

図3 縦層流小型チャンバー内ホルムアルデヒドガス濃度の推移

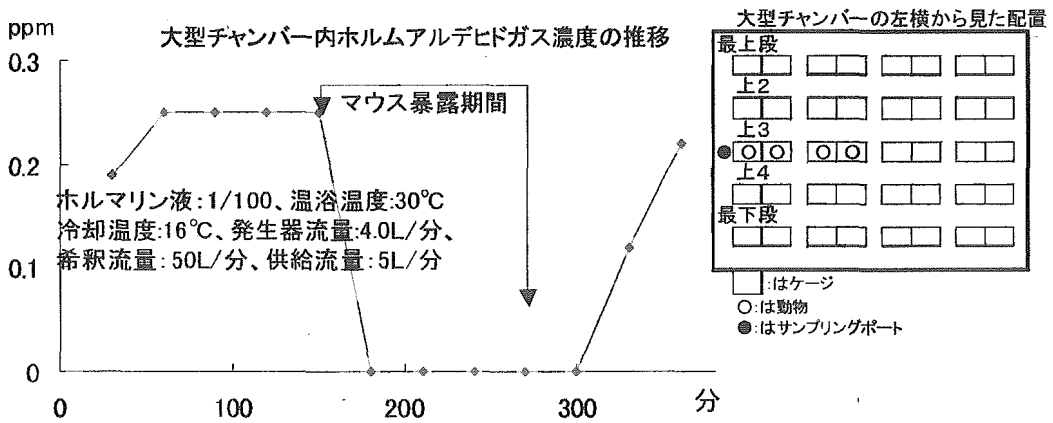
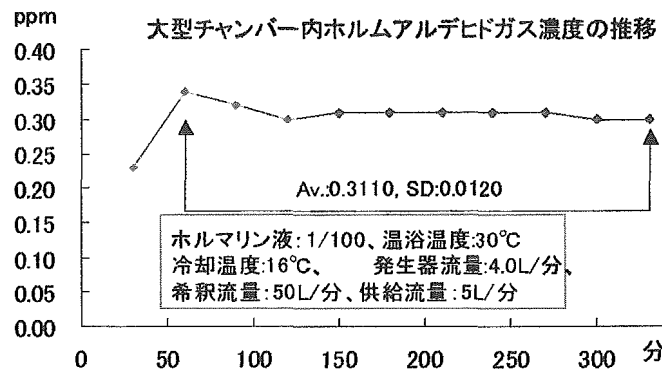


図4 横層流大型チャンバー内のサンプリングポートに集中してマウスを入れた時のホルムアルデヒドガス濃度の推移

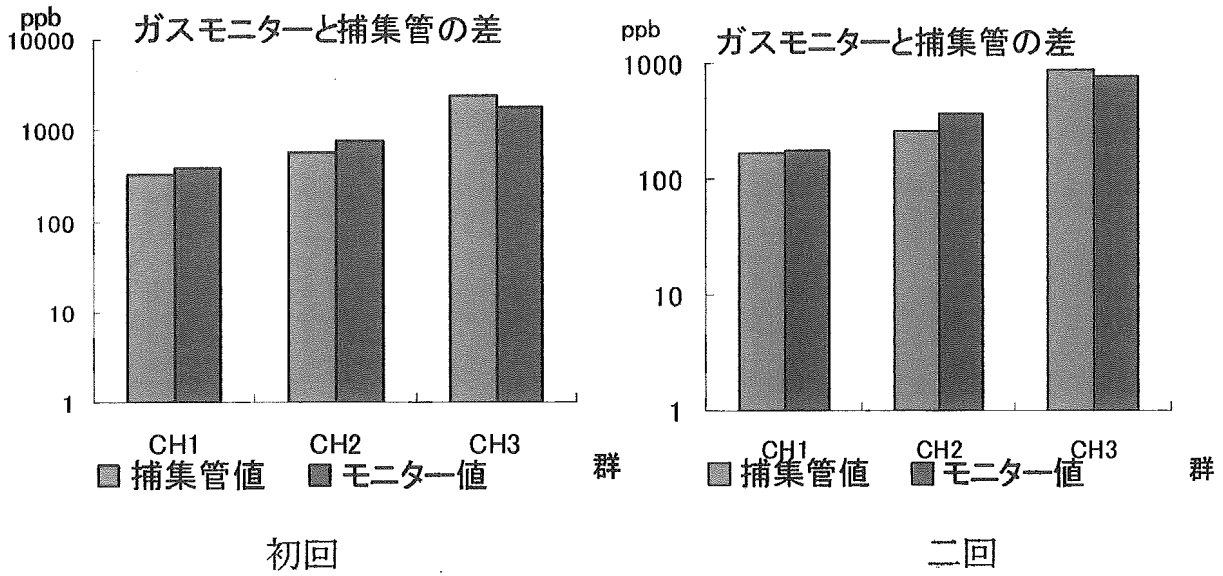


図5 大型チャンバーによる高感度ガスモニターと捕集管との濃度の差

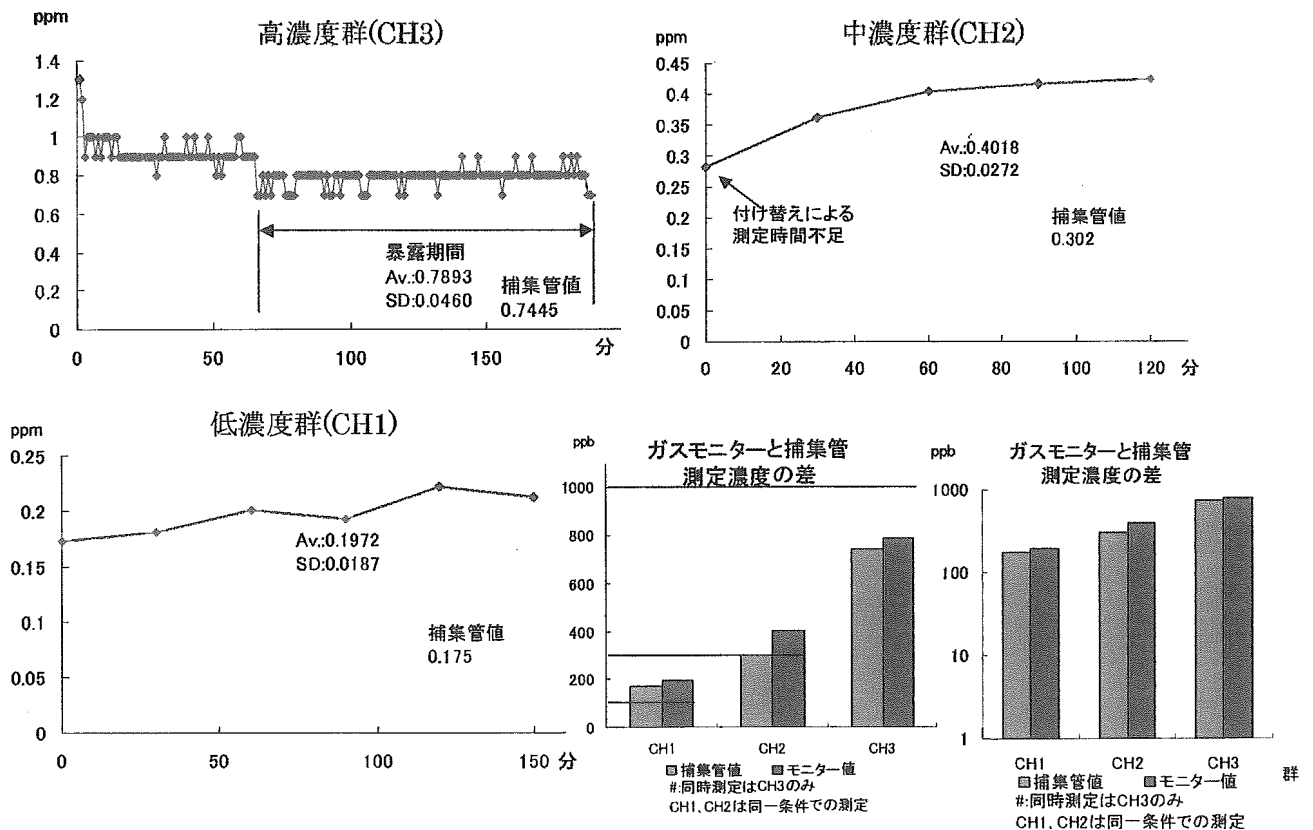


図6 本試験時の横層流大型チャンバー内ホルムアルデヒドガス濃度の推移及びガスモニターと捕集管の測定濃度

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

吸入暴露による網羅的遺伝子発現データの解析による
吸入毒性評価と経口暴露の比較研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部長

研究要旨

本研究は、化学物質の経気道暴露による肺と肝臓に於ける遺伝子発現変化を経口暴露によるデータと比較しつつ解析し、経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に寄与する知見を得ることを目的としている。本年度はホルマリン(指針値ホルムアルデヒドとして0.08ppm)の経気道短期暴露(0, 0.175, 0.302, 0.745ppm(0, 13.8, 23.9, 58.9 ug/kg相当)の4用量、2, 4, 8, 24時間後)のマウス肺、肝臓の網羅的遺伝子発現データを、経口単回暴露(0, 3, 10, 30mg/kgの4用量、時間は同一条件)後の肺、肝臓のデータと比較解析した。その結果、最も多くの遺伝子の発現が変化した臓器は経気道暴露による肝臓であり、アラキドン酸、リノール酸を代謝するCyp2c55の他、Glutathione S-transferase (GST), mu2, mu3, theta3に加え、DNA障害への対応に関与するRAD9の発現上昇が認められた。更に、マレイン酸をピルビン酸へ代謝するMod1(malate dehydrogenase)や、クエン酸回路に於けるオキサロ酢酸からクエン酸への代謝を担うCS (citrate synthase)の発現上昇も認められた。これらの結果は、化学物質の低濃度経気道暴露による生体反応変化を捉えるのに、網羅的遺伝子発現解析手法が有効であることを実証するものである。

A. 研究目的

本研究は、気化性化学物質の吸入によるリスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスとして、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術の構築を通して、日常生活に於いて暴露される様々な気化性化学物質の安全性確保の為の、毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速且つ正確・精密な吸入毒性評価システムを作成することを目的として実施するものである。

シックハウス症候群の原因物質とされるホルムアルデヒド等の13物質に対して室内濃度指針値が設定されているが、従来の動物試験での症候検出可能濃度と、ヒトに於いて報告される症候発現濃度には隔たりがある。そこで本研究では、室内空気汚染化学物質等の低濃度吸入暴露解析へのトキシコゲノミクス手法の適用に関する検討を進め、肺及び肝臓での遺伝子発現変化を解析することで、この隔たりを埋めることを検討する。

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)に4℃一晩浸漬し、RNase 不活化状態を維持する。肝臓は 5mm 径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。肺は気管から RNA later を注入し、RNase 不活化を促した後、採取した。その後、RNA 抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット(キアゲン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail(Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写して cDNA を合成後、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット)を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0(マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、

phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

C. 研究結果及び考察

本年度はホルマリンについてデータ解析を進めた。C57BL/6CrSlc マウスに経気道短期暴露させた際の肺と肝臓を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。ホルマリンの指針値 0.08ppm に対し、暴露濃度は、実地測定値(捕集管)で 0, 0.175, 0.302, 0.745ppm を 2 時間吸入させた。これは、マウスの呼吸量を 1 分当たり 13.2mL とした場合に、各々 13.8, 23.9, 58.9 μ g/kg/2hr の暴露量に相当する。2 時間の経気道暴露の後にすぐに臓器を採取した群を 2 時間群とし、更に 2, 6, 22 時間後採取群を 4, 8, 24 時間群とした。得られた肺、肝臓について、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip (Mouse Genome 430 2.0)を用いた。データ解析にあたっては、別途当方で得た経口単回暴露(0, 3, 10, 30mg/kg の 4 用量、時間は同一条件)後のデータと比較した。

経気道暴露のデータを解析した結果、最も多くの遺伝子の発現が変化した臓器は肝臓であり、発現変動が示唆された遺伝子数は約 400 であった。一方、経気道暴露による肺では約 60 種類の遺伝子の発現変動が示唆された。また、経口短期暴露では、肝臓で約 60 種類、肺で約 110 種類の遺伝子の発現変動が示唆

された。以下に、経気道暴露により発現変動が認められた遺伝子について考察を加えた。

まず、化学物質代謝に関わる遺伝子として(一部下図に表示)、アラキドン酸、リノール酸を代謝する Cyp2c55 の他、Glutathione S-transferase (GST), mu2, mu3, theta3 の発現誘導が認められた。どれも暴露後 24 時間の時点で暴露量依存的に発現上昇するパターンを示した。これは、吸収されたホルマリンによる代謝酵素誘導に一定の時間を要することを示唆する。

また、DNA 障害への対応に関与する RAD9 の発現上昇がやはり 24 時間目に用量依存的に認められた。これがホルマリンによる DNA 障害を反映するものであるかは検証が必要であるが、注目すべき変化である。

更に、マレイン酸をピルビン酸へ代謝する Mod1(malate dehydrogenase)や、クエン酸回路に於けるオキサロ酢酸からクエン酸への代謝を担う CS (citrate synthase)の発現上昇も認められ、糖ヌクレオチド運搬体である Slc35b4 も発現上昇した。また、T 細胞活性化に関わる Ly6a(Sca-1)の発現が 2, 24 時間の時点で発現上昇した。

2 時間時点で発現上昇した遺伝子として、膜タンパクで金属イオン結合領域を持つが機能不明である Zinc finger DHHC domain containing 12 (Zdhhc12)やアポトーシスへの関与が示唆される B-cell leukemia/lymphoma 6(Bcl6)があり、ホルマリンの生物作用といかに関連するか更に解析を加える必要がある。

以上、今年度の解析結果は、ホルマリンの経気道暴露により肝臓で種々の遺伝子の発現が誘導されたことを示し、化学物質の経気道

暴露による生体反応変化を捉えるのに、網羅的遺伝子発現解析手法が有効であることを実証するのに十分な結果であると考えられる。また、今回取り上げた遺伝子は経口投与では弱く発現上昇するか変化が認められないものであった。これがホルマリンの経気道暴露と経口投与暴露で肝臓の反応が異なることを示しているのか今後検討する必要がある。

D. 結論

網羅的遺伝子発現解析手法が、シックハウス症候群に対応する低濃度でのホルマリンの経気道暴露による生体反応を捉えるのに有効であることが実証された。今後は計画した化学物質について肺、肝臓の比較を進め、新しい吸入毒性評価手法開発に役立てる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, and Taku Nagao, "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays
BMC Genomics. 2006 Mar 29;7:64.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen

receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA.2006 103(1):224-9

2. 学会発表

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Per cell” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference “Toxicogenomics”, (2005.6)

◎菅野 純 神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害のPercellome トキシコゲノミクス研究
第32回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

◎五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純 飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響のPercellome 手法を用いた解析
第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、相賀裕美子、菅野 純 Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the “Percellome” system as a model for molecular developmental toxicity
第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純 Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of

Hydroxycitric acid in mice

第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野純 Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法

第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics
the 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2005.8)

◎ Jun Kanno Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics(2005.8)

◎Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama “Percellome” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics(2005.8)

中津則之、相崎健一、菅野純
Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析
第 64 回日本癌学会学術総会(2005.9)

◎五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純 飼料中の植物エスト

ロジエンがトランスクリプトームに及ぼす影響
環境ホルモン学会第 8 回研究発表会
(2005.9)

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、
北嶋聡、五十嵐勝秀 雌性マウスにおける視
床下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現の
Percellome 解析
環境ホルモン学会第 8 回研究発表会
(2005.9)

Jun Kanno Approaches by Basic Biology to
Reinforce the Screening and Testing
Strategy for the Endocrine Disruptors
KFDA/NITR International
Symposium(2005.10)

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸
夫、菅野純 Diethylnitrosamine 及び
N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝
子発現変動解析
第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純
マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマ
イクロアレイ解析
第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

北嶋 聡、Glenn I. Fishman、富田幸子、井
上 達、菅野 純、相賀裕美子 転写因子
Mesp1 非発現細胞はマウス刺激伝導系細
胞に寄与する
第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

安彦行人、原口清輝、高橋 雄、菅野 純、
相賀裕美子 Notch シグナルは Tbx6 依存的
に *Mesp2* 発現を活性化する

第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

©Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun
Kanno Mass Distiributed Clustering : A
New Clustering Algorithm for Repeated
Measurements in Gene Expression Data
The 16th International Conference on
Genome Informatics(2005.12)

菅野純、中津則之、相崎健一、北嶋聡、五
十嵐勝秀「Percellome Project による発がん
関連 transcriptomics」-Diethylnitrosamine
等の Carcinogen の肝遺伝子発現解析(B6
versus C3H の検討から)-
第3回日本癌学会カンファレンス(2006.3)

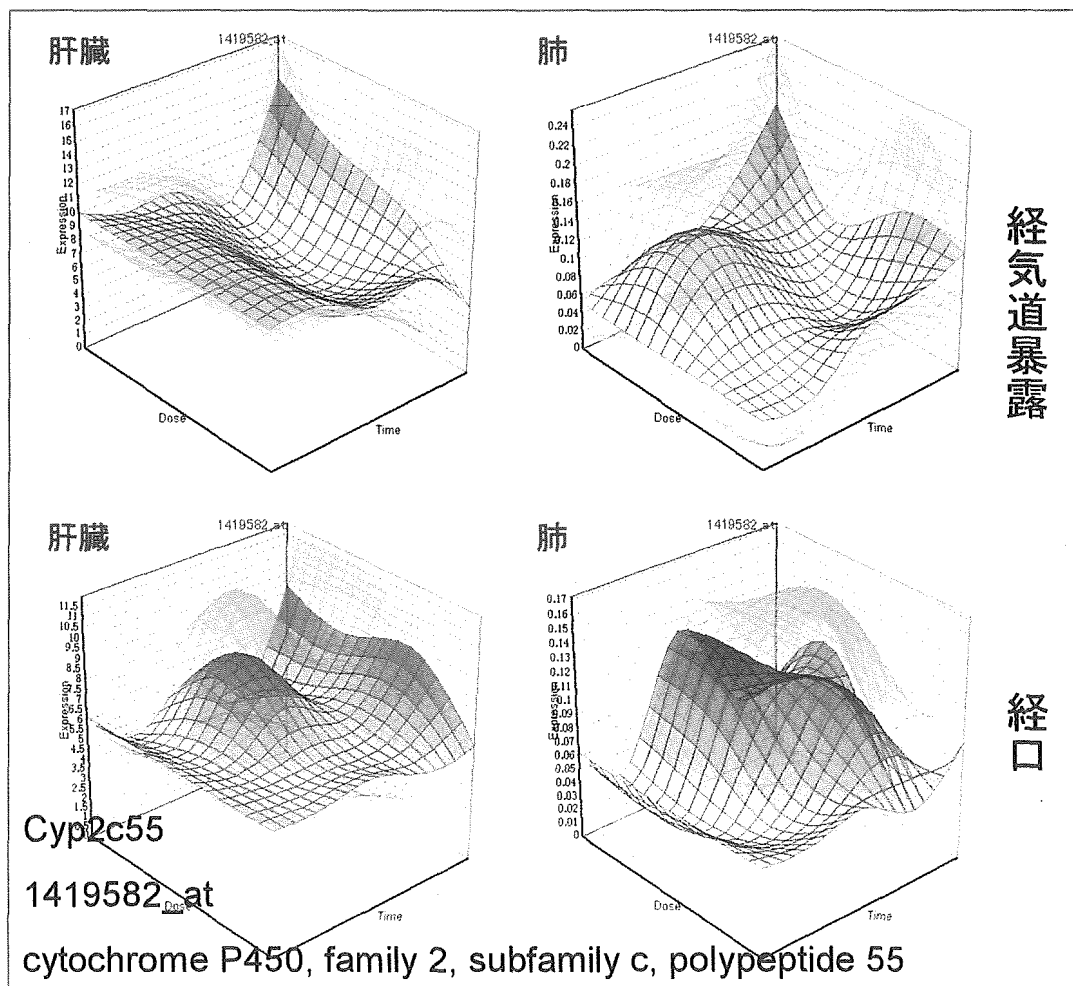
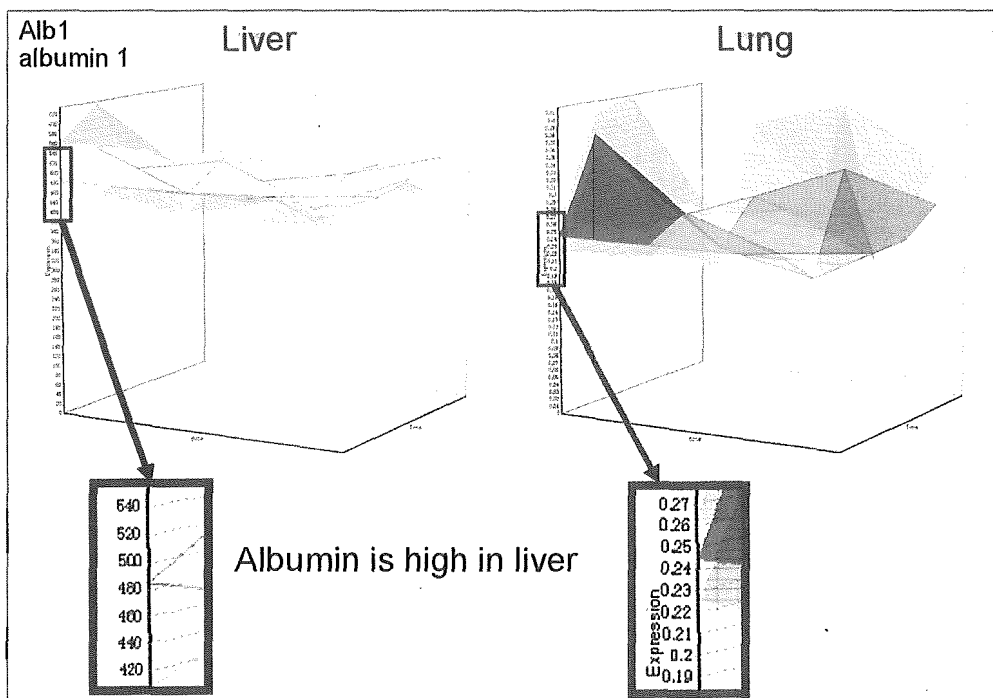
©Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima,
Yukio Kodama Percellome Project for
phenotype-independent toxicogenomics
CASCADE Annual Meeting(2006.3)

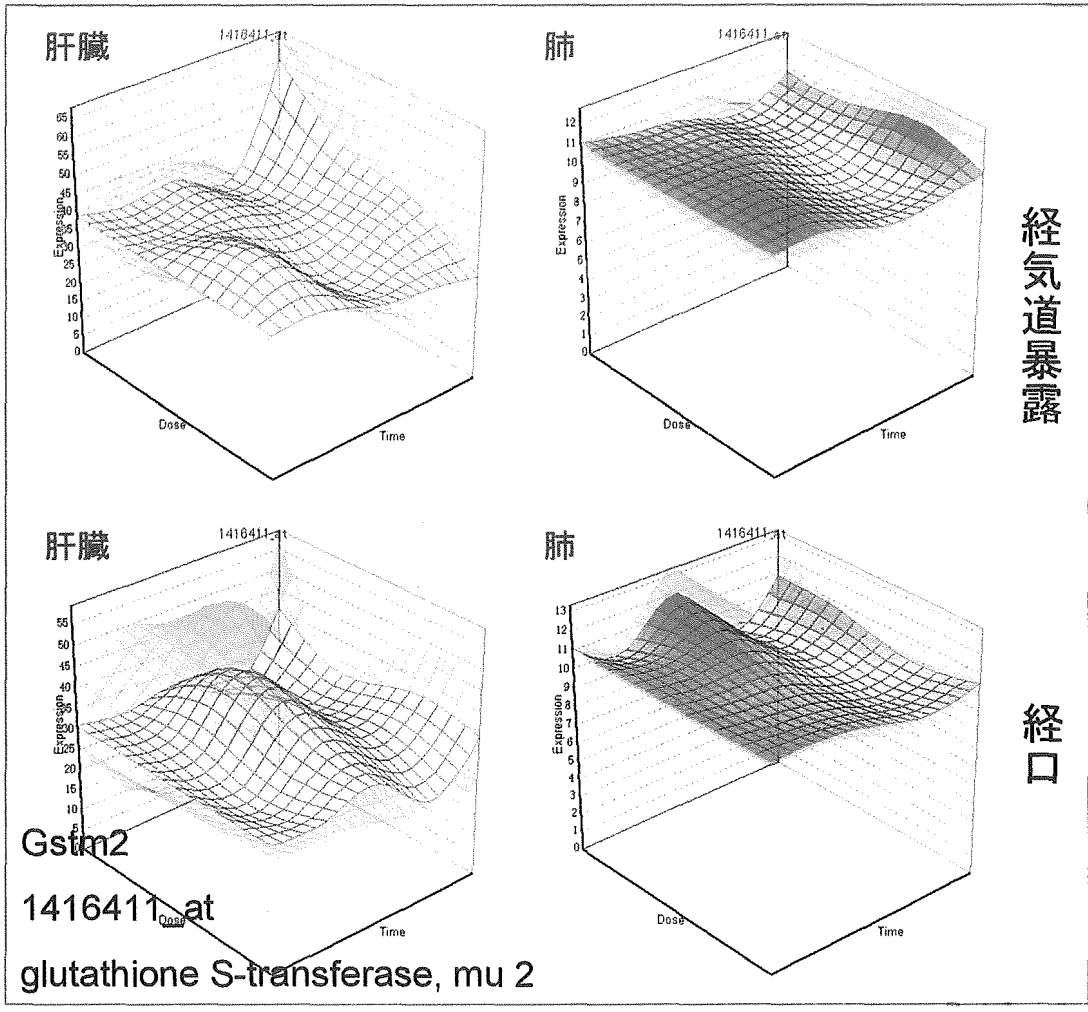
G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定
も含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし





厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

化学物質の極低濃度暴露の実現のための技術開発に関する研究

分担研究者 長野 嘉介

日本バイオアッセイ研究センター、試験管理部長、(兼)病理検査部長

研究要旨

極低濃度暴露で生じる健康影響を検出するエンドポイントの有効性を実証することを目的として、化学物質を生活環境中の濃度に即した極低濃度で動物に経気道暴露する手法について検討した。その結果、1)発生方法は市販の標準ガスを利用すると簡便化できる、2)空気との混合および濃度制御の方法は流量比による制御が基本であり、希釈率の限界を考慮して混合槽による段階希釈等を行う必要がある、また、希釈に使用する空気からの化学物質の除去が必要である、3)濃度測定は、濃度制御のためのモニターには直接測定、吸入チャンバー内の暴露濃度の精度を確認のためには捕集法による分析が適しており、極低濃度暴露実験には、両者を併用するのが合理的であると結論した。

A. 研究目的

生活環境に存在する化学物質による健康被害を防止するため環境濃度の低減への努力が行われているが、同時に極低濃度暴露による化学物質過敏症など新たな健康影響が問題とされている。従来の健康影響評価は、高濃度暴露での実験データを基に、より低濃度での影響を推測してきた。しかし、極低濃度暴露で問題となる健康影響は高濃度暴露で起きる影響とは異なる可能性がある。また、生活環境に即した濃度で生じる新たな健康影響を検出できるエンドポイントの開発することが重要である。この開発に際しては、このエンドポイントの有効性を実証するため、生活環境での濃度に即した極低濃度暴露による吸入暴露実験を実現する必要がある。

本年度は、生活環境中から検出され、化学物質過敏症の原因となることが疑われているホルムアルデヒドをモデルとして、室内濃度指針値である0.08 ppmを考慮した極低濃度レベルでの吸入暴露実験を実現するための検討を行った。

B. 研究方法

化学物質をppbオーダーの濃度で継続的に動物に経気道暴露するための手法を開発するために、本年度は、ホルムアルデヒドを対象として、100 ppbから1 ppbの濃度で動物に経気道暴露する方法について、下記の項目について検討を行った。

- ① 少量の化学物質を継続的に大気へ拡散させる方法(発生方法)
- ② 吸入チャンバー内の化学物質の濃度を極低濃度で一定に制御する方法
- ③ 吸入チャンバー内の化学物質の濃度をモニターし暴露濃度の精度を確認する方法

(倫理面への配慮)

本年度の研究では、動物を使用していない。

C. 研究結果

ホルムアルデヒドの経気道暴露による動物実験の方法について、過去の文献を検索した(表1)。

これらの報告の暴露濃度は、Swenbergら(1980)およびChangら(1981、1983)が2~15 ppm、Kernsら(1983)が2~14.3 ppm、Maronpotら(1986)が2~

40 ppm、Monticelloら(1991、1996)が0.7~15 ppmであった。なお、他の化学物質との複合暴露実験では、KulleとCooper(1975)がオゾンとの混合暴露を0.5~2 ppm、Albertら(1982)が塩化水素との混合暴露を14 ppmの濃度で行っている。これらの動物実験で用いているホルムアルデヒドの発生、濃度制御および、濃度モニターの方法について以下に述べる。また、過去の文献で用いられていない方法に関する情報についても記載した。

1 ホルムアルデヒドの発生方法

これまでの動物実験で用いられている発生方法は、①パラホルムアルデヒドを加熱する方法、②ホルマリン水溶液を噴霧する方法である。また、これまでの実験では用いられていない方法として、ホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法がある。

1)パラホルムアルデヒドを加熱する方法

固体であるパラホルムアルデヒドを発生容器中で加熱し、昇華したホルムアルデヒドを希釈して動物に暴露する方法であり、Swenbergら(1980)、Changら(1981、1983)、Kernsら(1983)、Monticelloら(1991、1996)、KulleとCooper(1975)およびAlbertら(1982)がこの方法を用いている。

加熱温度は、Swenbergら(1980)が54~82℃、Changら(1981、1983)が70~90℃、Albertら(1982)が75~90℃であり、発生容器の容量と加熱温度によってホルムアルデヒド蒸気の発生量を調整している。発生したホルムアルデヒドを発生容器から送り出すキャリアーガスは、空気を使用している報告が多いが、Monticelloら(1991、1996)は窒素ガスを用いている。

2)ホルマリン水溶液を噴霧する方法

ホルマリン水溶液をネフライザーを用いて噴霧することによりホルムアルデヒド蒸気を発生させる方法であり、Maronpotら(1986)が用いている。この方法で使用するホルマリン水溶液は、重合を防止するために5%から13%の割合でメチルアルコールが添加されていた。

3)ホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法

現在、大気汚染物質測定用に標準ガスが市販されている。ホルムアルデヒドについても、1ppmと20 ppmの標準ガスが入手できる。この標準ガスボンベのホルムアルデヒドをさらに希釈して動物に暴露する方法である。充填容量は500Lと2000Lのボンベがある。バランスガスとして窒素が用いられている。重合防止のための添加剤は使用されていないが、メーカーは有効期限を3ヶ月としている。1 m³の吸入チャンバーを使用し、換気量を12回/時間に設定し、6時間/日暴露した場合の標準ガスの必要量を表2に示した。なお、1 m³の吸入チャンバーは、ラットあるいはマウスを20匹収容し、暴露することができる。

2 ホルムアルデヒドの濃度制御の方法

発生したホルムアルデヒドを空気と混合し、設定濃度に希釈して、動物を収容した吸入チャンバーに送気する方法である。

いずれの報告も発生したホルムアルデヒド蒸気と空気との流量比をフローメータにより調整し、一定濃度のホルムアルデヒド混合空気を作成している。その他の工夫として、Swenbergら(1980)、Changら(1981、1983)は、発生容器の容量と加熱温度によってホルムアルデヒド蒸気の発生量を調整している。また、Changら(1981、1983)は、発生したホルムアルデヒド蒸気をテドラバックに一時的に集め、テドラバックからの流量により微調整している。KulleとCooper(1975)、Albertら(1982)はホルムアルデヒド発生装置と吸入チャンバーの間に混合槽を設け、段階的に希釈している。

希釈に使用する空気については、過去の実験報告では特に考慮されていない。しかし、大気中のホルムアルデヒド濃度は、一般環境大気で0.2~7 ppb(幾何平均値:2 ppb)、室内空気で16~211 ppb(幾何平均値:50 ppb)と報告されている(環境省、2002)。

3 吸入チャンバー内のホルムアルデヒド濃度をモニターする方法

Changら(1981、1983)、Kernsら(1983)、Maronpotら(1986)、Monticelloら(1991、1996)は赤外分光光度計を使用してホルムアルデヒド濃度をモニターしている。これに対し、KulleとCooper(1975)、Albertら(1982)は、吸入チャンバー内の空気を捕集し、Chromotropic acid法により、濃度分析を行っている。Swenbergら(1980)は赤外分光光度計による濃度監視を0.5時間ごとに行うとともに、7~10日ごとにChromotropic acid法による確認を実施している。

ホルムアルデヒドの測定方法は、①気中濃度を直接測定する方法、②捕集法による分析がある。

1) 気中濃度を直接測定する方法には、赤外分光光度計、ガスクロマトグラフィー、光音響ガスモニター等の機器が用いられている。赤外分光光度計によるホルムアルデヒドの分析限界は数ppmであり、空気中に混在する他のガスの影響を受けやすい。ガスクロマトグラフィーによる方法は、メタナイザによるメタン変換後にFID検出器で測定すると測定限界が100 ppb、PDD検出器で測定すると測定限界が30 ppbである。光音響ガスモニターは、赤外線を吸収する性格を利用する方法であり、測定限界が40 ppbであり、測定に要する時間が1分未満である。

2) 捕集法による分析は、一般環境大気中のホルムアルデヒド濃度の測定に使用されている方法である。捕集剤にDNPH含浸シリカゲルを用い、高速液体クロマトグラフィーにより分析する方法では、20 Lの空気(1000 ml/分、20分)を捕集するとホルムアルデヒド濃度をppb単位で測定することができる。

D. 考察

ホルムアルデヒドを対象として、極低濃度の化学物質を動物に経気道暴露する方法について検討するため、過去の動物実験における暴露手法について情報を収集した。これまでの動物実験の暴露濃度は、最も低濃度の実験でも0.5 ppmであり、今

回の目標濃度である100 ppbから1 ppbの濃度レベルの実験にそのまま応用できる情報は入手できなかった。そこで、100 ppbから1 ppbの濃度レベルの極低濃度実験の実現のために、①ホルムアルデヒドの発生方法、②ホルムアルデヒドの濃度制御の方法、および③吸入チャンバー内のホルムアルデヒド濃度をモニターする方法について、過去の報告の中で応用可能なもの、および新規の方法について考察した。

1)ホルムアルデヒドの発生方法

パラホルムアルデヒドを発生容器中で加熱する方法とホルマリン水溶液を噴霧させる方法がある。ホルマリン水溶液を噴霧させる方法は、水溶液中のホルムアルデヒド濃度を下げることによって極低濃度暴露を実現させる可能性が有る。しかし、市販されているホルマリン水溶液は重合防止のためメチルアルコールを添加しているため、メチルアルコールの影響を考慮する必要がある。これに対し、パラホルムアルデヒドを発生容器中で加熱する方法はホルムアルデヒドのみの蒸気を得られるという利点があり、過去の動物実験の多くがこの発生方法を採用してきた。しかし、目標とする極低濃度レベルの実験では、従来の実験の10倍から1000倍低い暴露濃度が要求されるため、極少量のホルムアルデヒドを恒常的に発生させる必要がある。パラホルムアルデヒドを加熱する方法は、温度やキャリアガスの流量によってホルムアルデヒドの発生量の変動する。このため、極低濃度暴露では、テドラバックや混合槽に一定濃度のホルムアルデヒド蒸気を集め、ここから少量のホルムアルデヒド蒸気を吸入チャンバーに送気する方法を併用する必要がある。この課題を解決する方法として、環境中汚染物質の測定用に市販されているホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法がある。この方法では、一定濃度のホルムアルデヒド蒸気をガスボンベから得られ、また、送気量の調整も容易である。1 m³の吸入チャンバーを使用し、換気量を12回/時間とした場合、1ppmの標準ガスを、流量を0.2 L/分で

送気すれば、1 ppbの暴露レベルを得ることができると予測される。現在市販されている大気汚染物質用の標準ガスは、ビニルクロライド、ジクロロメタン、クロロホルム、ベンゼン、1,2ジクロロエタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,3ブタジエン、アクリロニトリル、アセトアルデヒド等であり、ホルムアルデヒド以外の化学物質の極低濃度暴露実験にも応用できる可能性がある。

2)ホルムアルデヒドの濃度制御の方法

いずれの報告も発生したホルムアルデヒド蒸気と空気との流量比をフローメータにより調整し、一定濃度のホルムアルデヒド混合空気を作成している。極低濃度レベルの実験でも、フローメータまたはガスフローコントローラを用いたホルムアルデヒド蒸気と空気の混合が基本となる。しかし、ホルムアルデヒド蒸気の流量を調整するフローメータの機能には限界があるため、安定した混合比を得るための限界が存在する。すなわち、1 m³の吸入チャンバーを使用し、換気量を12回/時間とした場合、空気200 L/分に対し、ホルマリン蒸気の流量を調節するフローメータの安定した流量は0.2 L/分程度であり、希釈率は1000倍以内を限度と考える必要がある。この希釈率の範囲で極低濃度暴露の目標濃度を達成するためには、前述した混合槽による段階希釈や標準ガスを使用した方法が必要になる。その他、極低濃度暴露の特殊性として、希釈する空気中に含まれる化学物質に対する考慮する必要がある。このため、送気側に活性炭等のフィルターを装備し、希釈に使用する空気から化学物質の除去する必要がある。

3)吸入チャンバー内のホルムアルデヒド濃度を測定する方法

経気道暴露実験では、通常、15分毎に吸入チャンバー内の化学物質の濃度を測定し、暴露精度を確認している。また、濃度制御の操作でも、ホルムアルデヒド蒸気と空気の混合比を調節するために短時間にチャンバー内の濃度をモニターすることが必要である。これまでのホルムアルデヒドの暴露

実験は赤外分光光度計による濃度監視を行なっているものが多い。しかし、赤外分光光度計によるホルムアルデヒドの分析限界は数ppmであり、空気中に混在する他のガスの影響を受けやすい。このため、ppb単位の極低濃度暴露には赤外分光光度計による濃度監視は応用できない。また、その他の気中濃度を直接測定する方法の測定限界も、ガスクロマトグラフィーが30 ppb、光音響ガスモニターが40 ppbであり、目標とする10 ppb以下の測定には使用できない。これに対し、捕集法による分析はppb単位の測定が可能であるが、空気の捕集時間、抽出、測定のために要する時間が長く、通常の暴露実験で吸入チャンバー内濃度の精度監視として実施している15分毎の測定には適していない。今回の調査では、極低濃度暴露実験で吸入チャンバー内の濃度を常時監視するための条件にあった分析手法を入手できなかった。①濃度制御をモニターするための混合槽や標準ガスの濃度測定には直接測定が適し、②吸入チャンバー内の暴露濃度の精度を確認のためには捕集法による分析が適している。従って、現在の分析技術を使用してホルムアルデヒドの極低濃度暴露実験を実現するためには、両者を併用するのが合理的であると考えられる。

E. 結論

極低濃度暴露で生じる健康影響を検出するエンドポイントの有効性を実証することを目的として、化学物質を生活環境中の濃度に即した極低濃度で動物に経気道暴露する手法について検討した結果、以下の結論を得た。

- 1) 発生方法は、市販されている標準ガスを利用することによって簡便化できる。
- 2) 空気との混合および濃度制御の方法は、流量比による制御が基本であり、極低濃度暴露の場合には希釈率の限界を考慮して混合槽による段階希釈等を行う必要がある。また、希釈に使用する空気からの化学物質の除去が必要である。

3) 濃度測定は、濃度制御のためのモニターには直接測定、吸入チャンバー内の暴露濃度の精度を確認のためには捕集法による分析が適しており、極低濃度暴露実験には、両者を併用するのが合理的である。

参考文献

Albert RE, Sellakumar AR, Laskin S, Kuschner M, Nelson N, Snyder CA. 1982. Gaseous formaldehyde and hydrogen chloride induction of nasal cancer in the rat. JNCI 68: 597-603.

Chang JCF, Steinhagen WH, Barrow CS. 1981. Effect of single or repeated formaldehyde exposure on minute volume of B6C3F1 mice and F-344 rats. Toxicology and Applied Pharmacology 61: 451-459.

Chang JCF, Gross EA, Swenberg JA, Barrow CS. 1983. Nasal cavity deposition, histopathology, and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposure in B6C3F1 mice and F-344 rats. Toxicology and Applied Pharmacology 68: 161-176.

Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. 1983. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. Cancer Research 43: 4382-4392.

Kulle TJ, Cooper GP. 1975. Effects of formaldehyde and Ozone on the trigeminal nasal sensory system. Arch Environ Health 30: 237-243.

Maronpot RR, Miller RA, Clarke WJ, Westerberg RB, Decker JR, Moss OR. 1986. Toxicity of formaldehyde vapor in B6C3F1 mice exposed for 13 weeks. Toxicology 41: 253-266.

Monticello TM, Miller FJ, Morgan KT. 1991. Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subchronic inhalation of formaldehyde. Toxicology and Applied Pharmacology 111: 409-421.

Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leininger JR, Kimbell JS, Seilkop S, Star TB, Gibson JE, Morgan KT. 1996. Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. Cancer Research 56: 1012-1022.

Swenberg JA, Kerns WD, Mitchell RI, Gralla EJ, Pavkov KL. 1980. Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor. Cancer Research 40: 3398-33402.

環境省環境保健部環境リスク評価室、化学物質の環境リスク初期評価(平成9～12年度)、2002年

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 ホルムアルデヒドの経気道暴露による動物実験の方法

暴露濃度	暴露期間	暴露形態	動物種	発生方法	濃度制御	濃度測定	文献名 (施設)
2~15 ppm	6 時間／ 日、5 日 ／週、18 ヶ月	全身暴露 (吸入チャ ンバー、5 m ³)	ラット	パラホルムア ルデヒドを加 熱 (54 ~ 82°C)	加熱容器の 大きさ、加熱 温度、流量 により調整	赤外分光光度計 (0.5 時間ご と)Chromotropic acid method で確 認(7-10 日ごと)	Swenberg et al., 1980 (CIIT、 Battel Colombus)
2~15 ppm	6 時間／ 日、4 日	全身暴露 (吸入チャ ンバー、 391 L)	マウス ラット	パラホルムア ルデヒドを加 熱 (70 ~ 90°C)	加熱容器の 大きさ、加熱 温度、流量 により調整	赤外分光光度計	Chang et al., 1981, 1983 (CIIT)
2~15 ppm	10 分間	頭部暴露	マウス ラット	パラホルムア ルデヒドを加 熱、テドラバ ックに集める (3000 ~ 3500 ppm)	テドラバック からの流量を 調節 0.4~56 ppm	赤外分光光度計	Chang et al., 1981, 1983 (CIIT)
2.0~14.3 ppm	6 時間／ 日、5 日 ／週、24 ヶ月	全身暴露 (吸入チャ ンバー、5 m ³)	マウス ラット	パラホルムア ルデヒドを加 熱		赤外分光光度計	Kerns et al.,1983 (Battel Colombus、 CIIT)
2~40 ppm	6 時間／ 日、5 日 ／週、13 週間	全身暴露 (吸入チャ ンバー、 2.3 m ³)	マウス	ホルムアル デヒド水溶液 (1.8 %、 W/V)をネフ ライザーで 噴霧		赤外分光光度計	Maronpot et al., 1986 (NIEHS、 Battel Pacific NW)
0.7~15 ppm	6 時間／ 日、5 日 ／週、1 日~24ヶ 月	全身暴露 (吸入チャ ンバー、8 m ³)	ラット	パラホルムア ルデヒドを加 熱(窒素をキ ャリアーガス とする)	キャリアーガ スの流量によ り調節	赤外分光光度計 (継続モニターし 1 時間ごとに記 録)	Monticello et al., 1991, 1996 (CIIT)
0.5~2 ppm (+オゾン)	1 時間	頭部暴露	ラット	パラホルムア ルデヒドを加 熱	混合槽を設 置、流量によ り調整	Chromotropic acid method	Kulle & Cooper.,1975 (Univ. Cincinnati)
14 ppm (+塩化水 素)	6 時間／ 日、5 日 ／週、生 涯	全身暴露 (吸入チャ ンバー、 1.5 m ³)	ラット	パラホルムア ルデヒドを加 熱 (75 ~ 90°C)	混合槽を設 置、流量によ り調整	Chromotropic acid method (0.5 時間ごと)	Albert et al.,1982 (New York Univ.)

表 2 標準ガスの必要量

目標濃度	1 ppm 標準ガス			20 ppm 標準ガス		
	標準ガス の流量/分	必要量/日 (6 時間)	1000 L ボンベの 暴露可能日数	標準ガス の流量/分	必要量/日 (6 時間)	1000 L ボンベの暴 露可能日数
1 ppb	0.2 L	72 L	27 日	0.01 L	3.6 L	540 日
10 ppb	2 L	720 L	2.7 日	0.1 L	36 L	54 日
100 ppb	20 L	7200 L	0.27 日	1 L	360 L	5.4 日

1 m³ の吸入チャンバーを使用し、換気量を 12 回/時間、6 時間/日暴露とした場合

分担研究報告書

室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

分担研究者 辻村 和也 財団法人化学物質評価研究機構日田事業所・副長

研究要旨

シックハウス症候群の原因物質のひとつと考えられているホルムアルデヒドの低濃度吸入暴露方法を検討した。実験環境下では、1-2 ppb レベルのホルムアルデヒドが存在した。ホルムアルデヒドの発生については、ホルムアルデヒドボンベ及びホルマリン希釈液をばっ気及び希釈することで低濃度(設定濃度 30 ppb)～高濃度群(設定濃度 400 ppb)において6時間/日、7日間の安定な発生が可能となった。

A.研究目的

シックハウス症候群は、様々な要因が複雑に関係していると考えられるが、原因の一つと考えられるホルムアルデヒド等 13 物質については室内濃度指針値が設定されている。この指針値は、短期暴露時の刺激感覚、長期暴露による神経行動機能、生殖発生及び肝臓・腎臓への影響に基づいて指針値が設定されている。しかし、従来の動物法での症候検出可能濃度とヒトに於いて実際報告されている症候発生濃度には隔たりがある。本研究では、室内空気汚染化学物質であるホルムアルデヒドの低濃度吸入暴露方法を確立するほか、アレルギー関連物質のひとつである生体中ヒスタミンを測定することにより、化学物質の影響を検討する。

B.研究方法

吸入暴露実験:マウス(C57BL/6 12 週齢雄)を対象としたホルムアルデヒド吸入暴露を実施した。初期設定値として6時間/日の7日間反復暴露実施し、それぞれの日について暴露直後及び18時間後(暴露開始後6時間及び24時間)に肝臓、肺及び血液を遺伝子解析用(肝臓、肺)及びヒスタミン測定用(血液)に採取した。暴露用量は対照群を含み4濃度(対照群, 低濃度群:30 ppb, 中濃度群:

80 ppb, 高濃度群:400 ppb)を設定した(計:8群構成、各群3匹)。使用するチャンバーは、全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械株式会社)を用いた。図1に仕様を示す。高濃度及び中濃度群発生法はホルマリン(ホルムアルデヒド約37%、和光純薬工業)50倍希釈液をばっ気することにより発生させた。また、低濃度群は、市販20 ppmホルムアルデヒドボンベ(高千穂商事株式会社)を用いた。発生概略図は図2及び3に示す。

ホルムアルデヒド濃度測定:チャンバー内等の気中ホルムアルデヒド濃度測定は、市販DNPHカートリッジ(Sep-Pak XPoSure Aldehyde Sampler, Waters)を用いて捕集・誘導体化を行い、アセトニトリルで溶出定容後、DNPH誘導体化ホルムアルデヒドをHPLCで分離、定量した。捕集量22.5 L(1.5 L×15分)とした。

ヒスタミン濃度測定:マウス血漿に於いて酵素免疫測定(ELISA)により、シックハウス症原因4物質(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン)の単回強制経口投与でのヒスタミン濃度を測定した。使用動物は、マウス(C57BL/6 12-13 週齢雄)を対象とし、投与量は、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドについては、3, 30, 150 or 300 mg/kg、トルエン及びキシレンにおいては10, 100,

1000 mg/kg とした。採血は、投与後 2 時間とし、腹部大静脈から行った。

(倫理面への配慮)

動物愛護を考慮し、試験実施においても倫理面を配慮した実験動物の取り扱いを行った。

C. 研究結果

1. 低濃度吸入暴露法の確立

1.1 分析手法の確立及び実験環境下のホルムアルデヒド濃度確認

発生法検討に先立ち、気中ホルムアルデヒド分析手法の確立及び実験環境下の潜在的に存在するホルムアルデヒド濃度の確認を行った。

その結果、気中ホルムアルデヒド分析手法が確立された。分析条件を表 1 に示す。また、操作ブランク(n=3)から算出した定量限界値は、0.941 ppb(22.5 L サンプルング)であった。本研究においては 1 ppb を定量限界値と設定した。

次に、実験環境下における潜在的ホルムアルデヒド濃度の測定を行った。その結果を表 2 に示す。吸入実験室内、アイソレーションラック内(動物無・マウス飼育)及び屋外濃度は、それぞれ、1.61 ppb、1.89 ppb、1.95 ppb 及び 2.00 ppb であり室内においても屋外と同程度のホルムアルデヒド濃度であった。

また、換気流量を変化させた時の全身暴露チャンバー内濃度は、換気流量が増えるに従い、減少傾向が見られ、換気流量 300 L/分 15 分換気が最低濃度を示した。本条件(換気流量 300 L/分 15 分)で処理後の各全身暴露チャンバー内ホルムアルデヒド濃度を見ると、4.95~9.08 ppb であった。

次に、室内吸気 HEPA フィルター前に市販活性炭フィルターを設置し、その効果を確認した。この処理によるチャンバー内ホルムアルデヒド濃度に大きな変動はみられなかった。

1.2 発生法検討

室内濃度指針値である 80 ppb 及び日本化学会誌防災指針、厚生省「住宅建建材ガイドライン」(表 3)を参考に発生目標濃度を中濃

度群:80 ppb、高濃度群: 400 ppb とし、発生条件の検討を図 2 に示した装置を用いた。発生条件は、3 L/分及び 0.7 L/分の発生流量でばつ気、換気流量 300L/分、ウォーターバス温度及び冷却管温度をそれぞれ約 30℃ 及び 20℃ に制御した。発生後 0.5、1 時間の濃度測定を行った。中濃度及び高濃度それぞれ平均 75.4 ppb 及び 437 ppb の発生が可能であった。一方、低濃度群に於いては実験環境濃度を参考に目標濃度をチャンバー内バックグラウンド濃度の約 3 倍の 30 ppb とした。低濃度の発生には 20 ppm に濃度制御されたホルムアルデヒドボンベを用いた(図 3)。暴露チャンバーへの流量を 0.4 L/分に制御した。換気流量は 300 L/分で行った。発生後 0.5 時間、1 及び 3 時間の濃度は、それぞれ 20.8 ppb、30.2 ppb 及び 22.7 ppb(平均 24.6 ppb)であった。

次に同じ発生条件下で、高濃度群及び低濃度群について、マウス 12 匹/群、6 時間の単回暴露を行い、発生後 1、3、6 時間に於ける発生濃度の確認を行った。図 4 にサンプリング位置を示す。高濃度群における平均濃度は 464 ppm であった。一方、低濃度群では、平均濃度 34.7 ppm であった。それぞれのデータは、表 4 に示した。

1.3 ホルムアルデヒド 7 日間反復吸入暴露

1.2 で設定した条件で、7 日間の反復暴露を行った。試験デザインを図 5 に示す。又、発生濃度については、Day 1、3 及び 7 に於いて、発生開始後 1、3 及び 5 時間後にサンプリングを行い、実測定を行った。濃度監視に於いては、検知管を用いた。その結果、各濃度群における実測濃度の平均値は、低濃度群: 27.5±0.681 ppb(設定値 30 ppb)、中濃度群: 96.8±38.1 ppb(設定値 80 ppb) 及び高濃度群: 450±31.4 ppb(400 ppb) であった。これらの結果から、6 時間/日、7 日間の安定な発生が可能となった。

2. ヒスタミン測定

シックハウス症原因 4 物質(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン)を経口投与した時のマウス血漿中ヒスタミン濃度を

酵素免疫測定(ELISA)で定量した。表5に結果を示す。その結果、トルエンでわずかに用量依存的なヒスタミンの増加傾向がみられたが、他物質も含めて顕著なヒスタミン変動は見られなかった。

D. 考察

実験環境測定の結果から、吸入暴露室のホルムアルデヒド濃度は1.61 ppbであった。しかしながら、吸入チャンバー内濃度(換気後)は3~6倍程度高い結果となった。使用した吸入暴露チャンバーは、プロアを用いて処理された空気を排気することにより、チャンバー上部からHEPAフィルターを通して室内空気を希釈空気として導入するシステムである。以上のことから、HEPAフィルターからチャンバーへの経路にホルムアルデヒド濃度を上昇する要因があると考えられる。

今回、室内吸気HEPAフィルター前に市販活性炭フィルターを配置し、バックグラウンドのホルムアルデヒドの除去を試みたがその効果は無かった。今後、このコンタミネーションは極低濃度暴露を検討する上で課題と考える。また、危惧された動物飼育環境は、外気と同レベルであり、通常の飼育管理で吸入実験室レベルの濃度であることが確認できた。

マウスを用いた単回及び7日間反復暴露の結果では、暴露中及び暴露後に於いて一般状態変化は確認されなかった。いずれの群に於いても著しい濃度減少は見られず、マウスの有無にかかわらず安定した発生が確認できた。

今回設定した濃度は、室内濃度指針値である80 ppb及び日本化学会誌防災指針、厚生省「住宅建建材ガイドライン」(表3)を参考にした。低濃度群(設定濃度:30 ppb)は、ヒトにおいて目、鼻、のどに対して刺激を感じないレベルである。また、中濃度群(設定濃度:80 ppb)は、室内濃度指針値であり、かすかに臭いの感じるレベルである。高濃度群(設定濃度:400 ppb)では、目への刺激が始まる濃度である。これらのことから、今回設定した濃度はヒトにおいて異なる影響を示す濃度であり、本研究目的において妥当な濃度設定と考えられ、この濃度を暴露したマウスの検証は、シ

ックハウス症候群を解明する上で有効な情報をもたらすと考えられる。

今後、ヒトでの暴露を想定した長時間の暴露法の検討を行う必要がある。又、遺伝子解析を行う上で、サーカディアンリズムのファクターを考慮し、暴露開始時間、臓器及び血液採取時間についても検討が必要と考えられる。また、ヒスタミン測定については、ホルムアルデヒド7日間反復吸入暴露を行った試料を測定するほか、ホルムアルデヒド以外の物質も含めて高濃度域の吸入暴露によるヒスタミン変動を確認する。

E. 結論

実験環境下では、1-2 ppbレベルのホルムアルデヒドが存在した。さらに低濃度暴露を検討する場合、この点が大きな課題となると予想される。

ホルムアルデヒドの発生については、ホルムアルデヒドボンベ及びホルマリン希釈液をばっ気及び希釈することで低濃度(設定濃度30 ppb)~高濃度群(設定濃度400 ppb)において6時間/日、7日間の安定な発生が可能となった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

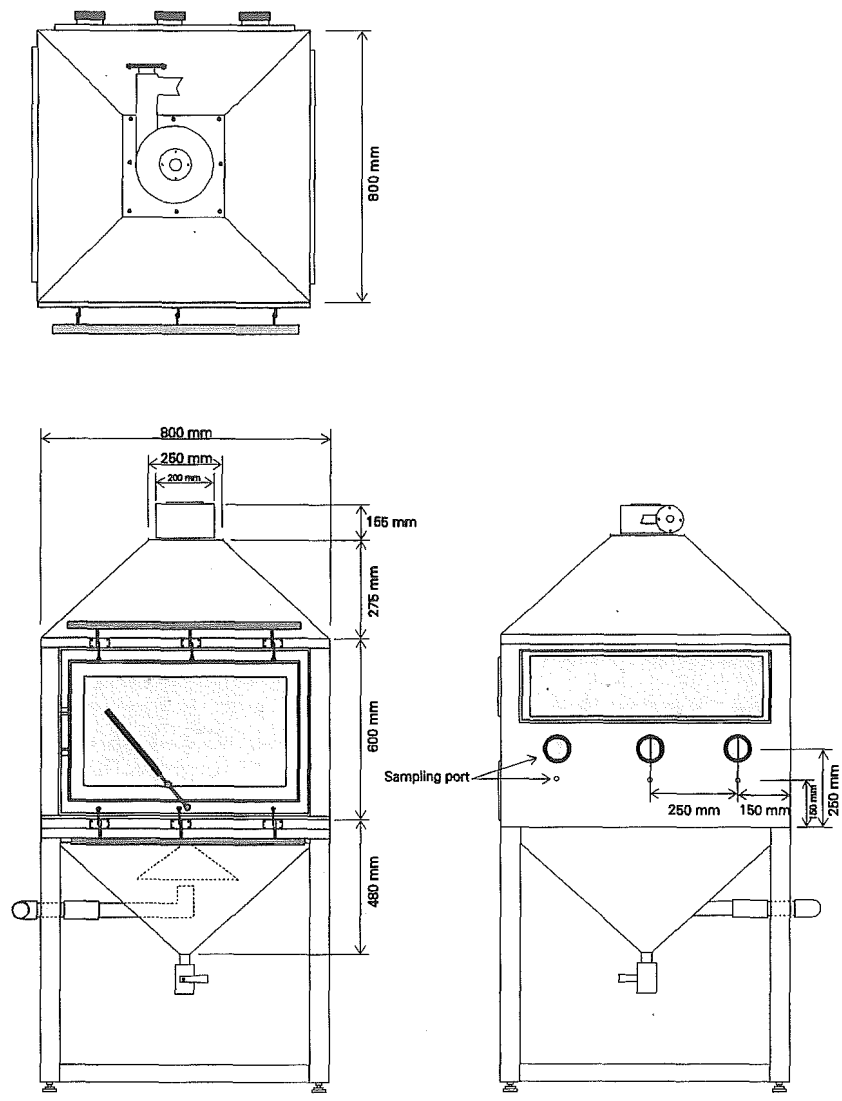
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



型 式: 全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械株式会社)
 材 質: ステンレス製 SUS-304(本体)、強化ガラス(観察窓)
 容 積: 563 L(全容積)
 動物収容部位: 800 W×800 D×600 H mm(気積 384 L)

図1 全身暴露チャンバー

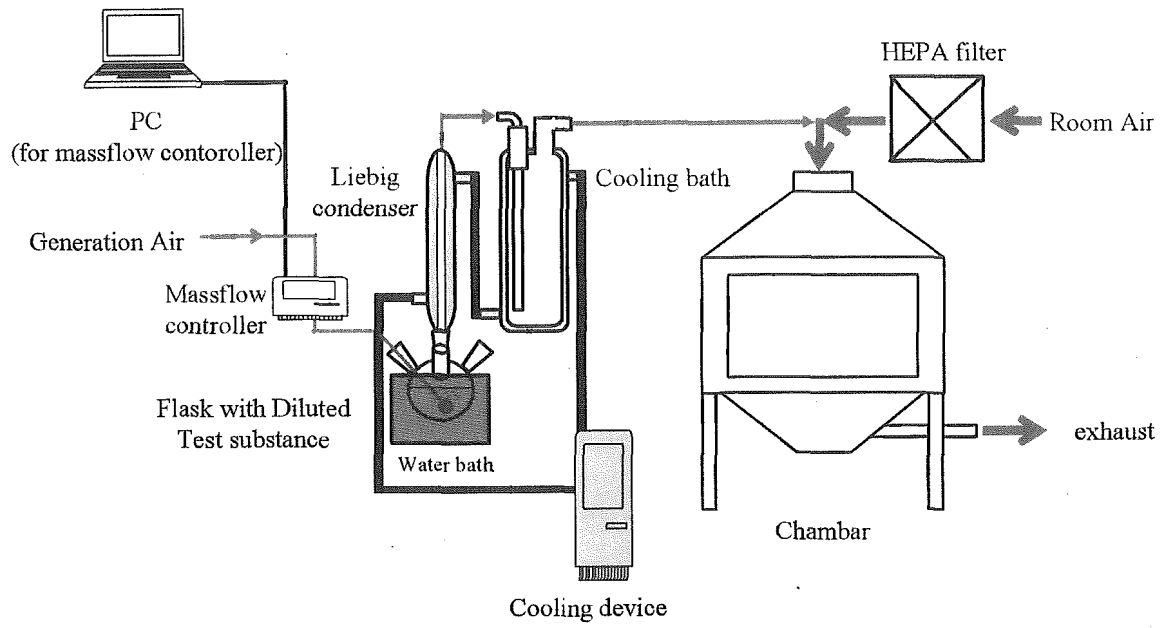


図2 発生概略図(中・高濃度)

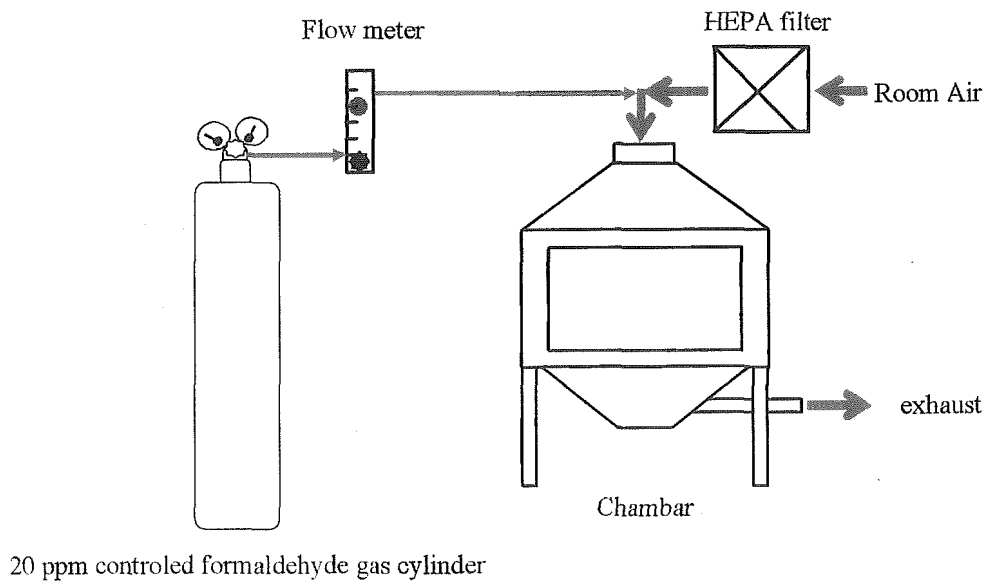


図3 発生概略図(低濃度)