるうえで重要なデータになると考えられる。

肺実質では、酢酸、ギ酸の個別ばく露において、マクロファージの集簇<sup>しゅうぞく</sup>に、群間の違いは認められなかったが、混合ばく露にのみ、わずかではあるが胸膜下の集簇<sup>しゅうぞく</sup>巢に量的な違いが認められた。印環状マクロファージの集簇<sup>しゅうぞく</sup>は、対照群にも観察されている像であり、ばく露による特異的な変化ではないが、高濃度群で比較的多く認められた。酢酸は生体内ではケトン体に代謝され、リン脂質やステロイドに取り込まれることが知られているが<sup>8)</sup>、マクロファージの空胞に含まれる物質が有機酸類に関連した代謝物かどうかを含め、今回の実験における有機酸類ばく露の直接的、間接的な因果関係は不明である。

また、混合ばく露の肺組織のプロテオーム解析の結果では、アクチン、エズリン、モエシン、アクチンキャッピングタンパク、グアニンヌクレオチド結合タンパク質、ザイキシン、Hmg111 等、細胞骨格をはじめとする細胞移動や白血球動員<sup>しゅうぞく</sup>に関連する分子の変動がわずかに見られ、炎症細胞の浸潤やマクロファージの集簇<sup>しゅうぞく</sup>と関係している可能性が示唆された。

### 3 凝固系への影響

酢酸あるいはギ酸の単独ばく露実験では、対照群とばく露群の血液学的性状に有意な変化が見られなかったのに対して、混合ばく露の実験では、血小板の数が有意に減少しており ( $p < 0.01$ )、また、用量依存的に減少していた。血小板は、主に血液凝固系で重要な役割を果たし、傷の治癒、炎症反応、免疫応答、血管の透過性、血栓溶解など、さまざまな反応に関与する<sup>9),10)</sup>。ヒトの場合、血小板の著明な減少では出血傾向が、上昇では血栓傾向と出血傾向の両者が見られる<sup>11)</sup>。

混合ばく露実験の結果では、ばく露個体に明らかな出血傾向は認められなかったが、これら有機酸のばく露が凝固系への関与を示唆する点はいくつかある。高濃度群の No. 404 は採血の際に他の部位からの出血があったことと、チャンバーの濃度設定の予備実験個体に頭蓋内出血が複数例認められたことは興味深い(ただし、この予備実験の際は、設定よりかなり高濃度になっていた時期がある)。

また、プロテオーム解析でも、凝固系に関連するタンパク質がリストアップされた。混合ばく露群の血清中で、 $\alpha$ -2 アンチプラスミンが血清中で減少していた。特に、 $\alpha$ -2 アンチプラスミンはプラスミンの抑制因子であり、フィブリンの沈着と溶解(線溶)のバランスに重要な役を果たしている。

肺組織の解析結果では、フィブリノーゲンとプロトロンビンの増加も見られた。これらについてはプロテオーム解析結果の増減の程度は非常に低く、 $\alpha$ -2 アンチプラスミンについてはウエスタンブロットでの発現量の再現ができなかった。このことは、血小板の減少が見られた混合ばく露の実験においてのみ得られた結果である。また、Thompson らのラットのギ酸の吸入ばく露実験(90日間)においては、最高濃度群(128ppm)においてのみ、有意な血小板の減少が見られており<sup>1)</sup>、本実験との類似性があった。

なお、酢酸、ギ酸ともに、ヒト症例研究(いずれも経口ばく露)では、消化管内での出血や凝固性障害等、血液系への影響も数例報告があるものの<sup>12),13)</sup>、いずれも重度な事故例であり、本動物実験と単純に比較できるレベルではない。しかしながら、本研究の中で、酸の負荷が大きい混合ばく露群で、血小板の有意な減少が引き起されたことは、酢酸及びギ酸が凝固系に何らかの影響を及ぼし得ることを示したという点で重要である。ただし、吸入ばく露により、どのような経路で血小板の減少につながったのかは不明である。

### 4 ストレス応答の痕跡

本研究では、血清中の免疫グロブリン、サイトカイン、酸化ストレスマーカー、プロテオーム解析など、分子レベルでも詳細な影響評価を行ったが、各物質の単独あるいは混合ばく露において顕著な変化を示す項目は無かった。これは、吸入ばく露において影響を受けやすい鼻腔や気道の組織観察においても著明な変化が認めら

れなかったこととも一致する。しかしながら、いくつかの項目において、有意差が認められたことは事実であり、本項で議論したい。

これらの変化は、ストレス応答、言い換えれば恒常性の維持のための正常な生体の反応を表していると考えられる。過去の知見からも、酢酸及びギ酸が刺激性物質として生体にストレスを与えることは明白である<sup>14)~17)</sup>。本研究では、慢性ばく露実験を前提としているため、作業環境許容濃度を基準に設定しており、また、週に5日間の5時間/日の間欠ばく露であった。長期間のばく露であることを考慮しても、刺激物質としての負荷が低かったために、分子レベルでの変化量もわずかであったと考えられる。また、長期間のばく露期間の末に、初期の刺激物へのストレスに対して慣れが起こったことも考えられる。

#### (1) 免疫グロブリン及びサイトカイン

有機酸類に対する生体の免疫応答を評価するため、免疫グロブリン (IgG 及び IgE) やサイトカインの血清中の濃度を測定した。本研究を通して、ばく露群での著明な免疫系の変化は認められなかった。特に、ぜん息等アレルギー症状に重要な IgE、IL-4、IL-13、IFN- $\gamma$  等のサイトカインの連動した変化は見られなかった。

また、血清のプロテオーム解析において、補体 C3、補体 C4、B 因子などの増減が認められ、自然免疫系の働きがばく露群ではやや活発だった可能性が示唆される。しかし、わずかな変動であり、組織学的観察でも炎症細胞の顕著な増加等は見られておらず、概して免疫系への影響は微小であったと考えられる。

本研究においては、固形状の異物や生体高分子等の異物が呼吸器系へ侵入して直接に免疫系を刺激することは想定されないが、有機酸類による呼吸器系へのダメージから、二次的に感染などが起こりやすくなることもあり得る。しかし、これら IgE や補体のわずかな増加が具体的にどのような刺激により引き起こされたのかは不明である。

また、6 か月間単独ばく露と 28 日間混合ばく露の実験では、免疫系・炎症反応に関連するサイトカインの測定を行ったが、ほとんどのサイトカインが検出限界未満、あるいは、ばく露群と対照群間に有意差はなかった。しかし、ギ酸 6 か月間ばく露実験では IL-12 が 2 倍程度ではあるが、ばく露群において有意に上昇しており、混合ばく露では高濃度群で IL-12 及び IFN- $\gamma$  が有意に上昇していた。

一般的に、強い刺激性物質の吸入により、呼吸器系では壊死、炎症、嗅上皮の扁平上皮化生等が起こりうる<sup>2)</sup>。これらのサイトカイン濃度の上昇も、ばく露実験における一部の呼吸上皮等の障害から引き起こされた炎症反応に関連していると推測される。IL-12 は特に活性化したマクロファージや B 細胞が産生し、NK 細胞を活性化させ、IFN- $\gamma$  を強く誘導する作用がある。IFN- $\gamma$  は主にヘルパー T 細胞やキラー T 細胞が産生するが、IL-12 により活性化された NK 細胞や NKT 細胞も



産生する<sup>18),19)</sup>。

混合ばく露実験で、胸膜下マクロファージの集簇<sup>しゅうぞく</sup>巣がばく露群でわずかに増加しており、IL-12 及び IFN- $\gamma$  の増加はこれに関連している可能性もある。混合ばく露実験のプロテオーム解析結果は、サイトカインやエンドサイトーシス等に関連するタンパクの変動が多く、白血球の活動に示唆的なデータではあるが、マクロファージ集簇<sup>しゅうぞく</sup>巣の観察例とサイトカインの変化は必ずしも対応しておらず、また変化自体が微小なものであるため、評価は難しい。

また、サイトカインの機能は非常に動的であり、複雑なサイトカインネットワークを作ることから、解剖時の血液の測定だけでその全体を捉えることは困難である。例えば、呼吸器系への影響に対しては、様々な炎症細胞や上皮細胞が反応に関わり、初めに刺激を受けてからの反応時間による変化も大きい。実際に、肺組織サンプルから予備的に行ったりアルタイム PCR 測定では、IL-12a 及び IL-12b の mRNA の発現はばく露群で上昇は認められず、ELISA による血清中の IL-12 の差異は再現されなかった。

## (2) 酸化ストレス

呼吸器系に限らず、さまざまな化学物質や外部刺激は、種々の活性酸素種の酸性を介して酸化ストレスを誘導し、細胞にダメージを与える。酸の吸入ばく露による急性肺障害 (ALI) などで血中の過酸化脂質 (MDA) を含めた酸化ストレスの指標が上昇する報告もある<sup>20)</sup>。本ばく露実験でも、著明な変化ではないものの酸化ストレスの変動に関連する結果がいくつか確認された。

酢酸あるいはギ酸の単独 28 日間ばく露の結果では、MDA の値がばく露群で有意に上昇が見られたのに対し、6 か月間ばく露で有意差はなかったが、この原因は明らかではない。ばく露が長期間に及んだことで、回復傾向に至った可能性もあるが、混合ばく露の 28 日間でも有意差のある変動は見られなかった。有意差の認められた 28 日間の酢酸あるいはギ酸の単独ばく露では、測定値のばらつきがやや大きいこともあり、意義のある変化とは考えにくい。また、プロテオーム解析では、熱ショックタンパク (Hsp90、Hsp70) やトランスフェリン、セルロプラスミン、グルタチオンペルオキシダーゼなど酸化ストレスの応答を示すタンパク質の変動がいずれの解析結果でも見られた。

さらに、ギ酸 6 か月間ばく露の実験では、最終糖鎖産物受容体 (RAGE) の発現が 1.5 倍程度に上昇していることが確認された。RAGE は、糖尿病、動脈硬化など酸化ストレスを伴う慢性炎症性疾患での病態に関与することで知られ、ディーゼル排出ガスばく露、喫煙さらに COPD (慢性閉塞性肺疾患) との関連も注目されている。RAGE タンパク質は、肺胞上皮・肺胞マクロファージなどに存在し、炎症反応やアポトーシスのシグナルを活性化されると言われる<sup>21)-23)</sup>。今回の結果では、ウ

エスタンブロットングにより、1.5 倍程度の発現上昇は確かに確認されたものの、応答する IL-6 やそのほか下流因子の変動は確認されておらず、大きな影響は無いものと考えられた。

### (3) 急性相反応

急性相タンパク質とは、特に炎症の急性期に血中に増減するタンパク質の総称であり、急性相タンパク質の変動は急性相反応と呼ばれ、生体防御のための変化だと考えられている<sup>24)-26)</sup>。ただし、これらのタンパク質の変動は必ずしも急性的な反応だけではなく、慢性的な炎症反応の時にも持続すると言われる<sup>26)</sup>。外部刺激に対して、数時間内に起こる白血球の動員やサイトカインの上昇に続き、CRP、アミロイドなどは数日後の増加あるいは減少が見られる<sup>26)</sup>。急性相タンパク質は少なくとも 25% 程度の変化が見られるものを指すが<sup>26)</sup>、数千倍にまで上昇するタンパク質もある。今回、プロテオーム解析から、いずれのばく露実験においても、対照群と比べて、ばく露群での急性相タンパク質の増減があることが明らかになった。

例えば、増加タイプの急性相タンパクとして知られる $\alpha$ -2 マクログロブリン（ラットでは $\alpha$ -1 マクログロブリン）、 $\alpha$ -1 アンチトリプシン、フェチュイン、フィブリノーゲン、プラスミノゲン、ハプトグロビン、セルプラスミン、補体 B、補体 C、アポリポタンパク質等が、各ばく露実験のばく露群において発現の増加したスポットとして検出された。一方、減少タイプの急性相タンパクであるアルブミンも発現減少スポットとして検出された。なお、肺組織を用いた解析についても、肺に血管が多く含まれ還流せずに採取していることを考慮すると、血液中のタンパク質変動が反映されていることが推測される。

しかし、これらのほとんどのタンパク質の変動幅が小さく、群内での個体差があるものもある（クラスター4 のラミン B1 や細胞質アクチン 2 等）。また、複数のスポットに分かれて存在するタンパク質は必ずしも全てのスポットで増加あるいは減少しているとは限らず（アルブミンのスポット番号 500 及び 878、C 反応性タンパク質のスポット番号 857 及び 878）、単一のスポットの変動割合が大きい場合も、全タンパク質の発現量としては変化が認められないこともあり、解釈は難しい。

急性相タンパク質の一種でもあるプロテアーゼインヒビターは、血液中に特に高濃度で存在しており、変動はとらえられやすく、本解析でもムリノグロブリン-1、 $\alpha$ -1 マクログロブリン等いくつもリストに上がっている。プロテアーゼインヒビターは、血液中、組織中に多く存在するさまざまなプロテアーゼを抑制するもので、プロテアーゼとの濃度バランスは重要であり、外部からの毒物等の無毒化、生体防御に重要な役割を担っている<sup>27), 28)</sup>。ヒトでも $\alpha$ -1 アンチトリプシンな

どプロテアーゼインヒビターの遺伝疾患は、重篤な肝炎や肝硬変、肺気腫に関連し、ぜん息や腎症、すい炎などの炎症性疾患との関連も弱いながら示唆されている<sup>29)</sup>。

28日間混合ばく露においては、体重増加の抑制などに加え、プロテオーム解析の結果でも変動したタンパク質数が多く、比較的変動幅が大きかったものが多い。ムリノグロブリン-1はヒトの $\alpha$ -1インヒビター-3に相当するものと考えられており、やはり血清中に多量に含まれる。ムリノグロブリン-1の減少は、急性相反応の一つとして古くから知られており、アジュバントによる関節炎ラットでは、血清中のムリノグロブリンは20日後までに8分の1程度まで減少していた<sup>30)</sup>。また、冬季のクレイとコンクリートでのラットの飼育条件を比較したプロテオーム解析では、コンクリートの条件では、体温の低下、体重の減少などのストレスによる変化に差異が認められ、ムリノグロブリン-1、 $\alpha$ -2マクログロブリンなどに0.67倍程度の減少が見られた<sup>31)</sup>。

プロテアーゼインヒビターをはじめとする急性相タンパク質の変動は、上述の実験的関節炎から<sup>30)</sup>、COPD<sup>32)</sup>、あるいは腫瘍<sup>33)</sup>まで、種々の病変で報告されており、外部刺激に対する全身性の炎症反応を反映しており、一般的なものであることがわかる。また、血清中の変動タンパク質の種類や変動幅が、個体の疾病の種類や重篤度を表現するものではないと考えられる。

本実験においては、ばく露群と対照群を比較して、いくつもの急性相タンパク質の変動がプロテオーム解析で認められたものの、その変動幅は小さく、また、組織学的に顕著な変化が見られるような個体への影響は無かった。急性相タンパク質の性質や機能についてはいまだに未知な部分が多く、本研究の結果は、一つの事例として有用であると考えられる。

## 5 結 論

酢酸あるいはギ酸は刺激性物質として、急性的な障害性の影響を与えることが知られているが、本研究から、作業環境許容濃度程度の亜急性又は慢性の吸入ばく露では、呼吸器系に及ぼす影響は微小であり、また、免疫系へ及ぼす影響も非常に小さいことが分かった。高濃度の酢酸・ギ酸の混合ばく露（それぞれ100ppm、50ppm）では、体重増加の抑制、IL-12及びIFN- $\gamma$ の上昇、血小板の減少が観察されたが、呼吸器系をはじめとする器質的な障害性の変化は認められなかった。分子レベルでの変化としては、各実験を通してストレス応答性の変化が示唆されたが、恒常性を維持するための生体の正常な反応であると推察される。