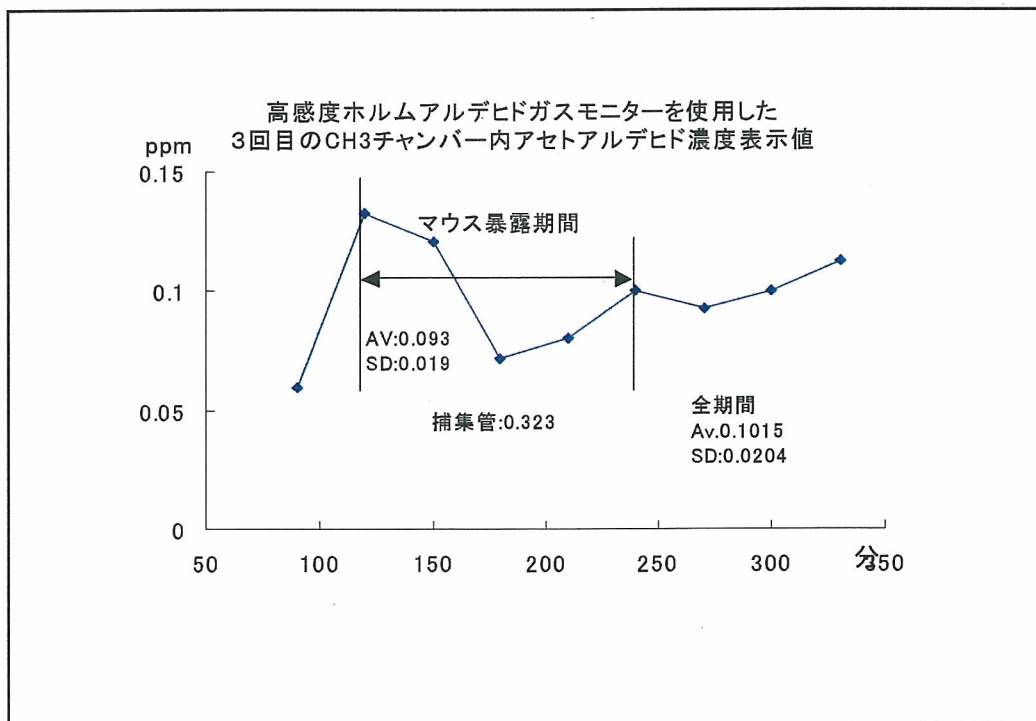
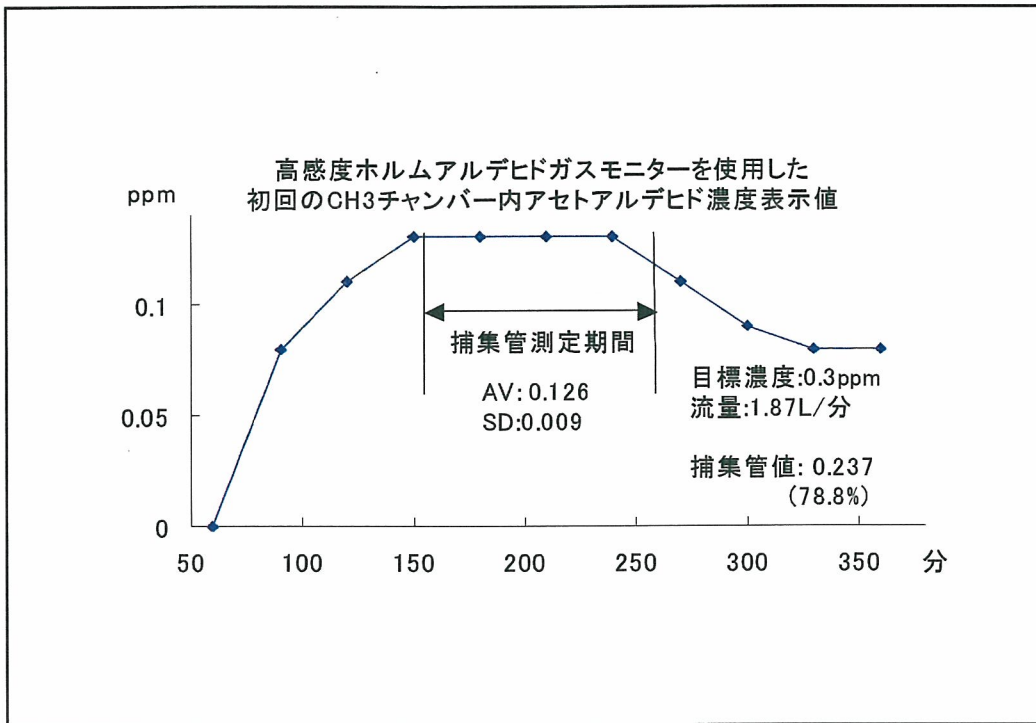


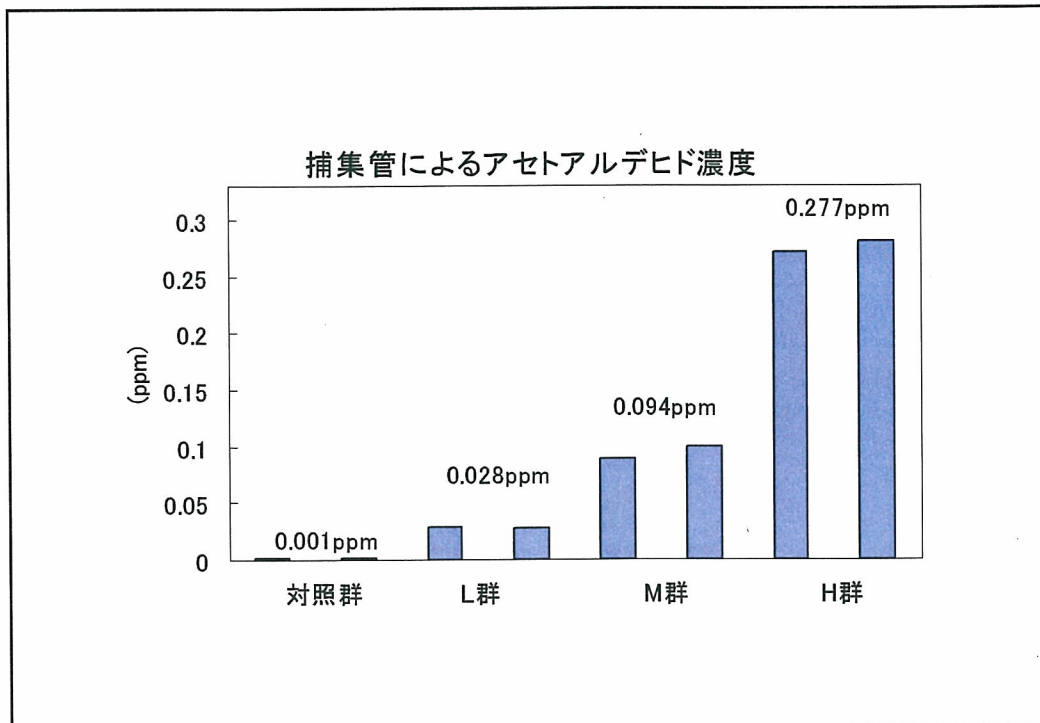


捕集管の採気用ポンプ

捕集管







1. アセトアルデヒド

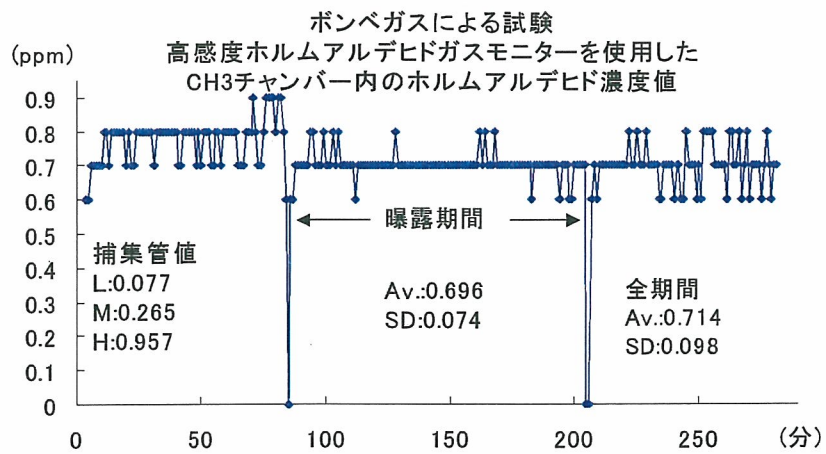
発生: ボンベガス(104ppm)

- ・初期段階ではホルムアルデヒドと同じバブリング法。
- ・0.1%まで液を希釈したが、発生濃度が下がらない。
- ・それ以上希釈倍率を上げると、発生器内量が枯渇する。
- ・ボンベガス用のシステムを増設
- ・ボンベガスを購入し、濃度試験・暴露を行った。

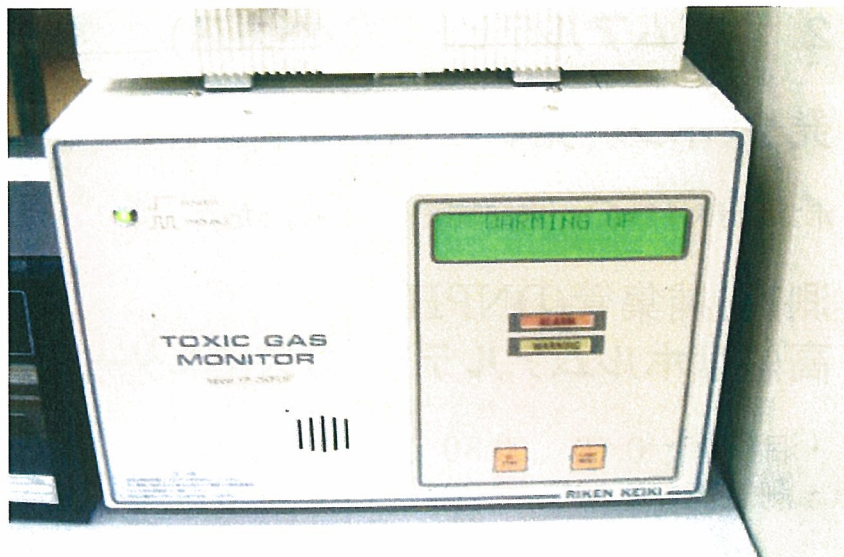
測定: 捕集管(DNPH)

- ・高感度ホルムアルデヒドガスモニターによる測定は不能。
- ・目標値 0.03、0.10、0.30 ppm
- ・測定値 0.028、0.094、0.277ppm

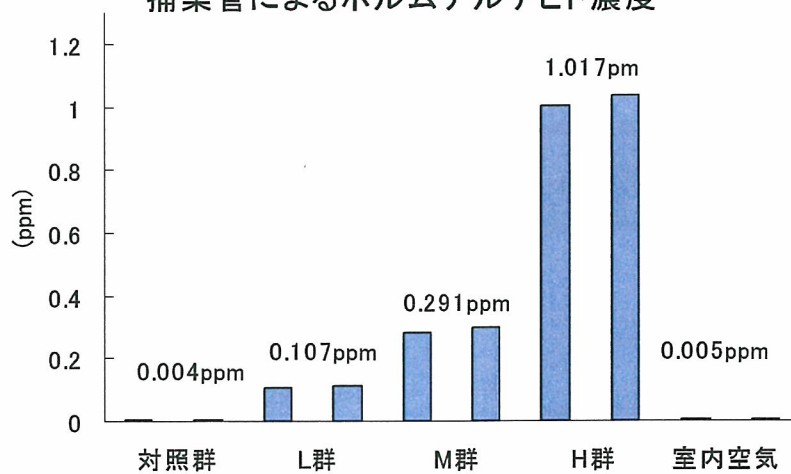
ホルムアルデヒドガスボンベ



高感度ホルムアルデヒドガスモニター〔理研計器〕



捕集管によるホルムアルデヒド濃度



2. ホルムアルデヒド(ボンベガス)

発生: ボンベ充填ガス(約20ppm)

ボンベガスを購入し、濃度試験・暴露を行った。

測定: 捕集管(DNPH)

高感度ホルムアルデヒドガスモニター

- ・ 目標値 0.10、0.30、1.00 ppm
- ・ 測定値 0.107、0.291、1.017ppm

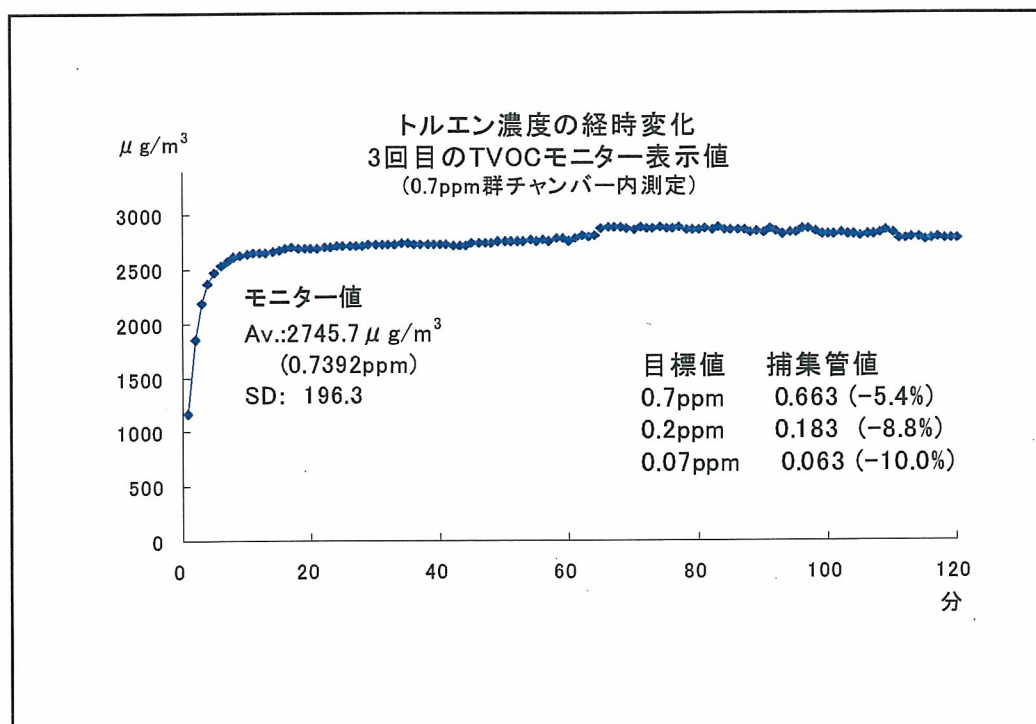
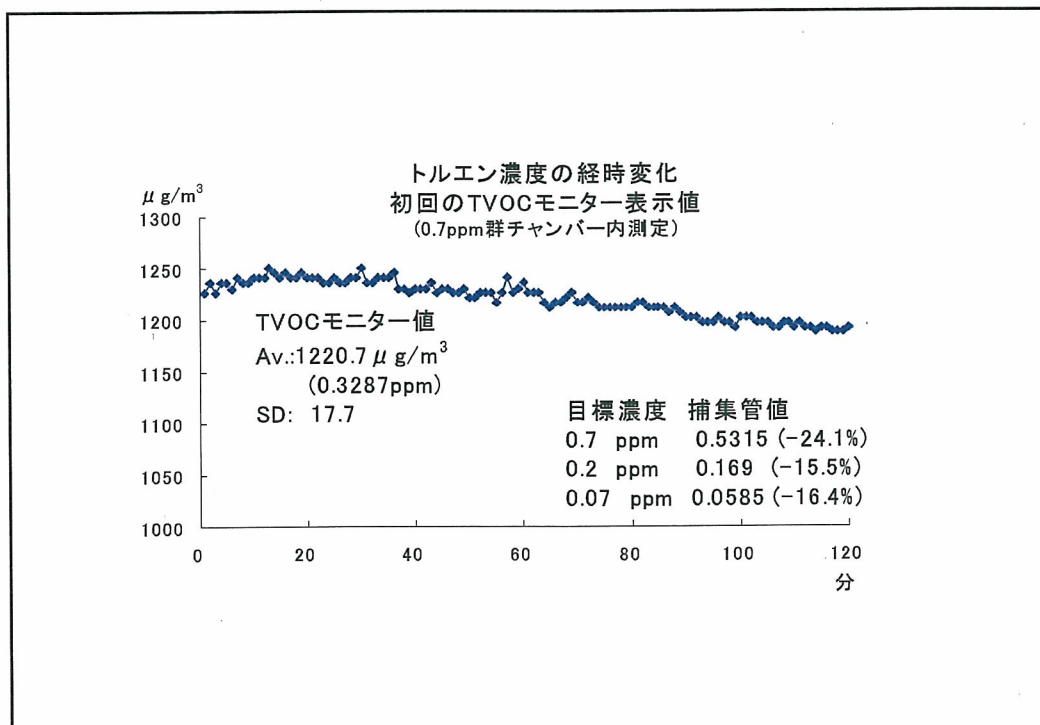
TVOCモニター

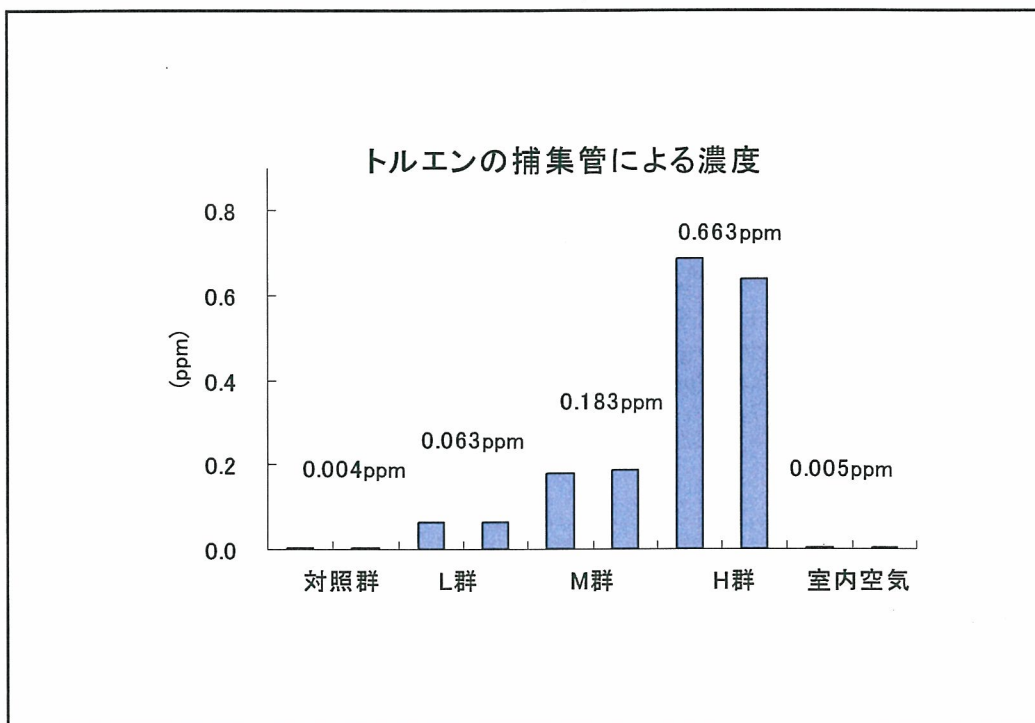


測定原理
有機ガスを酸化した
時の電位差を測定

標準ガスを用いて
キャリブレーションを
することで、正確な濃度
を測定できるとしている。

安定性を見るために使用





3. トルエン

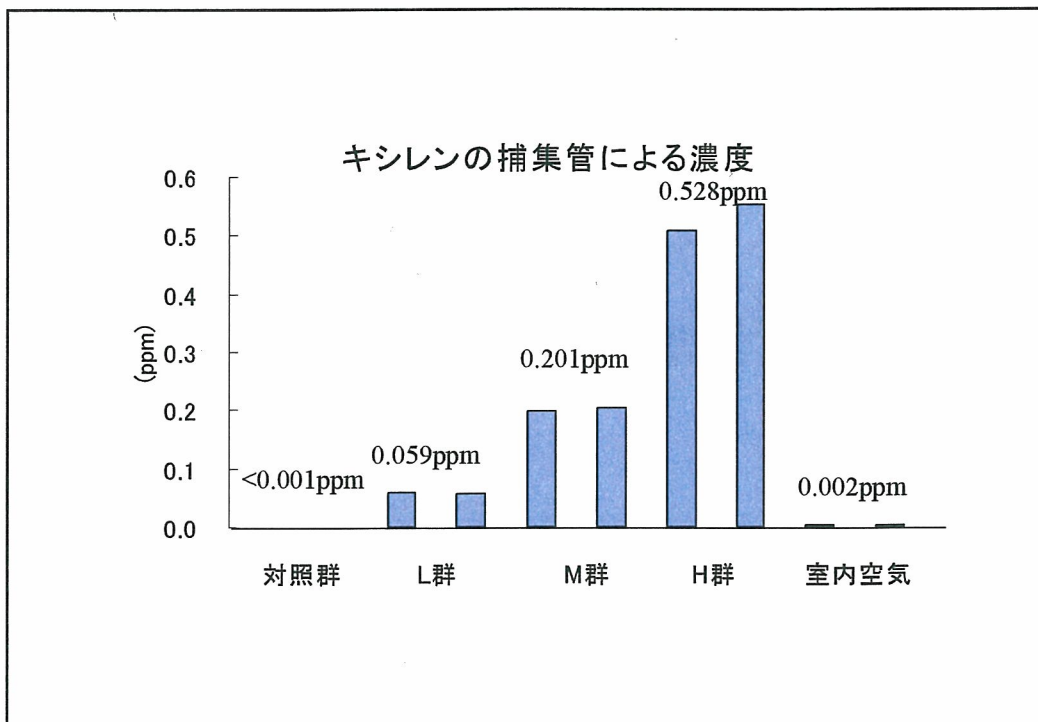
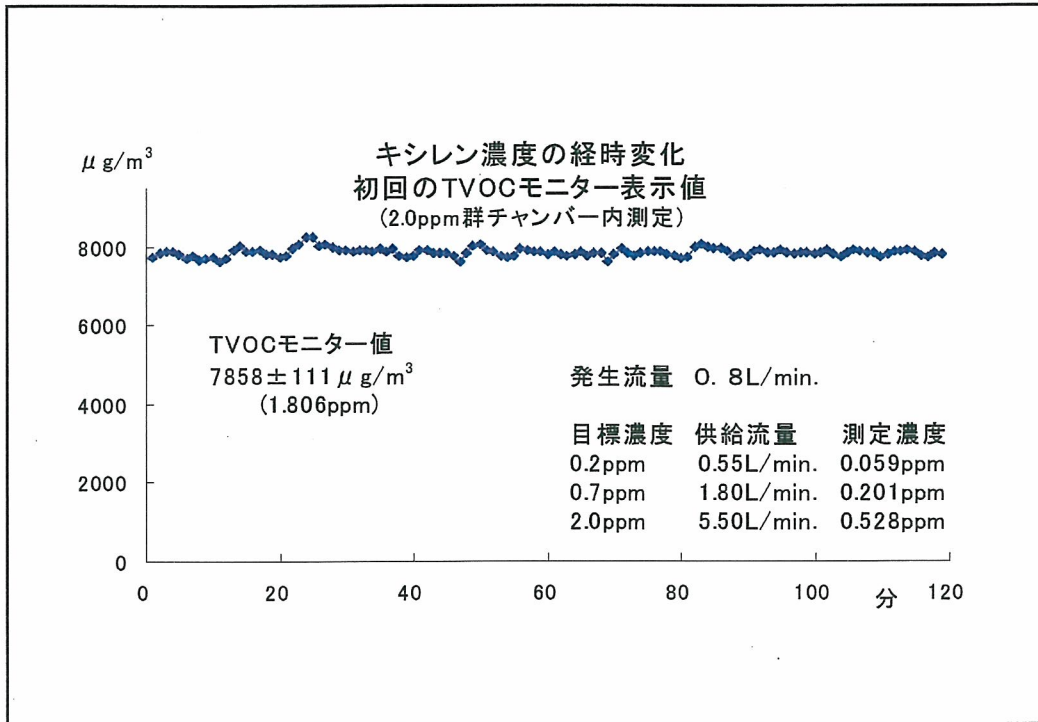
発生: ボンベ充填ガス(200ppm)

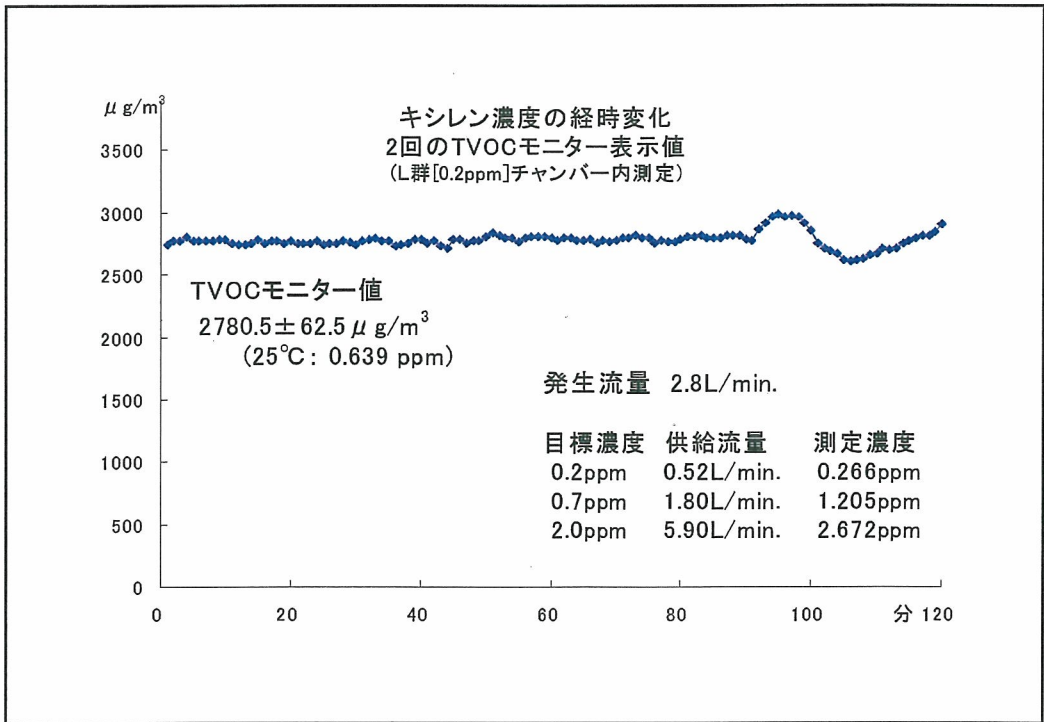
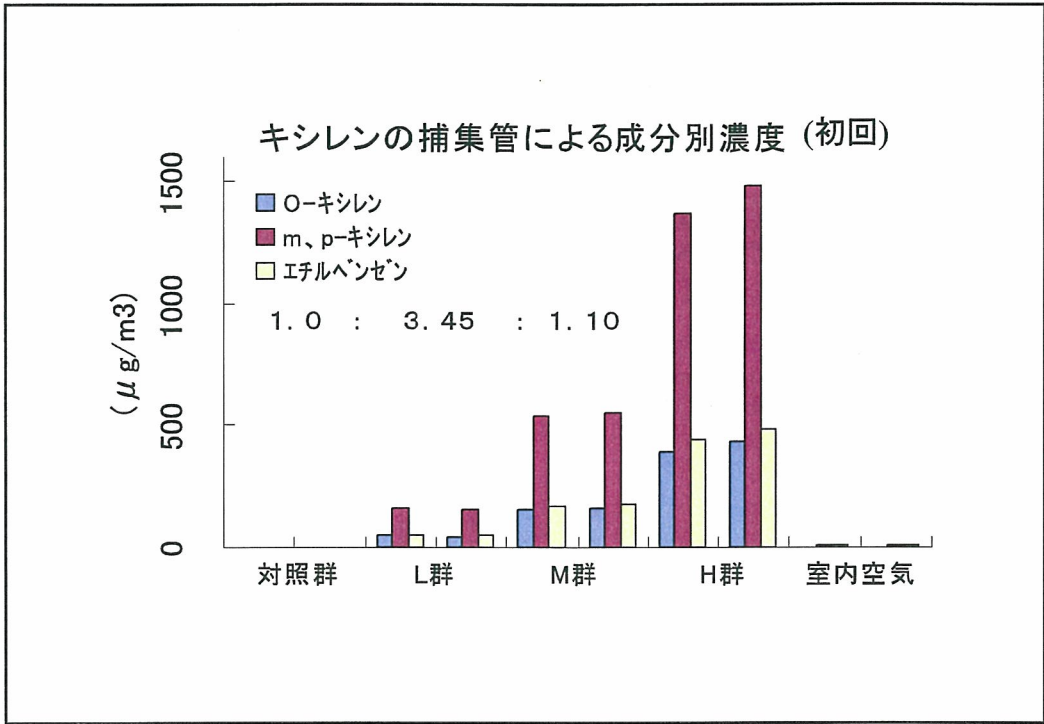
ボンベガスを購入し、濃度試験・暴露を行った。

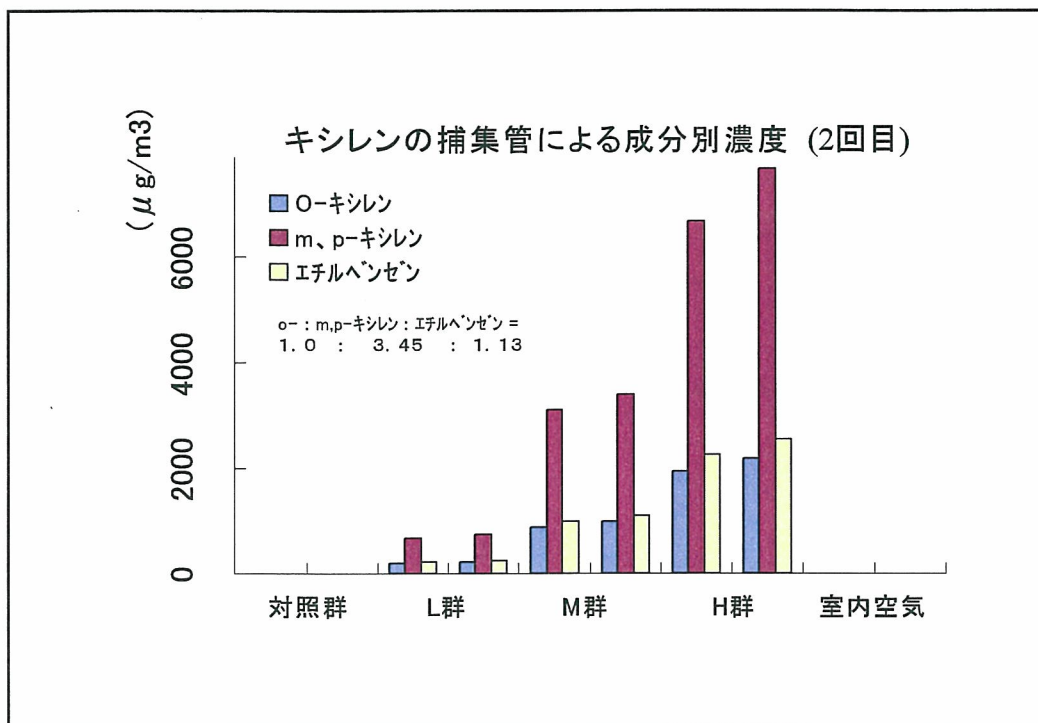
測定: 捕集管(活性炭)

TVOCモニター

- ・ 目標値 0.07、0.20、0.70 ppm
- ・ 測定値 0.063、0.183、0.663ppm







キシレン成分の分析結果

測定値の比率

o-キシレン : m、p-キシレン : エチルベンゼン

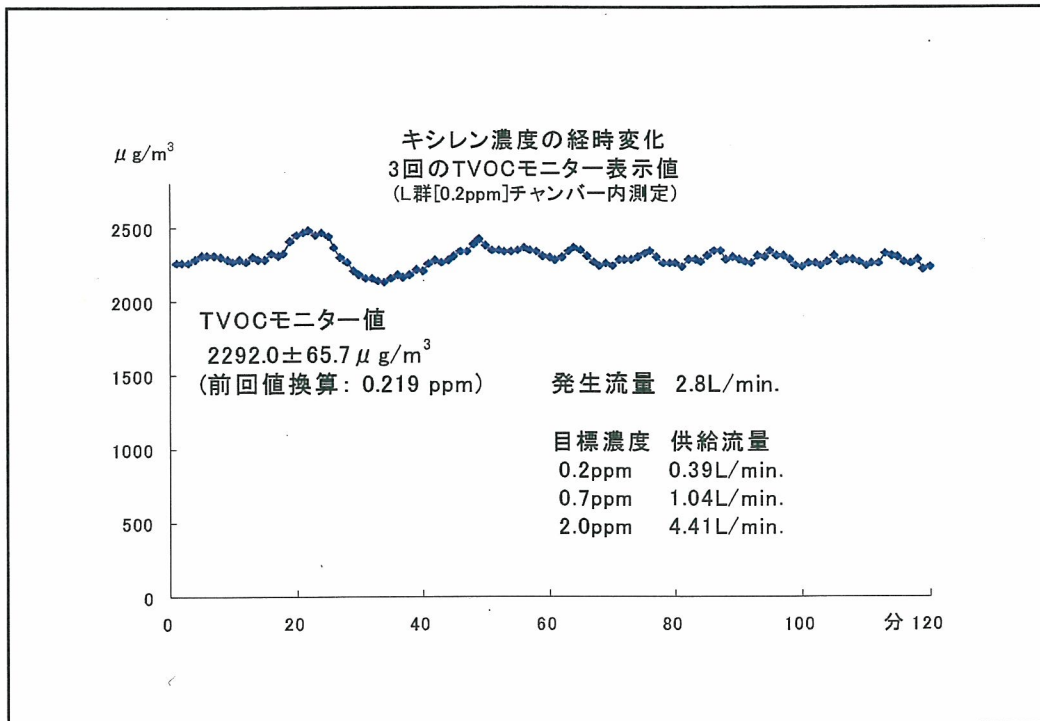
1.0 : 3.45 : 1.10~1.13

計算上の蒸気圧(15°C)比率

1.0 : 2.61 : 1.46

計算上の蒸気圧(25°C)比率

1.0 : 2.57 : 1.44



4. キシレン

発生: バブリングによる方法
ホルムアルデヒドと同様の方法

測定: 捕集管(活性炭)
TVOCモニター

(目標濃度0.20、 0.70、 2.00 ppm
測定濃度0.266、 1.205、 2.672ppm
3月内に暴露実験予定)

次年度の試験予定

1. エチルベンゼン
2. スチレン
3. テトラデカン
4. フタル酸

室内汚染化学物質と室内濃度指針値

1, ホルムアルデヒド	0.08 ppm (100 μ g/m ³)
2, アセトアルデヒド	0.03 ppm (48 μ g/m ³)
3, トルエン	0.07 ppm (260 μ g/m ³)
4, キシレン	0.20 ppm (870 μ g/m ³)
5, テトラデカン	0.04 ppm (330 μ g/m ³)
6, エチルベンゼン	0.88 ppm (3800 μ g/m ³)
7, スチレン	0.05 ppm (220 μ g/m ³)
8, クロロピリホス	0.07 ppb (1 μ g/m ³)
9, ダイアジノン	0.02 ppb (0.29 μ g/m ³)
10, フェノバルブ	3.8 ppb (33 μ g/m ³)
11, フタル酸ジ-n-ブチル	0.02 ppm (220 μ g/m ³)
12, フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	7.6 ppb (120 μ g/m ³)
13, パラジクロルベンゼン	0.04 ppm (240 μ g/m ³)

別添4

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

主任研究報告書

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

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

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に、より迅速、正確且つ安価な評価システムを構築することを目的とする。これにより、従来、人への外挿の際に採用してきた LC_{50} や安全係数(不確実係数)の概念が持つ不確実性を補い、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を目指す。シックハウス症候群に関しては原因物質として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。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、生殖発生及び肝臓・腎臓への影響に基づいて設定されている。しかし、従来の動物試験法での症候検出可能濃度とヒト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る。本研究では、室内空気汚染化学物質等の低濃度吸入暴露方法を確立するとともに、申請者らが先に開発した定量性に優れたトキシコゲノミクス手法をこれに適応し、肺及び肝臓での遺伝子発現量を解析することで、この隔たりを埋めることを検討する。

現在所有する暴露施設では非極性のベンゼン等の低濃度吸入暴露が比較的容易に可能となるが、更にこのシステムに小変更を加え、極性のホルマリンまで多くの異なった気化性化学物質にも対応が可能なものとする。室内汚染化学物質の濃度指針値を参考に、さらに理論的にも難しいとされている極低濃度暴露のための化学物質の精密な気中への拡散法(発生方法)、希釈などによる吸入チャンバー内の化学物質の濃度コントロール(濃度の安定)、及び吸入チャンバー内の濃度をモニターするための各方法の開発・検討を行うとともに、吸入毒性分野の精度・感度向上への貢献を目指す。

A. 研究目的

環境汚染物質、照射食品、医薬品及び既存化学物質等の安全性評価の一環として行われる動物を用いた各種安全性試験のうち、主に一般毒性試験(急性、亜急性及び慢性毒性試験)を行い、これらの対象物である照射食品及び化学物質の

安全性評価を行ってきた。従来労働環境や大気汚染等の観点から研究されてきた吸入毒性を、一般的な毒性試験に関わる課題として捉え、家具・建材や衣類、防虫剤や溶剤などの気散する化学物質の吸入毒性試験を行ってきた。現在所有する暴露施設は、安全性生物試験研究センター設

立当初の昭和53年から吸入毒性試験を導入するべく検討を行い、当初の小型(0.556m³)縦槽流チャンバーを用いたホルムアルデヒドの吸入発ガン性試験ではラットの鼻甲介部に扁平上皮癌を誘発することを明らかにし、このチャンバーに代わり被検動物数を増やすべく大型化(1.56m³)した縦槽流チャンバーを導入し防虫剤パラジクロールベンゼンの慢性吸入毒性試験、乱用薬物としてはトルエンの吸入暴露による生殖・発生に及ぼす影響、さらに雌雄を同時に暴露できる大型(3.0m³)横槽流チャンバーを導入し有機溶剤ベンゼンの慢性吸入毒性試験、特殊小型(30L)縦槽流チャンバーを用いては代替フロンガス等の急性吸入毒性を行い、目的にあわせて各チャンバーを逐次導入整備してきた。ガスの発生法開発では、ホルムアルデヒドの試験において加熱空気を用いたヒーティングチャンバー内へのスプレイガン方式、昇華性のパラジクロールベンゼンの試験ではフレーク状の検体を入れた容器そのものをモーターにより震動させこの容器に空気を通過させる方式、ベンゼンやトルエンの試験ではタンク内に検体を入れこれを暖めながらばっ気する方式で安定したガス濃度を得ることが可能となった。測定法としては、高濃度のホルムアルデヒドの試験においてはアセチルアセトンに吸着させ、その後発色剤を用いた分光光度計による方式、パラジクロールベンゼン、ベンゼンやトルエンではオートサンプラーに FID ガスクロマトグラフィーを組み合わせたシステムを導入し、短時間に測定することを可能とした。しかし、分析法開発が不能であった代替フロンガス等においては、ガスボンベ濃度を希釈倍率で除し濃度を推定した。以上の如く毒性部においては、長期間にわたり吸入試験を行ってきており、一連の吸入試験に必要な施設、機器などがそろっているため、本研究を始めるに当たり大規模な改修は不要であるが、暴露する検体に合わせた発生法や

測定法に関連する部分的なシステムの修正で対応が可能と考えている。

毒性部では、毒性試験に係る開発研究、基礎研究及び実際の試験を有機的に実施して来ており、その一環として、直近の安全行政に多大な影響を与える可能性の高いトキシコゲノミクスについては、厚生労働科学研究費(化学物質リスク研究事業)「化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究(H15-化学-002)」が採択され、H15 年度より鋭意、国内的・国際的に通用する高レベルのデータベースと解析システムの開発と、従来から行ってきた経気道吸入毒性試験の経験の融合により、本研究は非常に短い立ち上げ期間で、実質的なデータベース構築を開始できる状況にある。本研究では、これを利し、既知遺伝子情報が豊富なマウス(遺伝子改変マウスを含む)を主な標的として、質の高い吸入毒性メカニズム・インフォマティクスの早期構築を目指すものである。

B. 研究方法

本研究の目的のために選択された室内空気汚染化学物質等の気化性化学物質を対象に、3年間の研究期間に於いてマウスを用いた吸入暴露実験を行い、肺を主標的として、肝をその対照臓器として、発現プロファイルを可能な限り多数の遺伝子について採取する。これらのデータを逐次、電子ファイリングし、遺伝子プロファイルデータベースを構築する。既存知識と共に、インフォマティクスを構築し、既知機能クラスターを基にした予測システムを形成する。また、同時に、新規高感度指標情報やインフォマティクス情報から未知機能クラスターを抽出し、その機能を検討しリレーショナルデータベースに還元する事で、その機能と精度を継続的に向上させて行く。

吸入暴露実験:マウス(C57BL/6 12 週令 雄)を対

象とした化学物質の吸入暴露を実施する。初期設定値として、2 時間の短期暴露終了直後及び、2、6、22 時間後(開始後 2、4、8、24 時間後に相当)に検体採取する実験を主体として、反復暴露(7日間)及び長時間暴露(6時間毎日等)実験を追加しつつ実施する。投与用量は 4 段階を設定する(16 群構成、各群 3 匹、1 実験 48 匹規模、2 臓器=96 マイクロアレイ)。mRNA は、個体ごとに採取し、原則的に個体別に遺伝子発現プロファイルを得る。

化学物質の選択:シックハウス症の原因と考えられている気化性化学物質等の内、その代表的物質を優先的に選択する(シックハウス症候群の原因物質として室内濃度指針値が設定されているホルムアルデヒド等の13物質を優先)。更に、別途先行している経口暴露トキシコゲノミクスで検討され、肺の遺伝子情報が存在する化学物質で吸入暴露が可能且つ吸入毒性情報が必要なものを選択する。

暴露システムの開発と改良:現在は極性の弱いベンゼン等の動物暴露が可能であるが、極性のホルマリンまで数多くの異なる気化性化学物質も暴露が可能な方法で、短期間でこの吸入暴露システムに小変更を加え、さらに理論的にも難しいとされている極低用量暴露が行えるガス発生並びに目標濃度まで希釈する方法の検討と、暴露システムの改良を行う。

評価システムの構築:4 用量、4 時点からの遺伝子発現情報を絶対量化手法により数値表示し、測定全遺伝子から成る多層データ(いわゆる“mille-feuille”データ)を得る。ここでは、申請者らの開発した絶対量化手法により、発現値を線形表示(ゼロ点を含む)することが出来るため、遺伝子欠失マウスのデータが無理なく表示、解析可能となる長所がある。また、絶対値化と同時に標準化(絶対量化)が行われるため、複数の実験間での遺伝子発現値の直接比較が可能であるという大きな利点があ

る。それらについて、すでに開発済みの波面解析等を用いたアンスーパーバイズド(教師なし)クラスタリング解析を主体に生体反応のクラスター解析を行う。それに基づいたインフォマティクスの構築を進める。

C. 研究結果

平成17年度に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る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、更に検討を加え、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。

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、標準ガスボンベを用いる方法を採用することとした。

新たに標準ガスボ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ボンベを高千穂商事より購入し、これを3m³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で曝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. 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。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/m³)と設定している物質である。前年度の曝露試験において、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、マウスに曝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曝露試験を追加した。

前年度のバブリングで行ったと同じ濃度設定とした。すなわち、最低濃度を0.1 ppmとし中高用量を、0.3、1.0 ppm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3m³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、所定の濃度で曝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回の曝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群チャンバーにおいて測定したガスモニター値では平均濃度 0.696 ± 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。

3. トルエン

トルエンの曝露試験は、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、これを希釈し曝露を行う方法を採用することにより最も短期間で実験が可能となり、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(203ppm)をチャンバー内の総換気空気650L/分により希釈する方式で曝露を行った。

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($260 \mu\text{g}/\text{m}^3$)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^3 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0.24 L/分、0.2ppmでは0.69 L/分、0.7ppmでは2.86 L/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、測定端末にお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群チャンバーにおいて測定したモニター値では平均濃度 $2745.7 \pm 196.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。

4. キシレン

市井で使用されている有機溶剤であるキシレンは、ジメチルベンゼンの3種類の異性体オルト-、メタ-、パラ-及びエチルベンゼンの混合剤で、その混合比率はおよそ1:2:1:1である。これらの蒸気圧は、6.62、8.29、8.75、9.51mmHg(25°C)と異なっているが、発生条件を一定にすることにより恒に同一の割合で蒸散する。キシレンのボンベ入りの標準ガスを用いて曝露試験を行うには、これら4種類を蒸気圧に従った割合で混合したガスを用いて行うことが、室内における実際の状態に近いものと考え、ボンベ入りの標準ガス作成を依頼した。しかし、ボンベ圧を高めることができず、ボンベガス1本で5分間程度の曝露しかできない480Lという少ない内容量のため、ボンベ入りガスの使用を断念した。

キシレ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0.20ppm($870 \mu\text{g}/\text{m}^3$)から、これを最低濃度、中・高用量を0.7、2.0ppmと設定し、ホルムアルデヒドガスの曝露で使用したバブリング式の発生器を用いることとした。チャンバー内濃度の安定性はTVOCモニターを用い測定可能なレンジ内に収まる容量群チャンバーを選んで測定し、確定濃度は捕集管を用いた。発生流量あるいは供給流量の微調整を行うことで、目標値に近い濃度をチャンバー内で作ることが可能となりつつある。

D. 結論及び考察

本研究の遂行によって期待される成果は、人にお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、ホルムアルデヒド等によるシックハウス症候群の本態解明と予測体系の整備への糸口となることが期待される。即ち、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。尚、本吸入研究に於いては、国立衛研・毒性部において開発された遺伝子発現データの絶対量化手法(Percellome 手法)の活用により、有効にデータを蓄積する事が可能である。データ蓄積の開始と同時に、別途に進行中の経口摂取による物質との反応類似性の検討が可能となり、データ蓄積とメカニズム解析研究の進行に並行して、毒性メカニズム解析のインフォマティクス(アルゴリズム)が成熟し、毒性予測の精度がより向上する事が期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 雑誌

菅野純、北嶋聡、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の新しい試み、細胞工学、26,1: 71-77, 2007

2. 学会発表

なし

G. 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

