

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質の経気道暴露による毒性評価手法の  
開発、高度化に関する研究

(H17-化学-一般-003)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 幸男

平成19(2007)年3月

別添1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に関する研究

(H17-化学-一般-003)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 幸男

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

化学物質の経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化にかんする研究

小川 幸男 ..... 1

II. 分担研究報告書

1. トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発と改良・吸入暴露実験の実施

小川 幸男 ..... 31

2. 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

菅野 純 ..... 39

3. 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

長野 嘉介 ..... 63

4. 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露に関する研究

辻村 和也 ..... 97

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 135

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 137

別添3

# I. 総括研究報告書

化学物質の経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に関する研究

主任研究者 小川 幸男 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部室長

研究要旨

気化性化学物質の吸入リスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現変動解析手法を吸入毒性学に適用する事により、日常生活に於いて使用、あるいは受動的に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する。このために、シックハウス症候群を念頭に置いた極低濃度吸入暴露実験系を確立し、網羅的遺伝子発現情報を基にした吸入トキシコゲノミクスデータベース(吸入DB)の生成・分析を実施する。

本研究の具体的な対象として取り上げたシックハウス症候群は、その原因物質とされるホルムアルデヒド、トルエン等の13物質に対して、室内濃度指針値が設定されている。これ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・腎への影響に基づいた設定値である。しかし、従来の動物試験法での症候検出可能濃度と、人に於いて実際に報告される症候発現濃度には隔たりがあることが指摘されている。そこで研究班を次の4つの分担研究によって構成し研究を進めた。トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露による網羅的遺伝子発現解析(小川)、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(菅野)、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(長野)、室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験(辻村)。尚、実験動物はマウスに限定した。

今年度、主任研究者は昨年度行った小変更により極性のホルマリンを始めとする多くの異なった気化性化学物質にも対応可能となった暴露施設を用い、アセトアルデヒド及びトルエンの極低濃度ガスのマウスへの暴露条件を検討した。まず、アセトアルデヒドについてバブリング式ガス発生法によって極低濃度暴露を試みたが困難であったため、長野班員との検討を経て標準ガスボンベを用いる方法に切り替えることで、安定した極低濃度暴露を可能とした。トルエンについても標準ガスボンベを採用し、極低濃度暴露可能な条件を設定した。この結果を受け、アセトアルデヒド、トルエンの極低濃度ガスをマウスに暴露し、肺及び肝の遺伝子発現の網羅的プロファイルを取得した。また、ホルムアルデヒドについても標準ガスボンベを用いた極低濃度暴露実験を追加した。菅野班員はアセトアルデヒド、トルエン、及びホルムアルデヒドの吸入暴露の網羅的遺伝子発現データを取得し、これと経口暴露時の肺、肝に於けるデータをもって、ホルムアルデヒドについて詳細に比較解析し、蟻酸成分及びメタノールを多く含む可能性のあるバブリング式ガス発生時にアルコールデヒドロゲナーゼが肺で発現誘

導されること、実際に蟻酸代謝に関わるクエン酸合成酵素や MOD1 が発現誘導されていることを明らかにした。また、肺線維症に関係するケモカイン CXC モチーフリガンド 12 や、びまん性肺胞障害や器質化肺炎に関係するスロンボスポンディン 1 の発現変化を捉えた。これらの結果はホルムアルデヒド影響メカニズム解析の糸口となると考えられる。長野班員は化学物質を極低濃度で実験動物に経気道暴露するための技術開発を目的として研究を進め、昨年度提案した各種気化性化学物質の連続暴露実験手順を元に、市販の標準ガスを利用した暴露方法の実用性を検証した。トルエンを対象とし、目標暴露濃度 70、200 及び 700 ppb の吸入暴露実験を行い、目標暴露濃度に対しほぼ 10% 以内の誤差範囲でトルエンの極低濃度暴露ができることを確認し、市販の標準ガスを利用した暴露方法が極低濃度暴露実験に利用できることを確認した。同時に、トルエンの 6 時間/日 x 7 日間暴露、及び 22 時間/日 x 7 日間暴露実験を実施し、遺伝子発現解析用に肺、肝を採取した(菅野班員が解析を担当)。辻村班員は、ヒトの暴露実態を考慮した 1 日 6 時間暴露法及び 22 時間暴露法を、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドについて設定し、両化学物質の 6 時間/日 x 7 日間暴露、22 時間/日 x 7 日間暴露を行い、肺、肝を採取した(菅野班員が解析を担当)。加えて、アレルギー関連物質のひとつである血中ヒスタミンを測定することにより、室内空気汚染化学物質の吸入暴露による影響を検討したが、空気対照群と比較し、顕著な変動は認められなかった。

#### 分担研究者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部部長  
長野 嘉介 中央労働災害防止協会  
日本バイオアッセイ研究センター  
・病理検査部 部長  
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

価システムを構築することを目的とする。また、高感度指標及び有害性指標としての有用性を検討する目的で、アレルギー関連物質ヒスタミンを高感度測定し、遺伝子発現変化解析とともに化学物質の生体反応の関連性についても検討する。化学物質としては、シックハウス症候群の原因物質として取り上げられている 13 物質を優先的に対象とする。これらの物質に設定されている室内濃度指針値は、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・腎への影響に基づいた設定値である。しかし、従来の動物試験法での症候検出可能濃度と、人に於いて実際に報告される症候発現濃度には隔たりがあることが指摘されている。

#### A. 研究目的

本吸入トキシコゲノミクス研究は気化性化学物質リスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現変化解析法を毒性学に適用するものであり、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質トキシコゲノミクスデータベースを構築することにより、インフォマティクス技術を活用した気化性化学物質の安全性評価の為の、より迅速、正確且つ安価な評

本研究により、吸入毒性発現メカニズムに基づいた、より正確な吸入毒性の評価及び評価システムの作成、更に、ヒトに於ける被害報告濃度と実験動物の器質変化濃度の乖離が

指摘されてきた吸入毒性分野の精度・感度向上への貢献を目指す。

## B. 研究方法

### (1) トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露

初年度はホルマリンをマウスに吸入暴露するシステムを整備、0.1ppm、0.3ppm、1.0ppmを目標値として発生条件を検討、暴露後に網羅的遺伝子発現解析を行うための肺及び肝を採取した。

本年度は、ボンベ入りの標準ガスを用いる暴露システムを新たに設置し、アセトアルデヒド、トルエン、及びホルムアルデヒドをマウスに吸入暴露する条件を検討、暴露後に網羅的遺伝子発現解析を行うための肺及び肝を採取した。

アセトアルデヒドは初年度のホルマリンと同様のバブリング方式での発生法で検討を開始したが、濃度を目標の0.03ppm、0.1ppm、0.3ppmまで低下させることが困難なため、ボンベ入りの標準ガス(濃度104ppm)を用いる方法へと変更した。トルエンも同様にボンベ入りの標準ガス(濃度203ppm)を用いて目標濃度を0.07ppm、0.2ppm、0.7ppmとしてマウスに暴露した。

また、初年度にホルムアルデヒド影響の解析を目的に実施したホルマリン暴露実験に関し、ホルマリンに蟻酸及びメチルアルコールが含まれていることを考慮し、メチルアルコールを含まないホルムアルデヒド標準ガスボンベを用いる実験を追加した。

いずれのガスについても、ボンベガスの流量を流量計で確認しつつ供給バルブで制御し、希釈流量を同様に制御しガス濃度調整を行い、高感度ホルムアルデヒドガスモニ

ターあるいはTVOCモニターによる測定と、捕集管による測定で安定して設定濃度を得られる条件を見出した。この条件でマウスへの暴露を行い、網羅的遺伝子発現解析を行うための肺及び肝を採取した。暴露時間は2時間とし、臓器採取は暴露終了直後、その2時間後、6時間後、及び22時間後の4時点にて実施した。

### (2) 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

#### 1) 試験デザイン

1. ガスの供給量の設定、1日6時間あるいは22時間の試行暴露、チャンバー内濃度均一性確認を行った。
2. トルエンの標準ガスを用いて、12匹のマウスに設定濃度での1日6時間、7日間連続暴露、9匹のマウスに設定濃度での1日22時間、7日間連続暴露の予備試験を行った。

#### 2) 吸入暴露装置

通常の暴露システムに47 Lのアルミ製ボンベに充填したトルエンの高圧標準ガス(発注濃度100 ppm)(高千穂商事)、制御バルブ、流量計、濃度測定用サンプリング装置を追加、改造して使用した。吸入チャンバーは予備飼育用の4台と暴露用の計8台の容量1,060Lステンレス製角錘型チャンバーを使用した。暴露時においてもマウスに給水、給餌を行うためケージには蓋付きの餌箱と自動給水ノズルを設置した。

#### 3) 飼育環境中のトルエン濃度の確認

実験に先立って、予備飼育検疫室、吸入暴露装置を設置する飼育室、吸入チャンバーのトルエン濃度を測定した。

4) 吸入チャンバー内のトルエンの濃度測定  
トルエンの標準ガスボンベを用い、理論値を基に、予備実験により動物がいない状態と動物を収容した状態で、標準ガスの供給量(流量)の調整を行った。均一性を確認するために、700 ppb の吸入チャンバーについて3箇所から同時に採気、トルエン濃度を測定した。

サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学)を用いて、捕集管(活性炭、ORBOTM-91 Tube, Large, SUPELCO)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。二硫化炭素(和光純薬工業)で抽出し、検量線の所定の範囲に入るように段階希釈し、ガスクロマトグラフ(ヒューレットパッカード社 HP5890A)により測定した。

### (3) 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒド(22 時間/日 x 7 日間暴露)及びアセトアルデヒド(6 時間/日 x 7 日間暴露、22 時間/日 x 7 日間暴露)の低濃度吸入暴露実験、高感度指標及び有害性指標としての生体内ヒスタミンの有用性検討を行った。

マウス(C57BL/6 解剖時12週齢 雄)を対象とし、全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械)を用い、暴露用量は4濃度を設定し、暴露時間は1日6時間あるいは1日22時間、7日間連続暴露した。

発生法は、ホルムアルデヒドはホルマリン希釈液をばっ気、アセトアルデヒドは標準ガスを封入したボンベを用い発生させた。また、餌及び水については暴露中も自由摂取とした。

遺伝子解析用の肺、肝の採取は、22 時間/

日では1日間暴露直後、3日間暴露直後、7日間暴露直後及び7日間暴露終了24時間後、6時間/日では1日間暴露終了直後(午後6時)及び翌日(午前10時)、3日間暴露終了翌日(午前10時)、7日間暴露終了翌日(午前10時)の4ポイント行った。ヒスタミン測定用の採血は22時間/日では1日間暴露直後、及び7日間暴露直後の2ポイント、6時間/日では1日間暴露終了直後(午後6時)及び翌日(午前10時)、7日間暴露終了直後(午後6時)及び翌日(午前10時)の4ポイント採取した。

暴露期間中1、3及び7日の、22時間/日では発生開始後1、21時間後に、6時間/日では1、3及び5時間後チャンバー内の気中濃度をDNPH捕集管で測定した。また、実験前環境(吸入実験室及び使用する暴露チャンバー)もDNPH捕集管による濃度測定を行った。ヒスタミン濃度測定は、マウス血漿において酵素免疫測定(ELISA)により行った。

ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの高濃度吸入暴露による血中ヒスタミン濃度の変動を確認した。使用動物はマウス(C57BL/6 CrSlc、12-13週齢)とし、両物質とも設定濃度を3及び15 ppmとした。暴露は、6時間の1回暴露とし、採血ポイントは、6時間暴露の直後とした。ヒスタミン濃度測定は、先の試験と同様に行った。

### (4) 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

(1)、(2)及び(3)の条件にて経気道暴露されたC57BL/6CrSlcマウスの肺と肝を採取して、当方が開発したPercellome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。データ解析に当たっては、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。

### C. 研究結果

#### (1)トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露

現有の暴露施設が非極性のベンゼン等の低濃度吸入暴露に適したシステムであったことを踏まえ、このシステムに小変更を加え、極性のホルマリンを始めとする多くの異なった気化性化学物質にも対応可能なものとするべく検討、改修を行い、ホルマリン低濃度ガス発生法と濃度の検出法を確定した。ホルムアルデヒド設定濃度 1.0ppm に対しては 0.74ppm、0.3ppm は 0.302ppm、0.1ppm は 0.175ppm の濃度を安定的に達成した。アセトアルデヒド設定濃度 0.3ppm に対しては 0.277ppm、0.1ppm では 0.094 ppm、0.03ppm は 0.028ppm の濃度を達成した。ホルムアルデヒドのボンベガスでは設定濃度 1.0ppm に対しては 1.017ppm、0.3ppm では 0.291 ppm、0.1 ppm では 0.107ppm の濃度を安定的に達成した。トルエン設定濃度 0.7ppm に対しては 0.643ppm、0.2ppm では 0.177ppm、0.07ppm は 0.061ppm の濃度を安定的に達成し、網羅的遺伝子発現データ解析のためのサンプルを採取した。各々の化学物質毎に詳細を記す。

##### 1)アセトアルデヒド

ホルムアルデヒド暴露試験と同様に、アセトアルデヒド希釈液をばっ気することにより発生させ、0.3、0.1、0.03ppm(室内汚染化学物質の室内濃度指針値 0.03ppm)濃度を得るための実験を行った。ホルムアルデヒド液(37%)の 1/100

希釈液のばっ気により目標濃度が得られたことから、アセトアルデヒド(99%)の 3/1000 希釈液を用いることで 0.1ppm 程度が得られる計算となる。次に、濃度を検知する方法であるが、初期には検知管(高濃度: 5~100 ppm、低濃度:1~20 ppm、ガステック)を用いて行い、高感度ホルムアルデヒドガスモニター(低濃度 :0.03~1.0 ppm、高濃度:0.3~5.0 ppm、理研計器)によるアセトアルデヒド濃度測定を試みた。最終的な濃度測定には室内汚染空気測定法に記載されている捕集管(ジーエルサイエンス)と液体クロマトグラフを組み合わせた測定法を用いて暴露試験全体の濃度評価を行った。

発生器の条件を、ホルムアルデヒド暴露試験と同様の温浴温度・冷却温度・発生器流量・希釈流量・供給流量に設定し、発生器内濃度を検知管により測定した。0.3%希釈液を用いた発生器内のガス濃度は 100ppm 以上を示し、0.1%に希釈倍率を上げてこの濃度は 100ppm 以上を示した。解決策として、標準ガスポンベを用いる方法を採用することとした。

新たに標準ガスポンベを用いる流路系を設置し、これに定流量バルブ及び流量計を組み込んだ。濃度 104ppm のアセトアルデヒド標準ガスポンベを高千穂商事より購入し、これを 3m<sup>3</sup> の横層流型チャンバー内へ換気送流させている空調した清浄空気により希釈し流入させた。捕集管により濃度を測定、その濃度データを基にボンベガスの流量を補正、濃度測定、を繰り返し行い、目標濃度 0.3、0.1、0.03ppm で暴露が行える流量を検討し、最終的に 0.277、0.094、0.028 ppm を達成した。

ボンベガスを用いて流量計でコントロールしつつ送風空気で単純に希釈するため、暴露時に一定した濃度が得られ、濃度の安定性には問題がないものと考えている。高感度ホルムア

ルデヒドガスモニターによる測定は、アセトアルデヒドに対し一定の反応性が見られず、使用は不能であった。

## 2)トルエン

トルエンの暴露試験は、新たに設置した標準ガスを利用する流路系を用い、標準ガスを購入、これを希釈し暴露を行う方法を採用することにより短期間で実験設定が可能となり、また安定した濃度が得られると考えた。トルエン標準ガスをチャンバー内の総換気空気により希釈する方式で暴露を行った。

トルエンのマウスへの暴露濃度を、室内汚染化学物質の室内濃度指針値である0.07ppm(260  $\mu$ g/m<sup>3</sup>)から、最低濃度を0.07ppmとし、中、高用量を0.2、0.7ppmと設定した。濃度203ppmのトルエン標準ガスボンベを高千穂商事より購入し、これを3m<sup>3</sup>の横層流型チャンバー内へ換気送流させている清浄空気650L/分により希釈、所定濃度にするには各チャンバーに0.07ppmでは0.24L/分、0.2ppmでは0.69L/分、0.7ppmでは2.86L/分を流入させた。チャンバー内濃度の安定性はTVOCモニター(FTVR-01、フィガロ技研)を用い最高濃度群について測定した。本機器は、測定端末に於いて総揮発性有機化合物を酸化した時に発生する微弱電流を測定することにより、その濃度をモニタリングする装置である。チャンバー内の揮発性有機化合物はトルエンのみであるため、他の揮発性有機化合物の妨害もなく、安定性をモニタリングすることが可能である。0.7ppm群チャンバーに於いて測定したモニター値では平均濃度2745.7 $\pm$ 196.3  $\mu$ g/m<sup>3</sup>と安定した濃度推移を示し、捕集管(活性炭)による最高濃度は0.643、中間濃度は0.177、低濃度は0.061ppmと目標値に近い値

であった。

## 3)ホルムアルデヒド(ボンベガス)

通常ホルマリン液には、ホルムアルデヒドの重合によりパラホルムアルデヒドが生成するのを防止するため、メチルアルコールが添加されている。また、蟻酸も含まれることが考慮される。前年度の実験で用いた和光純薬のホルマリン液(37%)にも、メチルアルコールが7~13%の割合で添加されている。メチルアルコールはシックハウス症候群の原因物質に挙げられていないが劇物に分類され、日本産業衛生学会の作業環境管理許容濃度は200ppm(260mg/m<sup>3</sup>)と設定している物質である。前年度の暴露試験に於いて、ガス濃度はホルムアルデヒドを対象に測定しており、メチルアルコールについてはどれだけの濃度で発生し、マウスに暴露されたかは不明であった。ホルムアルデヒドの約1/3量含まれるメチルアルコールの影響を確認するため、メチルアルコールを含まないボンベガスを用いる暴露試験を追加した。

前年度のパブリックで行ったと同じ濃度設定とした。すなわち、最低濃度を0.1ppmとし中高用量を、0.3、1.0ppmとした。

濃度約20ppm(20~25ppmの範囲にあるボンベ5本を連結)のホルムアルデヒド標準ガスボンベを高千穂商事より購入し、このガスを新たに設置した流路系から、換気送流させている清浄空気により希釈し3m<sup>3</sup>の横層流型チャンバー内へ流入させた。捕集管により濃度を測定、その濃度データを基にボンベガスの流量を補正し、所定の濃度で暴露が行える流量を決定し設定濃度を達成した。ホルムアルデヒドガスは、高濃度・高圧力下では重合して濃度が低下するため、ホルムアルデヒド標準ガスボンベとしては約20ppmという低濃度で圧力も低いも

のしか製造できないため、これにより1回の暴露に必要なガス量を得るには、5本を連結して同時に流す必要があり、これに対応する高圧配管を増設した。

ホルムアルデヒドガスの濃度検知は、チャンバー内濃度については捕集管(GL-Pak mini AERO DNPH, ジーエルサイエンス)を用いる方法で測定し、チャンバー内濃度の安定性についてはホルムアルデヒドガスモニター(FP-250 FLW型、理研計器社)を用い、最高濃度群について測定した。1.0ppm 群チャンバーに於いて測定したガスモニター値では平均濃度  $0.696 \pm 0.074$  と極めて安定した濃度推移を示し、捕集管値では 1.017, 0.291, 0.107ppm を達成した。

## (2) 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

本年度は、トルエンを被験物質とし、室内濃度指針値である 70ppb を考慮した 70、200 及び 700 ppb を目標暴露濃度として、市販の標準ガスを利用した暴露方法で 7 日間(6 時間/日と 22 時間/日)の暴露実験を行い、この暴露方法の実用性を検証した。

### 1) 吸入チャンバー内の環境

温度と湿度は、6 時間/日と 22 時間/日の両実験とも、設定条件(温度 20~24°C、湿度 30~70%)の範囲内で安定した値であり、良好な飼育条件下で動物実験ができることが確認できた。また、暴露濃度による影響はみられず、両実験間の差も認められないことから、群間及び実験間のデータ比較に際し飼育環境の差による影響がない実験が可能であることが確認できた。

換気量は、6 時間/日と 22 時間/日の両実験とも、設定値(212 L/分)に近似した値であり、

暴露期間内の標準偏差も 2%未満で安定していた。換気回数も設定(12±1 回/時)の範囲内であった。また、暴露濃度による影響はみられず、両実験間の差も認められなかった。従って、吸入チャンバーの換気量とトルエン標準ガスの供給量の流量比によるチャンバー内トルエン濃度の制御方法に関して、換気量を一定とみなしてよいことが確認できた。

### 2) 飼育環境中のトルエン濃度

実験に先立って①購入した動物を検疫のために予備飼育する検疫室、②吸入暴露装置を設置する飼育室、及び、③吸入チャンバー内について気中トルエン濃度を測定した。その結果、1.1~3.6 ppb のトルエンが検出された。従って、バックグラウンドとして動物がこれらの濃度のトルエンに暴露されている可能性を考慮する必要があることがわかった。

### 3) トルエンの標準ガスの品質

入手した標準ガスの特性を、GC/MS を用いて調べた結果、標準ガスがトルエンであることが確認できた。

吸入チャンバーの換気量とトルエン標準ガスの供給量の流量比によるチャンバー内トルエン濃度の制御方法には、均一な濃度の標準ガスの入手が必要である。今回入手した標準ガス(発注濃度 100 ppm)13 本の濃度は 103 ppm~105 ppm であり発注濃度よりやや高い値であったが、ボンベ間のばらつきは少なかった。従って、トルエンに関しては、均一な濃度の標準ガスの入手が可能であることが確認できた。

### 4) 新鮮空気との混合及び濃度制御の方法

新鮮空気との混合は標準ガスボンベのトルエンを吸入チャンバー上部のラインミキサーに

供給し新鮮空気と混合する方法、濃度制御はトルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量を流量計の値を目安にしてフローコントロールバルブを用いて調節する方法で実験を実施し、その実用性について検証した。

吸入チャンバー内の位置によるトルエン濃度の均一性を確認するために、吸入チャンバーの中央部(1箇所)及び両端(2箇所)の飼育ケージの直上部、計3箇所について同時に採気、トルエン濃度を測定した。その結果、各部位とも近似した値が得られ、吸入チャンバー内のトルエン濃度が均一であることが確認できた。

次に、標準ガスのラインミキサーへの供給量を流量計の値を目安にしてフローコントロールバルブを用いて調節する方法による吸入チャンバー内のトルエン濃度を実測検討したところ、6時間/日/7日間、22時間/日/7日間暴露実験共に目標暴露濃度に対しほぼ10%以内の誤差範囲でトルエンの極低濃度暴露ができることを確認した。

吸入実験では被験物質が吸入装置内や動物の被毛に吸着することがある。そこで、「トルエン標準ガスの供給量の設定値」を「希釈率から計算した供給量の理論値」と比較した。目標暴露濃度70、200及び700ppbの設定値が0.169、0.46及び1.54L/分であったのに対し、理論値はそれぞれ0.141、0.404及び14.1L/分であった。目標暴露濃度70、200及び700ppbの設定値は理論値の1.20、1.14および1.09倍であり、9%から20%に相当する量が吸着された可能性が示唆された。

#### 5) 吸入チャンバー内のトルエン濃度の測定方法

吸入チャンバー内のトルエン濃度は固相吸

着-溶媒抽出法により測定した。すなわち、捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引し、捕集剤からトルエンを溶媒抽出し分析した。捕集時間は、暴露時間に於ける総量を測定するために、暴露開始から暴露停止までの全時間とした。その結果、吸入チャンバー内のトルエン濃度は、最低濃度である700ppb群でもppbの単位の測定が可能であり、今回の方法は吸入チャンバーのトルエン濃度の把握に有効であった。通常の吸入実験では、吸入チャンバー内の被験物質の濃度データを基に、濃度制御の微調整を行っている。しかし、今回の測定法は、測定回数が1日1回であり、また、分析に要する時間が長いため、濃度制御に利用できなかった。吸入濃度の精度を向上させるためには、被験物質の濃度データを基に濃度制御を行うことが必要であり、即時性のある測定法の開発が今後の課題である。

#### (3) 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの長期低濃度吸入暴露実験を行うための暴露システムの整備に加え、高感度指標及び有害性指標としての生体内ヒスタミンの有用性検討を行った。

##### 1) ホルムアルデヒドのマウスを用いた極低濃度暴露試験(22時間/日x7日間暴露)

昨年度、ばっ気法による6時間の安定性は確認済みであったため、さらに5~22時間までを検討し、濃度平均値は中濃度で $0.0926 \pm 0.0121$  ppm、高濃度で $0.385 \pm 0.0446$  ppmと安定であることを確認した。

実験前の吸入実験室濃度は、平均値 $0.00318$  ppm(n=2)、使用前チャンバー内の濃度は、平均値で $0.00505 \sim 0.00866$  ppm(n=2)

であった。実試験における発生濃度については、1、3及び7日の発生開始1、21時間後に採気、測定を行い、低濃度群:0.0284±0.00655 ppm(設定値 0.03 ppm)、中濃度群:0.0934±0.0107 ppm(設定値 0.1 ppm)及び高濃度群:0.306±0.0198 ppm(設定値 0.3 ppm)、対照群は、0.00111±0.000294 ppmと低濃度群の1/25程度のバックグラウンドが検出された。

ヒスタミン濃度においては、1日間暴露直後及び7日間暴露直後の2ポイントにおいてホルムアルデヒド暴露に依存する顕著な変動は見られなかった。

#### 2) アセトアルデヒドのマウスを用いた極低濃度暴露試験(6時間/日x7日間暴露)

実験前の吸入実験室での濃度は、平均値0.00117 ppm(n=2)、使用前チャンバー内の濃度は、平均値0.000344~0.000721 ppm(n=2)であった。発生濃度については、1、3及び7日の発生開始1、3及び5時間後に採気を行い、暴露濃度の平均値は、低濃度群:0.0319±0.000932 ppm(設定値 0.03 ppm)、中濃度群:0.107±0.0141 ppm(設定値 0.1 ppm)及び高濃度群:0.329±0.00880 ppm(設定値 0.3 ppm)、対照群は0.00208±0.000788 ppmと低濃度群の1/15程度のバックグラウンドが検出され、6時間/日/7日間の安定な発生が可能であった。

ヒスタミン濃度においては、1日間暴露終了直後及び翌日(暴露終了後16時間後)、7日間暴露終了直後及び翌日(暴露終了後16時間後)ポイントにおいてホルムアルデヒド暴露に依存する顕著な変動は見られなかった。

#### 3) アセトアルデヒドのマウスを用いた極低濃度

#### 暴露試験(22時間/日x7日間暴露)

実験前の吸入実験室濃度は、平均値0.000477 ppm(n=2)、使用前チャンバー内の濃度は、0.000477~0.000860 ppm(n=2)であった。発生濃度については、1、3及び7日の発生開始後1及び21時間後に採気を行い、実験時の各濃度群における実測濃度の平均値は、低濃度群:0.0345±0.00159 ppm(設定値 0.03 ppm)、中濃度群:0.0924±0.00431 ppm(設定値 0.1 ppm)及び高濃度群:0.316±0.0130 ppm(設定値 0.3 ppm)、対照群は、0.00498±0.00277 ppmと低濃度群の1/7程度のバックグラウンドが検出された。

ヒスタミン濃度においては、1日間暴露直後及び7日間暴露直後の2ポイントにおいてアセトアルデヒド暴露に依存する顕著な変動は見られなかった。

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドいずれも所定の濃度で暴露が実施でき、網羅的遺伝子発現データ解析のためのサンプルを採取した。

#### 4) アルデヒド類の高濃度吸入暴露によるヒスタミン変動

先の3試験より、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した。しかし、日常的に暴露される極低濃度域では、ヒスタミンの変動は確認できなかった。更に、毒性影響が認められる濃度においてもアセトアルデヒドでやや上昇傾向は見られたが、用量相関性はなかった。

#### (4) 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

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  $\mu$ 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 時間後の群とし、更に 2, 6, 22 時間後採取群を 4, 8, 24 時間後の群とした。得られた肺、肝について、当方が開発した Percellome 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。

昨年度経気道短期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であった。一方、経気道暴露による肺では約 7 分の 1 の遺伝子数の発現変動が認められた。また、経口短期暴露では、肺の方が多くの種類の遺伝子発現変動が認められた。

今年度、6 時間/日 x 7 日間暴露、22 時間/日 x 7 日間暴露のデータを解析した結果、6 時間/日 x 7 日間暴露時に肺でアルコールデヒドロゲナーゼが発現誘導されることを見出した。そこで、暴露ガス発生方法を見直したところ、この発現誘導はメチルアルコール及び蟻酸成分を多く含む可能性のあるバブリング式ガス発生時に起こっていた。実際、蟻酸代謝に関わるクエン酸合成酵素や MOD1 の発現誘導はバブリングガスによる暴露時にのみ起こっていた。肺線維症に係るケモカイン CXC モチーフリガンド 12 が 2 時間/日暴露肺で発現上昇

していること、22 時間/日 x 7 日間暴露肺で、びまん性肺胞障害や器質化肺炎に係るスロンボスポンディン 1 が発現上昇することが明らかとなった。肺の病態への関与が報告されているこれらの遺伝子発現変化はホルムアルデヒド暴露影響に係る可能性があり注目される。

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肺、肝に於いて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もの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

(1)トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露

現有暴露施設のシステム変更を行い、極性気化性物質であるホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエンをマウスに短期間安定して低濃度暴露するシステムを確立した。それによりこれらの低濃度ガスをマウスに暴露し、肺及び肝の遺伝子発現解析用サンプル採取した。次年度も引き続きシックハウス関連物質の低濃度吸入暴露システムの構築を行う。次の物質としてキシレン暴露を検討中であり、スチレン、テトラデカン等について暴露検討を行い、サンプル採取し遺伝子発現プロファイル取得を行う。

(2)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

トルエンを被験物質とし、室内濃度指針値である70ppbを考慮した70、200および700ppbを目標暴露濃度として、市販の標準ガスを利用した暴露方法で7日間(6時間/日と22時間/日)の暴露方法の実用性について検討し実験を行った。目標暴露濃度に対しほぼ10%以内の誤差範囲でトルエンの極低濃度暴露ができることを確認、マウスに暴露し、肺及び肝の遺伝子発現解析用サンプル採取した。

### (3) 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの6時間/日及び22時間/日、7日間の極低濃度(室内濃度指針値0.03ppmを含む0.1及び0.3ppmの3濃度)での暴露が可能になり、マウスに暴露し、肺及び肝の遺伝子発現解析用サンプル採取した。

また、各試験における血中ヒスタミン濃度は、空気対照群と比較し、顕著な変動は無かった。また、高濃度吸入暴露した血中でもヒスタミンの顕著な変動はみられなかった。以上のことから、ヒスタミンをシックハウス症候群の指標とすることは難しいことが示唆された。

### (4) 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

網羅的遺伝子発現解析手法が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。計画した化学物質について肺、肝臓の比較を更に進め、新しい吸入毒性評価手法開発に役立つデータ解析を継続する。

## E. 考察

本研究の遂行によって期待される成果は、

人に於ける吸入毒性作用を、毒性発現のメカニズムに基づいて、より迅速、正確且つ詳細に予測可能となることにある。これにより、呼吸器、特に肺を第一の標的とした影響のみならず、血液を介した全身影響、あるいは嗅覚を介した神経影響等を包括的に評価することが可能となると期待される。特に、これまでに捕捉不能であった、器質的な変質を伴わない低濃度吸入暴露による毒性を、遺伝子発現解析を通じて検出することが可能となれば、それによりシックハウス症候群などの対応にも格段の改善が予想される。本年度、ホルムアルデヒドについて、その経気道暴露影響に関わる可能性のある遺伝子発現変化を捉えることが出来た。今後この知見を手がかりにホルムアルデヒド経気道暴露影響について解析を進めると共に、更に検討物質数を増やし2時間単回暴露、6時間/日/7日間暴露、及び22時間/日/7日間暴露実験を分担実施し、その影響差の検討を継続し、吸入毒性分野の精度、感度向上に貢献する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.(2006) Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(1):224-9

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T.(2006) "Per cell" normalization method for mRNA

measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics 29;7:64.

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. (2006) Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. Mol Endocrinol. 20(9):2141-55

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. (2006) Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(10):3651-6

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、Percellome Project による毒性トランスクリプトミクス新しい試み、細胞工学、2007年1月号、株式会社秀潤社

菅野 純、毒性の高精細解析に向けてのトキシコゲノミクス、医学のあゆみ Vol.218 No.12 2006.9.16 p1035-6

## 2. 学会発表

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法の概略と生物研究への応用、九州大学医学生研セミナー、2006年4月17日、福岡

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールとしての Percellome System、第95回日本病理学会総会、2006年4月30日-5月2日、東京

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法\*の概略と生物研究への応用、第104回熊本大学医学生研・拠点形成 A セミナー、2006年6月5日、熊本

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第10回がん分子標的治療研究会総会、2006年6月15日、東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、第33回日本トキシコロジー学会、2006年7月3-5日、名古屋

菅野 純、Percellom トキシコゲノミクス・プロジェクトの概要と基礎生物学への応用、明治薬科大学オープンカレッジ、2006年8月7日、東京

菅野 純、中津則之、相崎健一、DEN 初期遺伝子応答から見た好発癌系(C3H)と嫌発系(B6)マウスの差異、第65回日本癌学会総会、2006年9月28-30日、横浜

菅野 純、相崎健一、小川幸男、関田清司、北嶋 聡、ヒドロキシクエン酸による精巣毒性のトキシコゲノミクス解析、第96回病理学会総会、2007年3月13-15日、大阪

Kanno Jun, Aisaki Ken-ichi, Igarashi Katsuhide, Nakatsu Noriyuki, Kitajima Satoshi, Kodama Yukio, "PERCELLOME" TOXICOGENOMICS PROJECT FOR THE MECHANISM-BASED TOXICOLOGY, the SOT 46th Annual Meeting March 25-29, 2007

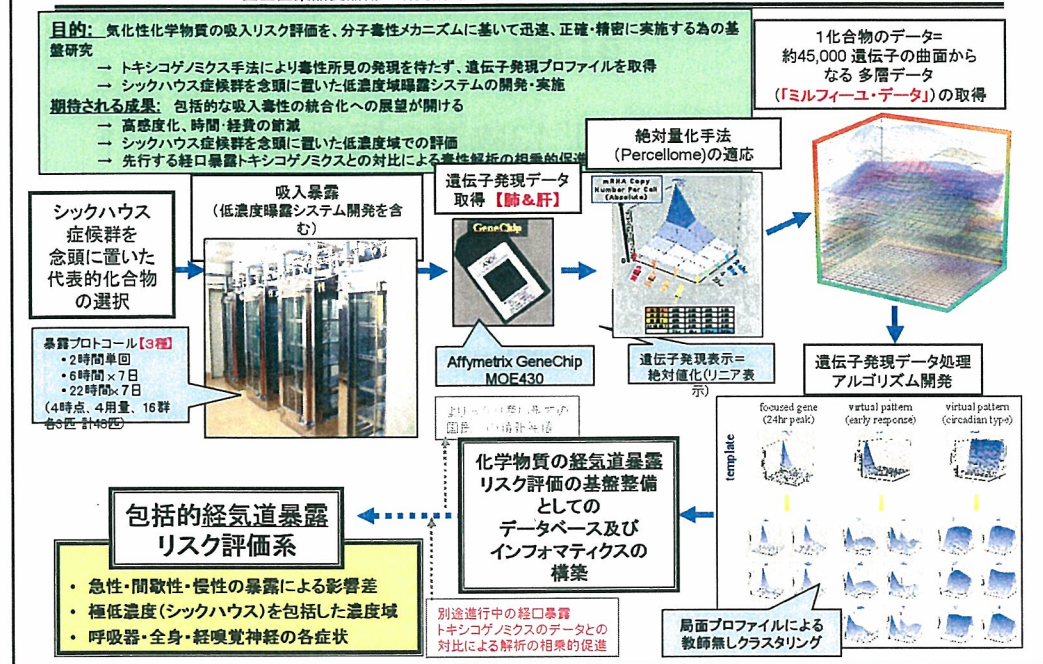
## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## 化学物質の経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 小川 幸男



## “シックハウス症原因”13物質

厚生労働省 シックハウス問題に関する検討会「室内空气中化学物質の室内濃度指針値」表より

物質	CAS.No	室内濃度指針値
ホルムアルデヒド	50-00-0	0.08ppm (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
トルエン	108-88-3	0.07ppm (260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
キシレン	1330-20-7	0.20ppm (870 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、
パラジクロロベンゼン	106-46-7	0.04 ppm (240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
エチルベンゼン	100-41-4	0.88 ppm (3800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
ステレン	100-42-5	0.05 ppm (220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
クロルピリホス	2921-88-2	0.07 ppb (1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )小児は0.007ppb
フタル酸ジ-n-ブチル	84-74-2	0.02ppm (220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
テトラデカン	629-59-4	0.04ppm(330 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	117-81-7	7.6ppb(120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
ダイアジノン	333-41-5	0.02ppb (0.29 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
アセトアルデヒド	75-07-0	0.03 ppm (48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
フェノバルブ	3766-81-2	3.8ppb (33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )

## 計画

- “シックハウス症原因”13物質の短期暴露
  - 4用量、4時点、16群、各群3匹(計48匹)、
  - 肺、肝、(脳)
- 背景暴露の影響の検討  
(世田谷区用賀のホルマリン濃度=0.001ppm)
- 長期低濃度暴露(連続、間歇)の検討(2~3物質)
- 先行実施中の経口暴露データとの比較

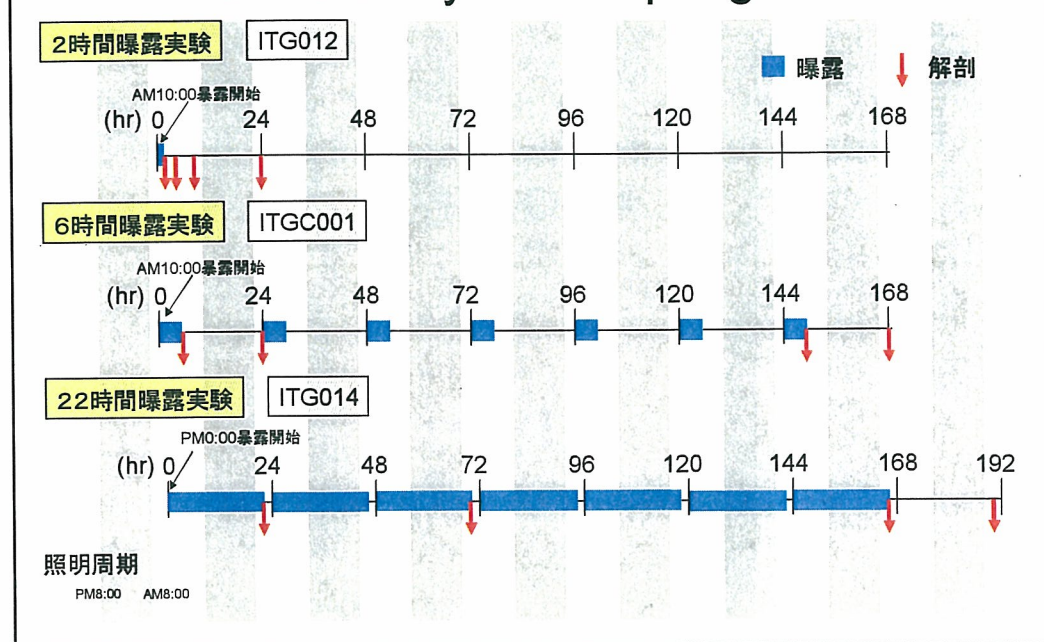
## 進捗(2006年末時点)

		2hr/単回 ppm				6hr/日/7日間 ppm				22hr/日/7日間 ppm			
		目標値	実測値	実測値		目標値	実測値	実測値		目標値	実測値	実測値	
ホルムアルデヒド	目標値	0.10	0.30	1.00	済	0.03	0.08	0.40	済	0.03	0.10	0.30	済
	実測値	0.17	0.30	0.74		0.03	0.10	0.45		0.03	0.09	0.31	
ホルムアルデヒド(ボンベガス)	目標値	0.10	0.30	1.00	済								
	実測値	0.11	0.29	1.02									
トルエン	目標値	0.07	0.20	0.70	済	0.07	0.20	0.70	済	0.07	0.20	0.70	済
	実測値	0.06	0.18	0.64		0.07	0.20	0.69		0.08	0.20	0.70	
アセトアルデヒド	目標値	0.03	0.10	0.30	済	0.03	0.10	0.30		0.03	0.10	0.30	
	実測値	0.03	0.09	0.28		試験実施中	試験実施中						
キシレン(予定)	目標値	0.20	0.70	2.00									
	実測値												
エチルベンゼン(予定)	目標値	1.0	3.0	10.0									
	実測値												
ステレン(予定)	目標値	0.05	0.15	0.50									
	実測値												

捕集管による精密低濃度測定を実施



## Formaldehyde sampling time



## 今年度実施した試験

1. アセトアルデヒド 曝露  
(ボンベガス)
2. ホルムアルデヒド 曝露  
(ボンベガス)
3. トルエン 曝露  
(ボンベガス)
4. キシレン (3月に曝露予定)  
(バブリング方式)



発生器

