

## 低用量の有機溶剤を条件刺激とする嗅覚嫌悪条件づけ手続き

北條 理恵子\*<sup>1</sup>, 柳場 由絵\*<sup>1</sup>, 鷹屋 光俊\*<sup>2</sup>  
土屋 政雄\*<sup>3</sup>, 安田 彰典\*<sup>1</sup>, 小川 康恭\*<sup>1</sup>

最近の職場における健康問題は、ごく低濃度の化学物質のばく露が原因で引き起こされることがほとんどである。有機溶剤等の化学物質は許容濃度以下の低濃度でにおいを生成する場合があります、その影響が過敏症状等の発症に関連する可能性も懸念されている。においによる病的状態の発症機序として、家庭あるいは職場環境に由来する化学物質のばく露によって種々の健康影響をもたらされた際、その時に嗅いだにおいが苦痛や恐怖心とともに記憶され、後に同様なにおいをわずかでも嗅ぐと不快な症状が誘発されるという「嗅覚嫌悪条件づけ仮説」があるが、実証実験はほとんど行われていない。そこで本研究ではラットを使用し、低用量の有機溶剤による嗅覚嫌悪条件づけが成立しうなのか、また、有機溶剤が条件刺激 (conditioned stimulus, CS) として機能しうのかをキシレンを用いて検証した。その結果、従来の味覚刺激をキシレン水溶液による「におい」刺激に置き換えても、嫌悪条件づけ手続き後の嗜好テストにおいてCSへの回避反応が生じており、「におい」を条件刺激とする嫌悪条件づけが成立する結果が得られた。すなわち、本実験で使用した濃度であればキシレン水溶液もCSとして有効に機能することが示唆された。今後はさらに検討を重ね、条件づけ仮説の検証のみならず本研究法を応用し、未知の化学物質の毒性の見極め、様々なCSの使用による有効性の検討、嫌悪条件づけ成立後の「におい」に対する閾値変動の有無を客観的に調査する方法等の模索も視野に入れ、研究を進めていく予定である。

**キーワード:** 嫌悪条件づけ, ラット, 嗅覚刺激, キシレン, 塩化リチウム (LiCl)

### 1 はじめに

職場におけるにおいに関する健康影響は、近年になりかつての高濃度の化学物質の悪臭により喚起されたものから低濃度の化学物質のばく露で生じるものへと変化を遂げた<sup>1,2)</sup>。問題の多くは、特に許容濃度以下の化学物質の慢性吸入ばく露が原因で引き起こされる<sup>3,4)</sup>。

最近、室内のトルエンやキシレン、ホルムアルデヒドにより呼吸器系等の不快感を訴えるシックハウス症候群<sup>5)</sup>、および許容濃度以下の低濃度ばく露により引き起こされる激烈な過敏症状が懸念されている<sup>6-8)</sup>。これらの発症機序や病態等は不明な点が多く、従来あるアレルギーや中毒の発症機序では説明できないと考えられているが、過去に高濃度の単回ばく露あるいは低濃度の化学物質を長期間にわたって反復ばく露された履歴により発症すると推測されている<sup>9)</sup>。発症メカニズムについては、Siegelら (1997) が「不快なおいに対するストレス回避のための条件づけされた学習行動」とする仮説を提唱した<sup>9)</sup>。この仮説は嗅覚刺激による嫌悪条件づけ仮説というものである。家庭あるいは職場環境に由来する化学物質のばく露により種々の健康影響をもたらされた場合、その時に嗅いだにおいが健康影響に伴う苦痛や恐怖心とともに記憶され、後に同様なにおいをより低濃度で

嗅ぐと不快な症状が誘発されるという仮説である。すなわち、これらにおいによる健康影響は化学物質の今までにいわれている毒性学上のメカニズムに基づくものではなく、においの認知を介したメカニズムで発生している可能性を考えることができる<sup>10)</sup>。しかしながら、原因として疑われている化学物質の多くが有機溶剤であることと発症時のばく露濃度が非常に低いことから、今までに実証実験はほとんど行われていないのが実情である。今後このような低濃度の化学物質のにおいにまつわる問題は増えることはあっても減ることはないと考えられるため、これらに対する対策が必要と思われる。そのためには低濃度の化学物質のにおいを鋭敏に検知、測定、評価、そして分析することが重要となる。

一方、動物実験によりにおいの影響を研究する場合、今までの毒性研究とは異なる困難が生じる。北條ら (2008, 2011) によると、最も頻繁に使用される実験動物であるげっ歯類の嗅覚はヒトのおよそ100倍の感受性があると報告している<sup>11,12)</sup>。しかしながら、低濃度であればあるほど、におい源である気体の濃度を制御するために大掛かりな装置と精緻な実験方法が必要となる。本研究では低濃度でのにおいの影響を検討できる簡易で簡便な実験方法の開発を目指した。

本研究では、ラットを被験体として化学物質の「におい」(嗅覚と味覚を完全に分離して評価はしていないので「」付けとした)による健康影響を検討するための試験系として、味覚嫌悪条件づけ (Conditioned Taste Aversion; CTA) を応用した実験手続きを開発したので報告する。CTAは心理学領域においてすでに確立され、長い歴史と膨大な科学的知見に裏打ちされた研究手法である<sup>13-18)</sup>。CTAは、動物やヒトに新奇な味覚刺激を摂取

原稿受付 2014年10月1日 (Received date: October 1, 2014)

原稿受理 2015年1月22日 (Accepted date: January 22, 2015)

J-STAGE Advance published date: July 1, 2015

\*1 (独) 労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ

\*2 (独) 労働安全衛生総合研究所 環境計測管理研究グループ

\*3 (独) 労働安全衛生総合研究所 作業条件適応研究グループ

連絡先: 〒214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾6-21-1

(独) 労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ 北條理恵子

E-mail: hojo@h.jniosh.go.jp

doi: 10.2486/josh.JOSH-2014-0011-GE

させ、その直後に化学物質や放射線等をばく露し、内臓不快感や嘔気等の身体的不快を惹起させると、その後その物質が存在しなくても、味覚刺激を忌避するようになる現象を指す<sup>16)</sup>。ここで身体的不快感を惹起する物質等のばく露を無条件刺激 (unconditioned stimulus, US) といい<sup>16)</sup>、味覚刺激は条件刺激 (conditioned stimulus, CS) という。また、US, CSの対提示後CS単独提示においても示すようになった抑制 (嫌悪や回避) を条件反応 (conditioned response, CR) といい、CSが病的状態と関係する回避等の行動に関係するようになったと仮定されている。この現象は、ヒトを含めた多くの動物種で共通して観察される<sup>19-23)</sup>。

ラットを使用したこれまでのCTA実験パラダイムにおいて最も頻繁に用いられてきたCSは、例外的な使用を除けば、生来的に嗜好性を示す甘味であり、なかでもサッカリン<sup>14)</sup> やグルコース溶液<sup>24)</sup> が多用される。そのほか嗜好性については中庸といわれる酢酸等<sup>25)</sup> も使用されるが、嫌悪を示す物質がCSとして用いられることはまれである。

そこで本研究では、従来の手続きを用いてサッカリン水溶液をCSとするCTA実験を行い、次にいくつかの先行研究の実験手続きを参考に、低濃度でも「におい」を生じる有機溶剤の水溶液をCSとするCTAを行い、結果を比較した<sup>26, 27)</sup>。この場合の有機溶剤はにおいを嫌悪して回避することがなく、また味覚の効果がほとんどないと考えられる嗜好性、すなわち通常飲用水と区別できない低濃度を用いた。これらの実験により味覚刺激に代わり嗅覚刺激あるいは「におい」をCSとするCTAが成立する可能性、および有機溶剤がCSとして機能する可能性について検証した。

## 2 材料および方法

### 1) 実験動物

Sprague-Dawley雄性ラットを4週齢時に購入 (日本チャールズリバー、横浜) し、6週齢より実験に使用した。購入から実験終了まで、明暗周期が12時間 (明期は午前8時から午後8時まで)、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に維持された動物飼育施設内に収容した。各個体は吊り下げ式のステンレス製ワイヤーケージにて個別飼育とした。エサは全実験期間にわたり任意に摂取可能であった。動物購入から5日間の馴化後、すなわち条件づけ手続きを開始する10日前から水分摂取制限手続きを開始した。水分摂取制限のはじめの5日間は、ホームケージに接続の自動給水筒を16時から30分のみ開放した。その後の5日間はホームケージから自動給水筒を撤去し、16時から30分間ガラス製の飲水びんを提示する摂取制限を施しつつ、動物が飲水びんから水分を摂取することに慣れるようにボトル・トレーニングを行った。動物の体重 (朝) および通常飲用水摂取量を毎日測定した。全実験期間中、動物の平均体重は139.4から198.1gへ成長に伴う増加を示したが、各時期における体重に群間差はみとめられなかった。

本実験は、独立行政法人労働安全衛生総合研究所動物実験委員会の承認を得たうえで、同委員会が定める動物実験指針および動物実験施設利用規定に則って行われた。

### 2) 条件刺激 (CS)

本実験では、CSである嗅覚刺激として低濃度の*p*-キシレン (和光化学工業株式会社、大阪、純度97%以上) 水溶液を使用した。水溶液は次の手順で作成した; ガラス製試葉びん内で133 $\mu\text{L}$ の*p*-キシレンを通常飲用水で1Lに希釈し、小型浸とう機 (ロータリーシェーカー NR2, タイテック社、越谷) を用いて、浸とう速度120r/min、振幅20-30mmで約10時間振とうした。その後、点滴用延長チューブを使い試葉びんの底から100mLを取り出し、通常飲用水にて1Lに希釈し、さらに10時間浸とうした。その後、通常使用しているガラス製の飲水びんに約50mLずつ分注してラットに提示した。また、通常飲用水1Lにサッカリン (和光化学工業株式会社、大阪、純度98%以上) 100mgを溶解し約10時間振とう後、ガラス製飲水びんに50mLずつ分注したものを味覚刺激として使用した。キシレン水溶液の濃度の確認と本研究で用いた希釈法の妥当性を検討するために、作成したキシレン水溶液の濃度を紫外可視近赤外分光光度計 (UV3600, SHIMADZU, 京都) を用いて測定した。測定条件は、一般的にベンゼン環を含む化学物質の測定時に用いられる測定波長230-300nmでは十分な測定感度が得られなかったため、より短波長側 (183-300nm) まで拡大してスペクトル測定を行った。その結果、キシレンの吸収がより強く十分なS/N比が得られた測定波長: 211.4nm、スリット幅: 2.0nmの条件で吸光度を測定し、蒸留水でキシレンを希釈したものを標準試料として濃度を決定した。

### 3) 無条件刺激 (US)

CSとしてキシレン水溶液あるいはサッカリン水溶液を提示する2群の動物は、さらにUSとして生理食塩水にて0.3Mに希釈したLiCl液 (LiCl, 和光ピュア化学工業株式会社、大阪、純度98%以上) 1mL、あるいはコントロールとして生理食塩水 (生食) 1mLを腹腔内投与する2群にそれぞれ分割された (表1)。

### 4) 嫌悪条件づけ手続き

ボトル・トレーニング終了から24時間後にホームケージ内で条件づけ手続きを開始した (図1A)。すべてのラットに対し条件づけ手続きを同日に行った。50mLのキシレンあるいはサッカリン水溶液 (CS水溶液) 入りガラス製の飲水びんの重量を条件づけ手続き開始直前に測定した。その後、各動物にCS水溶液を30分間提供した。30分経過直後にラットをケージから取り出し、LiCl液あるいは生理食塩水を注射器により腹腔内投与した。動物に正確に等しく30分間の水溶液摂取時間を与え、かつ水溶液提供直後に確実に腹腔内投与を行うために、各動物に対する水溶液の提示開始を2分間ずつずらしながら行った。水溶液は、サッカリン水溶液提示・生理食塩水注射のコントロール群 (SC群)、次にサッカリン水

溶液提示・LiCl液注射の群 (SLi群), キシレン水溶液提示・生理食塩水注射のコントロール群 (XC群), キシレン水溶液提示・LiCl液注射の群 (XLi群) の順序で1匹ずつ処理し, この順番を12回 (SC群は8回) 繰り返した (表1). すべての動物への処理が終了した後に体重測定および飲水びん重量測定によるCS水溶液摂取量の算出を行った. 条件づけ手続き終了の約2時間後にすべての動物に対し, 脱水予防のため通常飲用水を30分間与え, 摂取量を測定した.

### 5) 嗜好テスト

動物のCS水溶液に対する嫌悪条件づけ成立の有無を評価するため, 嫌悪条件づけ手続きの24時間後にホームケージ内で嗜好テストを行った (図1B). 嗜好テストにおいては通常飲用水およびCS水溶液入り飲水びんを同時に30分間提示し, それぞれの摂取量を測定し

表1 実験条件

実験群 <sup>1)</sup>	CS <sup>2)</sup> (提示水溶液)	US <sup>3)</sup> (腹腔内投与)	N
1) SC 群	サッカリン	生理食塩水	8
2) SLi 群	サッカリン	塩化リチウム	12
3) XC 群	キシレン	生理食塩水	12
4) XLi 群	キシレン	塩化リチウム	12

<sup>1)</sup>: 実験群 1) SC 群: 嫌悪条件づけ手続きおよび嗜好テストの際にサッカリンを提示し, 嫌悪条件づけ手続き時に生理食塩水を腹腔内投与した群, 2) SLi 群: 嫌悪条件づけ手続きおよび嗜好テストの際にサッカリン水溶液を提示し, 嫌悪条件づけ手続き時に0.3 Mの塩化リチウムを腹腔内投与した群, 3) XC 群: 嫌悪条件づけ手続きおよび嗜好テストの際にキシレン水溶液を提示し, 嫌悪条件づけ手続き時に生理食塩水を腹腔内投与した群, 4) XLi 群: 嫌悪条件づけ手続きおよび嗜好テストの際にキシレン水溶液を提示し, 嫌悪条件づけ手続き時に0.3 M塩化リチウムを腹腔内投与した群. <sup>2)</sup>: CS条件刺激, 嫌悪条件づけ手続きおよび嗜好テストの際に提示された水溶液. <sup>3)</sup>: US無条件刺激, 嫌悪条件づけ手続きの際に腹腔内投与された物質. 塩化リチウムは生理食塩水で0.3 Mに希釈された. 塩化リチウム, 生理食塩水 (Saline) とともにラット1匹あたり1 mlを投与した.

た. CS水溶液への嫌悪反応は, Danilova & Hellekant (2004) によって記述された方法により, CS水溶液の嗜好比 (preference ratio, PR) を算出した<sup>23)</sup>. すなわち, CS水溶液摂取量を通常飲用水とCS水溶液摂取量の和で除したものをPRと定義し, LiCl腹腔投与群のPRが対応するコントロール群のそれより統計的に小さかった場合に条件づけが成立したと判断した. 本実験ではいずれも1回の試行で条件づけが成立した. 加えて, キシレン水溶液提示群とサッカリン水溶液提示群の結果も比較した.

### 6) 統計解析

動物の到着, 馴化, ボトル・トレーニングの1日目と3日目, および嫌悪条件づけ手続き終了時と嗜好テスト終了時の各実験群の動物の体重については繰り返しのある二元配置の分散分析 (analysis of variance, ANOVA), 馴化3日目における通常飲用水摂取量, 嫌悪条件づけ手続き時および嗜好テスト時それぞれにおける通常飲用水摂取量およびCS水溶液摂取量, さらに嗜好テスト時のPRについてはそれぞれ4群 (SC, SLi, XC, XLi) 間で比較を行った. 正規性 (Levene) 検定を行ったところ一部のデータに群間の分散の等質性が担保できないとの結果を得たため, ノンパラメトリック (Kruskal-Wallis) 検定を用いた. 群の比較において統計的に有意な差 ( $p < 0.05$ ) が認められた際には, post hocテストとしてMann-WhitneyのU検定を用いた. 統計的有意水準はBonferroni法によって多重性の調整を行った. 図表中データは, 平均値±SEとして記述した. 以上のすべての統計的解析はSPSS統計パッケージソフト (ver.19.0, IBM社, Chicago) を用いた.

## 3 結果

本研究で使用したCSであるキシレン水溶液の実際の濃度を推測するために紫外可視近赤外分光光度計で測定された濃度は $13.3 \pm 0.1$  ppmであった.

全期間を通じて4群の動物体重に差はみとめられなかった (データ提示なし).

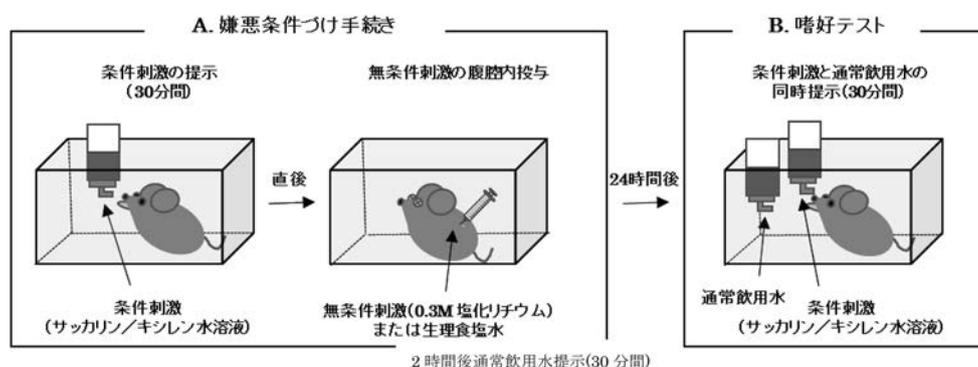


図1 実験手続き

馴化 (5日間), およびボトル・トレーニング (5日間) を含む10日間の飲水制限の後に嫌悪条件づけ手続きが行われた. 嫌悪条件づけ手続き (A) では, 水分飢餓状態のラットに対し, サッカリンあるいはキシレン水溶液が30分間提示された. 提示直後に0.3 M塩化リチウム液あるいは生理食塩水 (生食) が1 mL腹腔に投与された. その後, 30分間通常の飲用水が与えられた. 嫌悪条件づけ手続きの24時間後に嗜好テストを行った (B). このテスト下では, 条件刺激および通常飲用水が同時に30分間提示された. 通常飲用水および条件刺激の和である総摂取量に対する条件刺激の相対摂取割合を preference ratio (PR) として算出した.

表2 (A) 馴化3日目における通常飲用水摂取量

提示 CS	サッカリン水溶液群		キシレン水溶液群	
	(a) 生食 (SC 群)	(b) LiCl(SLi 群)	(c) 生食 (XC 群)	(d) LiCl(XLi 群)
馴化3日目	13.74±1.80	14.97±1.81	15.40±0.87	15.81±1.08
動物数	8	12	12	12

表2 (B) サッカリン水溶液群およびキシレン水溶液群における飲用水およびCS水溶液摂取量

提示 CS	サッカリン水溶液				キシレン水溶液			
	(a) 生食 (SC 群)		(b) LiCl(SLi 群)		(c) 生食 (XC 群)		(d) LiCl(XLi 群)	
US	通常飲用水	サッカリン水	通常飲用水	サッカリン水	通常飲用水	キシレン水	通常飲用水	キシレン水
条件づけ	9.14±1.71	11.52±1.88	13.62±2.49	6.47±0.24	15.18±2.33	12.10±2.87	12.99±1.19	5.91±1.46
嗜好テスト	11.74±0.81	12.16±0.63	18.48±1.96	6.29±2.74	11.99±0.86	13.52±0.68	17.82±1.43*	2.26±0.50*
動物数	8		12		12		12	

サッカリン水溶液提示群およびキシレン水溶液提示群における (A) 馴化3日時の飲用水量および標準誤差(単位: ml). (B) 条件づけ手続きおよび嗜好テスト時における飲用水およびCS水溶液の摂取量および標準誤差(単位: ml). 各表の最下段は各群の動物数(匹). \*:  $p < 0.05$  (vs. 同じ提示CS水溶液群内の生食投与群).

馴化3日目における通常飲用水摂取量については4群間に差はみとめられなかった ( $\chi^2(3)=4.634, p=0.201$ ) (表2A).

嫌悪条件づけ手続き時における通常飲用水摂取量およびCS水溶液摂取量について4群間に差はみとめられなかった (それぞれ  $\chi^2(3)=3.279, p=0.351$  および  $\chi^2(3)=7.347, p=0.062$ ) (表2B).

嗜好テスト時には通常飲用水摂取量およびCS水溶液摂取量両者において有意差がみとめられた (それぞれ  $\chi^2(3)=15.850, p=0.01$  および  $\chi^2(3)=28.580, p=0.000$ ) (表2B). post hocテストの結果, 通常飲用水摂取量およびCS水溶液摂取量ともに, XC群とXLi群, XC群とSLi群およびSC群とXLi群との間に有意差異がみとめられた. すなわち嗜好テストでは, XLi群の動物は生食を投与した群の動物よりも通常飲用水を多く摂取し, キシレン水溶液は有意に摂取量が少ないという結果が得られた (表2B).

嗜好テスト時のPRを図2に示した. SC群とSLi群, XC群とXli群との間に有意な差がみとめられた ( $\chi^2(3)=28.339, p=0.000$ ) (図2B). すなわち, SLi群がSC群, Xli群がXC群よりPRが有意に小さかった (図2B).

#### 4 討論

本研究は, 従来行われている味覚嫌悪条件づけ手続きの応用として味覚刺激を「におい」刺激に代え, その有用性をラットを用いた実験で検討したものである. 特に低用量の有機溶剤 (本研究で用いた希釈法にて作成した期待値11.4ppmのキシレン水溶液) をCSとして使用し, 従来のサッカリン水溶液を使用した場合と同様の効果が得られるか否かに着目し実験を行った. キシレン水溶液を嫌悪条件づけ実験の枠組みでCSとして使用した例は筆者らの知る限りない. その結果, 従来の味覚刺激を「におい」刺激として有機溶剤 (キシレン) に置き換えても, 嫌悪条件づけ手続き後の嗜好テストにおいてCS水溶液への回避反応が生じており, 有機溶剤の「にお

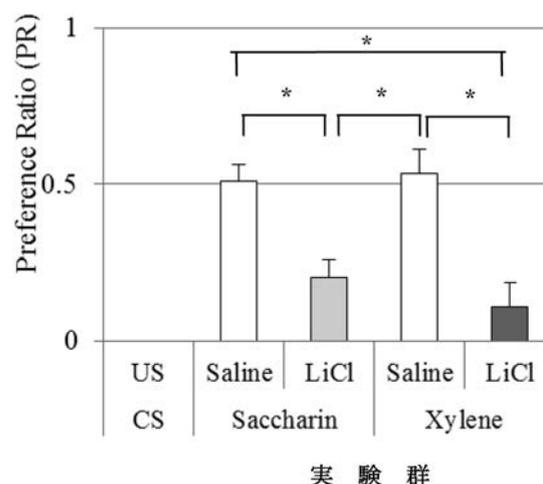


図2 嗜好テストにおけるPreference Ratio (PR). \* $p < 0.05$  (vs. 各群内生食投与群)

い」を条件刺激とする嫌悪条件づけが成立した. すなわち, 本実験で使用した濃度であれば, キシレン水溶液もCSとして有効に機能することが示唆された.

本実験で用いたCSとしてのキシレン水溶液の実測値は13.3±0.1 ppmであった. 本実験の条件づけ手続き中ではラットのキシレン水溶液摂取量は提示30分間で約12 mLであった (表2B). 飲水と食餌を水分量として同比率で摂取したと仮定すると実際には水分12 mLを15分で消費した計算になる. 一方, 文献値よりラットの標準呼吸量は1分間当たり73 mLであり<sup>28)</sup>, 15分間では1.1 Lとなる. 仮にキシレン13.3 ppmの水溶液12 mL中のキシレン159 μg (1.5 μmol) を1.1 Lの空気とともに吸引したとすれば, その気中濃度は約33 ppmとなる. これは最大見積り値であり, 実際にはもっと低い濃度と推測される. 通常, 嗜好性あるいは中毒性 (依存症状) を検証する実験では, 本実験よりもはるかに高濃度を使用している<sup>29)</sup>. たとえば, Bowenら (2009) は中毒を模した動物モデルとして1000 ppmから6000 ppmの有機溶剤 (トルエン) を用いている<sup>30)</sup>. また, シンナー吸入者

のばく露濃度は5000ppm以上とされている<sup>31)</sup>。一方、職業性あるいは環境ばく露での実験では100ppm前後の濃度での実験が一般的である。キシレンの許容濃度も150ppm<sup>32)</sup>であり、本研究で使用した濃度を大きく上回る。すなわち、毒性が発現する可能性は極めて低い濃度と考えられる。

さらに、Hojoら(2014)は、キシレン水溶液のみの回復提示(注射なし)、キシレン水溶液提示・生食注射群およびキシレン水溶液提示・LiCl液注射群を用いた嫌悪条件づけ実験をキシレン10ppm水溶液、LiCl液0.3Mを1mLで行った<sup>33)</sup>。その結果、キシレン水溶液に対する回避行動はLiCl液注射群動物にのみ生じた。この群における回避行動はキシレン水溶液提示の3回目からみとめられ、最終提示回(8回)までPRが0.3-0.2を維持した。一方、LiCl液を注射しなかった非注射群(生食注射群および注射なし群)における5-8回の提示のPRは0.7-0.8で変動はみられなかった。すなわち、LiCl注射群および非注射群ともに、キシレン水溶液の提示回数によるPRの変動(減少はキシレンへの感受性の鋭敏化、増加はキシレンへの依存を示す)が生じなかったため、LiCl液注射群と非注射群におけるPRの違いはキシレンそのものの毒性効果ではなく、嫌悪条件づけ手続き(LiCl投与)の効果であると結論づけた<sup>33)</sup>。以上のことから、本実験で用いたCS水溶液の濃度および提示回数では、動物がキシレン水溶液に対して中毒症状を発現した可能性は極めて低く、本研究の結果として得られた嗜好テストにおけるキシレン溶液のPRの低下は、嫌悪条件づけ手続きにおけるUSの違いにより生じた効果であることが示唆された。

本実験では、条件づけ手続きから嗜好テストまでのインターバルは、先行実験を参考に24時間と設定し<sup>26)</sup>、LiClの濃度は嗅覚刺激を使用したRaineke et al. (2009)の実験手続き<sup>27)</sup>と同様に0.3Mとしたが、LiClの半減期はラットでは6時間とされている<sup>34,35)</sup>ため、計算上では24時間後には投与量の16分の1の薬理効果しか残っていない。したがって、嗜好テストにおける水分摂取量に対するLiClの薬理効果はほぼないものと考えた。しかしながら、LiClを生理食塩水で溶解したものをUSとして用いた場合、US溶液が体液と等張とはならないという問題が生じた。今後は等張LiCl溶液をUSとする実験を行う必要がある。また、LiClの濃度も体液と等張とし、0.15Mの濃度とするなどの必要がある<sup>36)</sup>。

本実験で使用するCS水溶液の濃度を決定する際に、本実験で用いた方法で期待値1.14ppmおよび114.4ppmのキシレン水溶液を用いて予備的な検討を行った。CS水溶液と通常の飲用水を同時に提示した結果、1.14ppmキシレン水溶液と通常飲用水摂取量に差はみられず(データなし)、両者の弁別ができていないことがわかった。一方、予想値114.4ppmのキシレン水溶液にはラットは接近せず、専ら通常飲用水のみを摂取した(データなし)。これらの結果から1.1ppmのキシレン水溶液については、その味もしくははおいによって通常飲用

水と弁別できなかったこと、期待値114.4ppmキシレン水溶液ではにおいに反応したために接近および摂取をしなかったと判断した。そのため、本実験ではHojoら(2014)の実験をもとに、おおよそ10ppmのキシレン水溶液の提示を行うことにし、11.4ppmとなる手順で調製した<sup>33)</sup>。吸光度法による実測値は13.3ppmとなったが、この17%の濃度差は本実験を遂行するうえで本質的問題とはならないと考える。

本実験での嫌悪条件づけ手続き時には、キシレンおよびサッカリンをCSとした動物では通常飲用水にもCS水溶液にも摂取量の違いはみとめられず、嗜好テスト時にはPRはともに有意に低下したが、キシレン提示群にのみ通常飲用水摂取量の有意な増加、CS摂取量の有意な減少がみられた。この結果は、嫌悪条件づけ手続きによって、キシレンは強固な嫌悪反応(回避行動)を示したことを意味しており、CSとして十分機能したといえる。したがって本実験で使用したCSとしては適当な濃度であると判断した。しかも水分摂取量および行動から、味覚嗜好としてはキシレン溶液と水、サッカリン溶液を区別していないにもかかわらず嫌悪条件づけ反応のCSとしては水と区別していたことから、動物においては一般的に嗅覚の方が味覚よりも感度が高いといわれているため<sup>37)</sup>、本濃度では嗅覚が嫌悪条件づけに寄与した可能性が高いと考えた。以上の考察より、ラットのキシレン水溶液に対する認知閾値は13.3ppm近辺に存在すると考えられるが、ラットの反応がにおいによるものなのか、それとも摂取した際の味によるものなのかについては、本実験の結果だけでは明確に判断できない。今回、嗅覚刺激として有機溶剤を水溶液として用いた理由のひとつにガスによる濃度統制の困難さがあるが、今後は有機溶剤をガス化し、においをCSとして用いる新たな嗅覚嫌悪条件づけ手法の確立が必須である。しかしながら、精密な装置のもとでの実験手法が確立したとしてもガスが口腔内を覆っている粘液への溶解による味覚刺激の効果を完全に排除することはできない。

実験開始前の体重に群間差はみられなかったこと、また、馴化3日目における通常飲用水摂取量がどの群においても等しかったことから、各群の飲水に対する渴望度合いおよび必要とする水分量や30分での飲水摂取能について、全群を等質と判断し実験を開始した。しかしながら、統計的に有意ではなかったものの、嫌悪条件づけ手続き時にLiCl注射群でCS水溶液摂取量に低下傾向がみとめられた。本実験での嫌悪条件づけ手続き時には、CS摂取時にはまだUSの腹腔内投与を実行していないため、USの影響はない。また、Li群の嗜好テスト時のキシレン水溶液摂取量は嫌悪条件づけ手続き時の摂取量よりも有意に低下していた(Welch検定,  $p < 0.001$ )。これらの結果を勘案すると群間差が本質的に生じていたとは考えにくい。しかしながら、実験手続きにおいて動物へのCS提示およびUSの投与の順序が常にSC群→SLiCl群→XC群→XLiCl群の繰り返しだったことから、可能性は低いがこの順序の中に何らかの原因が潜んでい

たとも考えられる。今後の課題として、群分けに際して等質性を担保するための十分な精査と実験手続きにおける順序効果等の影響を排除した実験デザインが必要と思われる。

Healeら(1994)は、ラットに対しキシレンのにおいを提示したところ海馬の歯状回および嗅球において、捕食動物のにおい提示により発現する脳波と同様の波形が得られたことを報告した<sup>38)</sup>。この結果はラットにとって有機溶剤はむしろ嫌悪的であることを示している。我々の経験でも114.4ppmの水溶液に対しては摂取を回避する行動を示した。従来の味覚嫌悪条件づけ実験においては、嫌悪的なCSでは条件づけが成立しにくいという結果がほとんどであった。しかしながら、本実験では有機溶剤の「におい」をCSとして嫌悪条件づけが成立した。このことは特筆すべき結果といえる。なぜならば近年職場環境とも関連する、シックビル症候群<sup>5)</sup>や、最大許容濃度以下の化学物質へのばく露により過敏症状を呈する例<sup>6-8)</sup>が注目されており、本実験の結果は、このような低濃度の有機溶剤のにおいと嫌悪反応とが連合してシックビル症候群や過敏症状が生じているという「嫌悪条件付仮説」の可能性を示唆する緒となりうるからである。

シックビルディング症候群の原因物質、あるいは過敏症状を喚起すると懸念されている物質としてトルエン、ホルムアルデヒド、キシレンといった有機溶剤が筆頭として挙げられている<sup>5, 8)</sup>。比較的高濃度での短期ばく露あるいは濃度が最大許容濃度以下であっても長期にわたるばく露により発症するといわれている<sup>8)</sup>。しかしながら、これらの健康障害が化学物質による直接的な毒性に基づいているのか、それとも化学物質のにおいに対する不快感がそもそもの問題であり器質的問題ではないのかについての議論が続いておりいまだ決着はついていないという現状がある。

有機溶剤等の有害化学物質はにおいを発するとともにある濃度以上のばく露では病的状態を引き起こす毒性を有しており、においの影響と毒性を分離して検証することが重要である。本実験では、有機溶剤を毒性が生じるよりも格段に低い濃度でCSとして使用し、その「におい」を刺激として用いた。また塩化リチウムの毒性効果も分離したスケジュールになっている。すなわち、本研究での嫌悪条件づけ手続きにおいては、新規「におい」刺激提示と同時に塩化リチウムの投与で惹起された毒性効果により、のちにその「におい」単独提示によってその「におい」に対する嫌悪反応が引き起こされた。さらに検討を進めていけば、化学物質のにおいにより過敏症やシックビル症候群の病的な過敏症状を引き起こすか否かを検討することが可能になる。したがって、本研究はにおいにより今までの毒性評価では説明できない「病的状態」が生じるのかを明らかにする糸口となりうる。

本研究の結果は、動物が低濃度のキシレンの弁別に高感度であるということを明示しており、また、本研究で確立された試験法もキシレンがCSとして機能したこと

から、有機溶剤に対する嫌悪学習により過敏状態が生じている可能性を検討する鋭敏な手法になりうるということが示唆された。特に、ヒトでの試験法で問題とされるにおい記憶に対する印象等にかかわる履歴の個人差や、それから生じるにおいに対する主観性を排除した試験法として有用であることが示されたと結論づけた。今後はさらに検討を重ね、条件づけ仮説の検証のみならず、本研究法を応用した、未知の化学物質の毒性の見極め、様々なCSの使用による有効性の検討、CTA成立後の「におい」に対する閾値変動の有無を客観的に調査する方法との模索も図っていく予定である。

## 文 献

- 1) Wolkoff P. Indoor air pollutants in office environments: assessment of comfort, health, and performance. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2013; 216: 371-394.
- 2) Wolkoff P, Wilkins CK, Clausen PA, Nielsen GD. Organic compounds in office environments—sensory irritation, odor, measurements and the role of reactive chemistry. *Indoor Air.* 2006; 16: 7-19.
- 3) Malaguarnera G, Cataudella E, Giordano M, Nunnari G, Chisari G, Malaguarnera M. Toxic hepatitis in occupational exposure to solvent. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18: 2756-2766.
- 4) Paustenbach DJ, Gaffney SH. The role of odor and irritation, as well as risk perception, in the setting of occupational exposure limits. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2006; 79: 339-342.
- 5) Nakayama K, Morimoto K. Risk factor for lifestyle and way of living for symptoms of sick building syndrome: Epidemiological survey in Japan. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 2009; 64: 689-698.
- 6) De Luca C, Raskovic D, Pacifico V, Thai JC, Korkina L. The search for reliable biomarkers of disease in multiple chemical sensitivity and other environmental intolerances. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2011; 8: 2770-2779.
- 7) Hetherington L, Battershill J. Review of evidence for a toxicological mechanism of idiopathic environmental intolerance. *Hum. Exp. Toxicol.* 2013; 32: 3-17.
- 8) Skovbjerg S, Johansen JD, Rasmussen A, Thorsen H, Elberling J. General practitioners' experiences with provision of healthcare to patients with self-reported multiple chemical sensitivity. *Scand. J. Prim. Health. Care.* 2009; 27: 148-152.
- 9) Siegel S, Kreutzer R. Pavlovian conditioning and multiple chemical sensitivity. *Environmental Health Perspectives.* 1997; 105: 521-526.
- 10) Caress SM, Steinemann AC. Prevalence of fragrance sensitivity in the American population. *J. Environ. Health.* 2009; 71: 46-50.
- 11) 北條理恵子, 黒河佳香, 塚原伸治, 中島大介, 藤巻秀和. オペラント学習法を用いたマウスのVOCガス検知閾値の計測. *におい・かおり環境学会誌.* 2008; 39: 186-191.

- 12) 北條理恵子, 坂本龍雄, 黒河佳香, 藤巻秀和, 小川康恭. オフィス環境の快適性と「におい」: VOCsとMVOCsに対するマウス嗅覚試験法の開発—嗅覚試験系の確立を目指して—. 労働安全衛生研究. 2011; 4: 51–56.
- 13) Baker TB, Cannon DS. Alcohol and taste-mediated learning. *Addict. Behav.* 1982; 7: 211–230.
- 14) Bures J, Bermudez-Rattoni F, Yamamoto F. *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind* (Oxford Psychology Series). USA: Oxford Scholarship; 1998.
- 15) Ellins SR. *John Garcia: Life of a Neuroethologist and History of Conditioned Taste Aversion*. UK: Lightning Source Inc.; 2006.
- 16) Freeman KB, Riley AL. The origins of conditioned taste aversion learning: A historical analysis. In: Reilly S, Schatman TR. (Eds). *Conditioned Taste Aversion: Behavioral and Neural Processes*. Oxford: Oxford University Press; 2009: 9–33.
- 17) Reilly S, Schachtman TR. *Conditioned Taste Aversion: Behavioral and Neural processes*. USA: Oxford University Press; 2008.
- 18) Verendeev A, Riley AL. Conditioned taste aversion and drugs of abuse: History and interpretation. *Neurosci. Biobehav.* 2012; 26: 2193–2205.
- 19) Garcia J, Hankins WG, Rusiniak KW. Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science.* 1974; 185: 824–831.
- 20) Gustavson CR, Garcia J, Hankins WG, Rusiniak KW. Coyote predation control by aversive conditioning. *Science.* 1974; 184: 581–583.
- 21) Okifuji A, Friedman AG. Experimentally induced taste aversions in humans: Effects of overshadowing on acquisition. *Behav. Res. Ther.* 1992; 30: 23–32.
- 22) Rabin BM, Hunt WA. Relationship between vomiting and taste aversion learning in the ferret: Studies with ionizing radiation. Lithium chloride, and amphetamine. *Behav. Neural. Biol.* 1992; 58: 83–93.
- 23) Danilova V, Hellekant G. Sense of taste in a New World monkey, the common marmoset. II. Link between behavior and nerve activity. *J. Neurophysiol.* 2004; 92: 1067–1076.
- 24) Smith ME, Norgren R, Grigson PS. A mixed design reveals that glucose moieties facilitate extinction of a conditioned taste aversion in rats. *Learn Behav.* 2004; 32: 454–462.
- 25) Moron I, Ballesteros MA, Candido A, Gallo M. Taste aversion learning and aging: A comparison with the effect of dorsal hippocampal lesions in rats. *Physiol. Res.* 2002; 5: S21–S27.
- 26) Liang NC, Bello NT, Moran TH. Experience with activity based anorexia enhances conditioned taste aversion learning in rats. *Physiol. Behav.* 2011; 102: 51–57.
- 27) Raineki C, Shionoya K, Sander K, Sullivan RM. Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: Similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence. *Learn Mem.* 2009; 16: 114–121.
- 28) 田嶋嘉雄編. *実験動物学 (各論)*. 東京: 朝倉書店; 1972.
- 29) Bowen SE, Batis JC, Paez-Martinez N, Cruz SL. The last decade of solvent research in animal models of abuse: Mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006; 28: 636–647.
- 30) Bowen SE, McDonald P. Abuse pattern of toluene exposure alters mouse behavior in a waiting-for-reward operant task. *Neurotoxicol. Teratol.* 2009; 31: 18–25.
- 31) Williams JE, Storck M. American Academy of Pediatrics Committee on Substance Abuse; American Academy of Pediatrics Committee on Native American Child Health. Inhalant abuse. *Pediatrics.* 2007; 119: 1009–1017.
- 32) Documentation for Immediately Dangerous To Life or Health Concentrations (IDLHs). Xylene (*o*-, *m*-, *p*-isomers). <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/95476.html>. Centers for Disease Control and Prevention, GA, USA.
- 33) Hojo R, Takaya M, Yanagiba Y, Tsuchiya M, Ogawa Y. Effects of a repeated low dose of LiCl injection under conditioned taste/flavor aversion using xylene. *Fund. Toxicol. Sci.* 2014; (in press).
- 34) Wood AJ, Goodwin GM, DeSouza RD, Green AR. The pharmacokinetic profile of lithium in rat and mouse: An important factor in psychopharmacological investigations of the drug. *Neuropharmacology.* 1986; 25: 1285–1288.
- 35) Mickleya GA, Remusa JL, Ramosa L, Wilsona GN, Biesana OR, Ketchesina KD. Acute, but not chronic, exposure to D-Cycloserine facilitates extinction and modulates spontaneous recovery of a conditioned taste aversion. *Physiol Behav.* 2012; 105: 417–427.
- 36) Tsuboi H, Hirai Y, Maezawa H, Notani K, Inoue N, Funahashi M. Effects of treadmill exercise on the LiCl-induced conditioned taste aversion in rats. *Physiol. Behav.* 2015; 138: 1–5.
- 37) 武政三男. *スパイスのサイエンスPART 2*. 東京: 文園; 2002.
- 38) Heale VR, Vanderwolf CH. Toluene and weasel (2-propylthietane) odors suppress feeding in the rat. *J. Chem. Ecol.* 1994; 20: 2953–2958.

## Conditioned taste aversion with low-dose organic solvents

by

Rieko HOJO<sup>\*1</sup>, Yukie YANAGIBA<sup>\*1</sup>, Mitsutoshi TAKAYA<sup>\*2</sup>, Masao TSUCHIYA<sup>\*3</sup>,  
Akinori YASUDA<sup>\*1</sup> and Yasutaka OGAWA<sup>\*1</sup>

A number of recent workplace health problems have resulted from very low-dose chemical substances. Low concentrations of organic solvents at a no observed adverse effect level (NOAEL) generate a specific smell. Health effects, including high sensitivity and adverse physical conditions, occur in response to the smell and are thought to result from the chemicals. One hypothesis that explains the mechanisms underlying the reactions to the smells of these substances is aversive conditioning by an odor stimulus. The hypothesis postulates that the smell is associated with pain and/or fear. Unpleasant reactions are induced when the same smell is experienced later, even when the concentration of the substance is lower than NOAEL. However, no experiments have been conducted to test this hypothesis. In the present study, we examined if aversive conditioning can be established in rats by using a low-dose organic solvent as a conditioned stimulus (CS). The organic solvent functioned as a CS, and aversive conditioning was established with the odor stimulus. In a future study, we are planning to examine the effects of unknown chemicals with the procedure used in the present study. In addition, we will examine modifications in odor threshold after the establishment of the conditioned taste aversion.

**Key Words:** conditioned taste aversion (CTA), olfactory stimulus, rat, lithium chloride (LiCl), xylene

---

\*1 Mechanism of Health Effects Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health

\*2 Work Environment Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health

\*3 Health Administration and Psychosocial Factor Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health