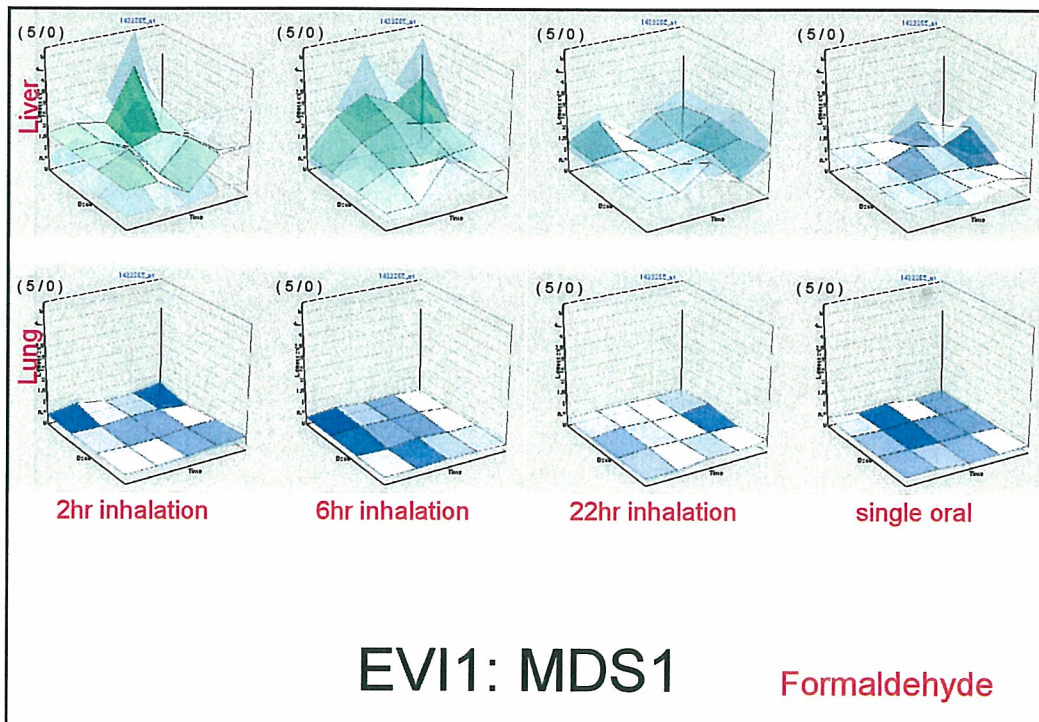
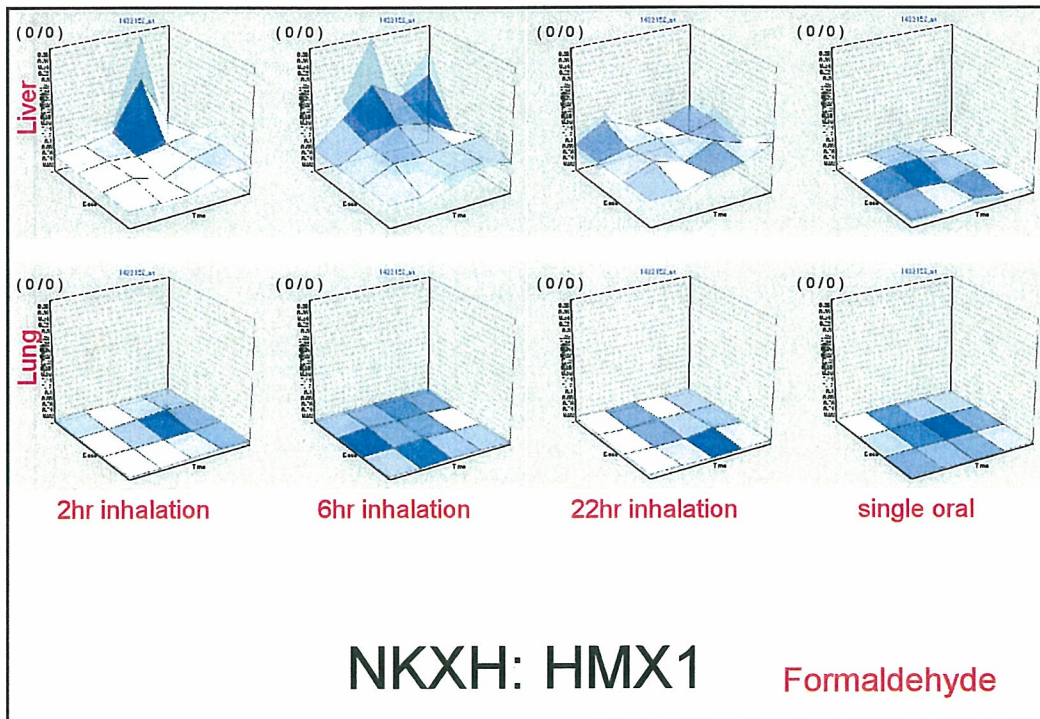
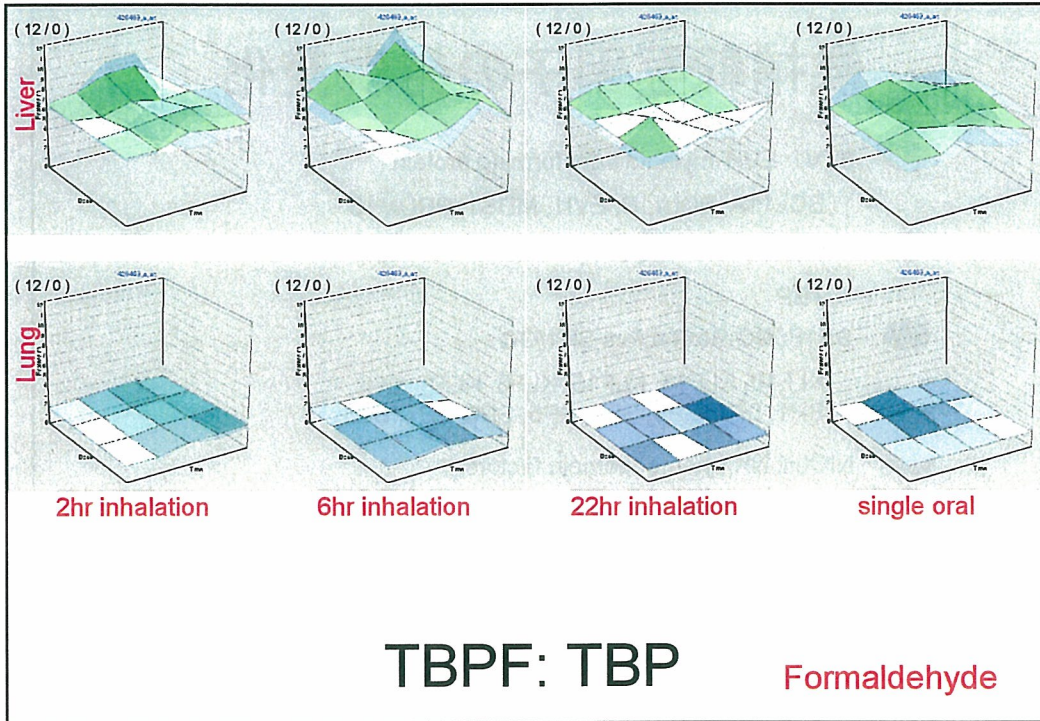


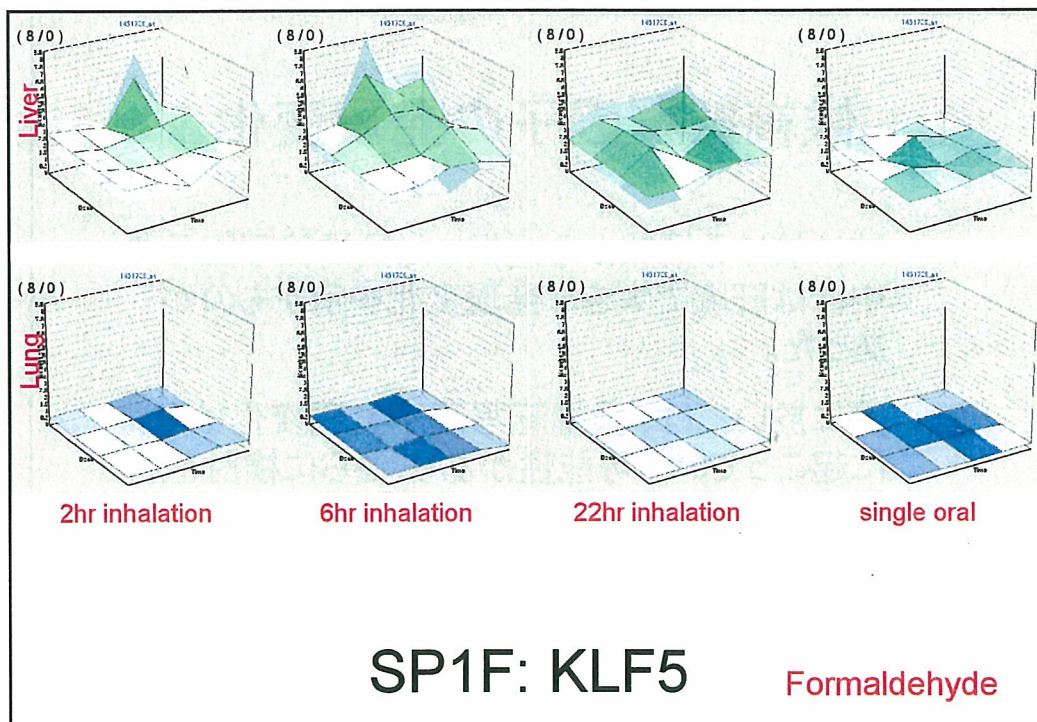
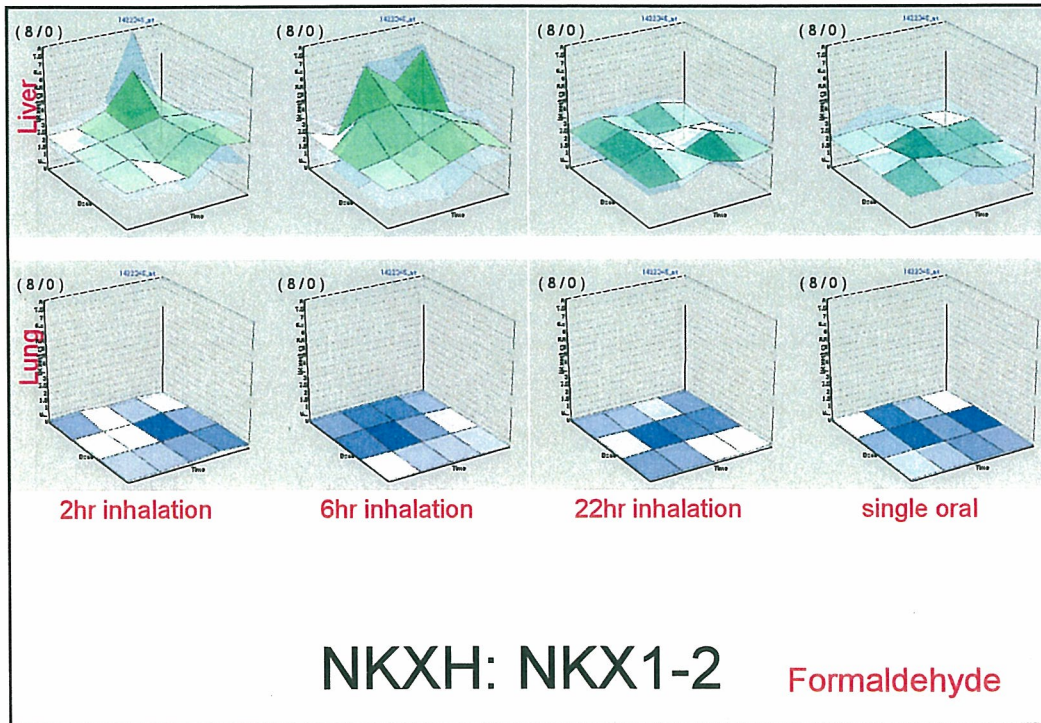
候補転写因子の発現変化

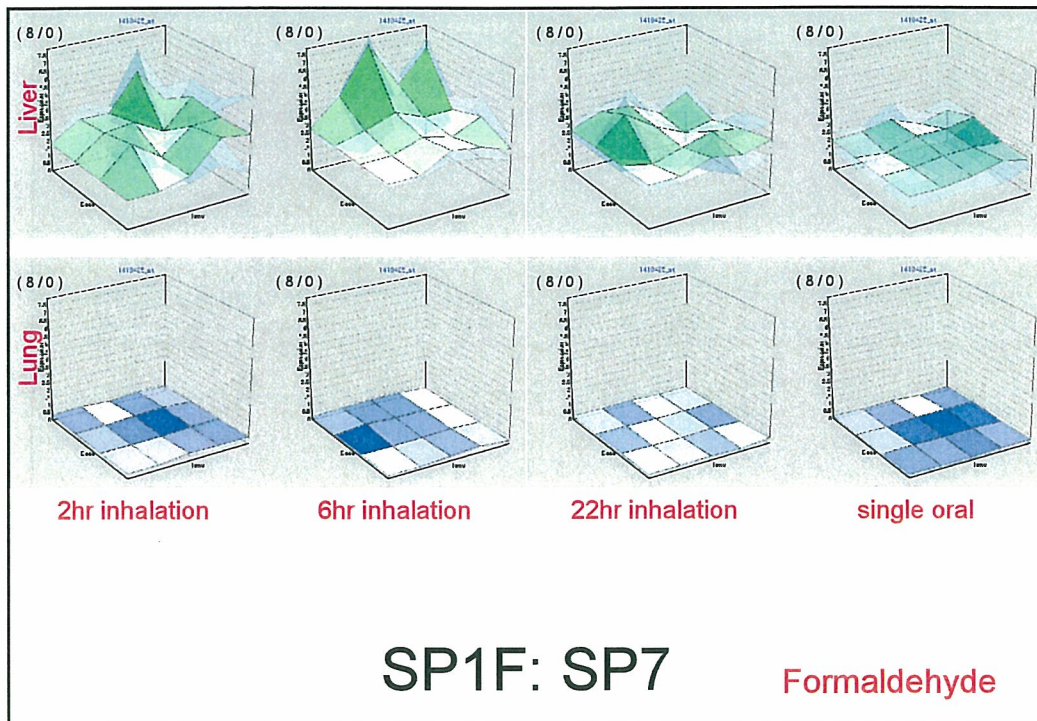
- ETV1: EVI1-myleoid transforming protein
 BCL11A, BCL11B, EVI1, MDS1, PRDM16
- TBPf: Tata-binding protein factor
 TBP
- SP1f: GC-Box factors SP1/GC
 KLF10, KLF13, KLF16, KLF5, KLF9
 SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP6, SP7, SP8
- NKXH: NKX homeodomain factors
 BAPX1, HMX1, HMX2, HMX3
 NKX1-2, NKX2-2, NKX2-3, NKX2-4, NKX2-5, NKX2-6, NKX2-9
 NKX3-1, NKX6-1, NKX6-2
 TITF1

ここに示した転写因子群の発現を検討した









候補転写因子の発現変化

1. 肺に於ける情報から選択した候補転写因子の中には肝臓で大きな発現変化を示すものがあった。
2. 肺に於いては、候補転写因子発現変化は早期に起こっている可能性があり、さらに検討を進める。

まとめ

- ホルマリン等について、2時間単回、6時間×7日間(労働暴露)、及び、22時間×7日間(生活環境暴露)に於ける、シックハウス症候群レベルの低濃度暴露による、肺及び肝の遺伝子発現変動を検出することが出来た。
- 暴露後のサンプリングのタイミング及び反復の有無により、遺伝子発現は異なった変動パターンを示した。ホルマリンについては、ガス発生法による差異が存在する可能性がある。
- 吸入暴露により肺よりも肝が、経口暴露により肝よりも肺が、敏感に反応する場合は観察された。
- 遺伝子情報から、現段階でもある程度の生物学的意義を考察し得ることが示された。

今後の展望

- 計画に従い、他のシックハウス症候群関連化合物の低濃度暴露実験を遂行する。
- 暴露の反復或いは、連続化による標的遺伝子の遷移を詳細に追跡し、慢性吸入毒性の分子メカニズムの推定を行う。
- 標的臓器と暴露経路の関係を考察する。
- 上記の為に、いわゆるGene Ontology(既知情報)との対比による解析を進めると共に、平行して実施中であるPercellome Projectにて開発済み或いは開発中の各種解析・インフォマティクス手法を適用する(教師なしクラスタリング、類似曲面抽出、曲面性情解析、等)。

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 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
試験管理部長、(兼)病理検査部長

研究要旨

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、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および700 ppbの吸入暴露実験を行った。その結果、吸入チャンバー内の飼育環境は良好であり、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検証できた。

A. 研究目的

化学物質の極低濃度暴露による健康影響を評価するための毒性評価手法の開発に際しては、極低濃度暴露実験を行い、新たに開発した毒性評価手法の極低濃度レベルでの有効性を実証する必要がある。このためには、化学物質を生活環境中の濃度に即した極低濃度で実験動物に経気道暴露するための技術開発が必要である。

平成17年度は、文献等の調査により、ホルムアルデヒドを研究対象として、ホルムアルデヒドの室内濃度指針値である80ppb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暴露方法を検討した。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の確認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。

本年度は、市販の標準ガスを利用した暴露方法

の実用性について検証するための吸入暴露実験を実施した。吸入暴露実験の被験物質は生活環境中から検出されるトルエンとし、暴露目標濃度は室内濃度指針値である70ppbを考慮して、70、200および700 ppbとした。

B. 研究方法

1 試験デザイン

1) トルエン標準ガスの供給量設定のための予備実験

本試験に先立って、トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量を設定するための予備実験を行った。まず、動物を収容しない吸入チャンバーを使用して、トルエン標準ガスの流量設定を行った。その後、吸入チャンバー内にマウス12匹を収容し、6時間と22時間の試行暴露を行った。また、チャンバー内の位置による濃度の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(吸入チャンバーの中央部と両端の飼育ケージの直上部)から同時に採気し、トルエン濃度を比較した。

2) 実験1

トルエンの標準ガスを新鮮空気で設定濃度に混合希釈した空気をマウス(SPF)12匹を収容した吸

入チャンバー内に送り込み、動物に全身暴露した。1日当りの暴露時間は6時間(解剖時間に合わせ、700 ppb群は午後0時から午後6時、200 ppb群は午後0時15分から午後6時15分、70 ppb群は午後0時30分から午後6時30分)とし、7日間の暴露を行った。

3) 実験2

トルエンの標準ガスを新鮮空気の設定濃度に混合希釈した空気をマウス9匹を収容した吸入チャンバー内に送り込み、動物に全身暴露した。1日当りの暴露時間は22時間(解剖時間に合わせ、700 ppb群は午後0時から翌日午前10時、200 ppb群は午後0時15分から翌日午前10時15分、70 ppb群は午後0時30分から翌日午前10時30分)とし、7日間の暴露を行った。

実験1および実験2とも、トルエンの暴露目標濃度は70、200および700 ppbの3段階とした。また、清浄空気による換気のみを行う対照群を設けた。

2 吸入暴露装置

1) 吸入暴露装置の概要

今回の検討に使用した吸入暴露装置のシステムを図1に、概観を図2に示した。吸入暴露装置は、①トルエンの発生装置に相当する標準ガスボンベ、②標準ガスボンベからのトルエンの流量を制御するための供給バルブ(フローコントロールバルブ)と流量計(図3)、③トルエンを新鮮空気と混合希釈するためのラインミキサー、④吸入チャンバー、⑤濃度測定のためサンプリング装置によって構成されている(図4、5)。今回の極低濃度暴露実験のための吸入暴露装置は、通常の暴露システムに①、②および⑤を追加、改造して使用した。この吸入暴露装置を $21 \pm 2^\circ\text{C}$ に温度制御した飼育室内に設置して実験を行った。

2) 吸入チャンバー

吸入チャンバーは8台を使用した。内4台は暴露前の動物の馴化飼育、すなわち動物を吸入チャンバー内の飼育環境に慣らすための1週間の予備飼育に使用した。他の4台を対照群、70 ppb群、200 ppb群および700 ppbに各1台ずつ使用した。吸入チャンバーは上部と下部が角錐状になった角型のチャンバーであり、観察窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。動物は吸入チャンバー角型部の同一平面上に設置した個別飼育ケージ内に収容した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、馴化期間は6連ケージ(1匹当りのスペースが95(W)×116(D)×120(H) mm)、暴露期間は5連ケージ(1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H) mm)を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

3) 吸入チャンバーの環境と動物の飼育条件

吸入チャンバーの環境と動物の飼育条件を下記のように設定した。

温度: $20 \sim 24^\circ\text{C}$

湿度: 30~70%

明暗サイクル: 12時間点灯(8:00~20:00) /
12時間消灯(20:00~8:00)

換気回数: 12 ± 1 回/時

外気(暴露装置を設置している飼育室の大気圧)に対する差圧: $0 \sim -15 \times 10 \text{ Pa}$

給餌: 暴露期間中を含み常時行う

(毎日の暴露終了時に新しい餌と交換)

給水: 暴露期間中を含み常時行う

吸入チャンバーの洗浄: 1日3回(午前1時、6時、午後7時)、60秒間/回、水洗

なお、換気回数は換気量から計算した。換気量は、1分間当たりの総排気量(新鮮空気の供給量 + トルエン標準ガスの供給量)を測定した。温度、湿度および換気回数は、1日当たりの平均値を計算し、この値を基に全期間の平均値と標準偏差を計算した

3 飼育環境中のトルエン濃度の確認

実験に先立って、下記の飼育環境の気中トルエン濃度を測定した。

- 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
- ③吸入チャンバー

トルエン濃度は、サンプリングシリンジで採取した空気をGC/MS (Agilent Technologies 社製 Agilent Technologies 5973N)に直接注入して測定した。

4 トルエンの発生方法

発生方法は市販の標準ガスを利用した。

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)13本を、標準ガスのメーカー(高千穂商事(株))に発注し、入手した。媒体は窒素を使用した。また、充填圧力は8.86 MPaであった。この標準ガスについてトルエンとの同一性と濃度を確認した。

トルエンとの同一性は、標準ガスの特性を、GC/MS (Agilent Technologies 社製 Agilent Technologies 5973N)を用いて測定することによって確認した。標準ガスの濃度は標準ガスのメーカー(高千穂商事(株))の分析データを入手した。

5 空気との混合および濃度制御の方法

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ことにより設定濃度のトルエンを吸入チャンバー内に送

り込んだ。トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量は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した。新鮮空気は、外気を空調機により温度と湿度調整を行った後、HEPA フィルターと活性炭フィルターにより濾過して使用した。

各濃度群のトルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値は、トルエン標準ガスの実測濃度と吸入チャンバーの換気量(新鮮空気の供給量 + トルエン標準ガスの供給量)の設定値からを下記のように計算した。

供給量の理論値(L/分) = 目標濃度(ppb) ÷ トルエン標準ガスの実測濃度(105 ppm × 1000) × 吸入チャンバーの換気量の設定値(212 L/分)

この理論値を基に、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。

6 吸入チャンバー内のトルエンの濃度測定

予備実験では、チャンバー内の位置による濃度の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。

実験1と実験2の対照群、70 ppb群、200 ppb群、700 ppb群について、吸入チャンバー内のトルエン濃度を固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定した。

(1) 被験物質の捕集方法

サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ 100H、柴田科学製)を用いて、捕集管(ORBOTM-91 Tube, Large, SUPELCO製)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.5 L/分とした。チャンバー内の位置による濃度の均一性を確認するための予備実験では、吸入チャンバーの中央部(1箇所)および両端(2箇所)の飼育ケージの直上部、計3箇所について、同時に6時間採気した。実験1と実験2では、捕集管の設置位置は吸入チャンバーの中央、

動物を収容したケージの上部とした。捕集時間は暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ、実験1は6時間、実験2は22時間とした。

(2) 捕集管の前処理及び分析条件

捕集管の活性炭(1層及び2層)を取り出し、各々、かつ色バイアルびん(柴田科学製)に入れ、二硫化炭素(和光純薬工業製 作業環境測定用)約2gを入れ、蓋をしてダイレクトミキサー(サーマル化学産業製)を用いて1時間振とうした。700 ppb群の活性炭1層は、検量線の所定の範囲に入るように段階希釈した。その後、バイアルビン(Agilent Technologies社製 2 mL用バイアルビン)に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ(ヒューレットパッカード社製 HP5890A)により測定した。

ガスクロマトグラフの分析条件は、カラムはUltra-1(0.2mmφ × 50m)、キャリアーガスはヘリウム、検出器はFIDを用い、カラム温度は80℃→(10℃/min)→150℃(1min)、注入口温度は200℃、検出器温度は200℃、試料注入量は1 μLとした。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物愛護の観点から日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

C. 研究結果

1 吸入チャンバー内の環境

吸入チャンバー内環境の実測結果について、温度を表1、湿度を表2、換気量と換気回数を表3に示した。

1) 温度

実験1: 設定温度20~24℃に対し、実験期間の実測温度は、対照群22.8~22.9℃(平均±標準偏差 22.8±0.3℃)、70 ppb群 23.0~23.1℃(23.0±0.4℃)、200 ppb群 22.8~22.9℃(22.8±0.2℃)、700 ppb群 23.0~23.1℃

(23.0±0.2℃)であった(表1-1)。

実験2: 設定温度20~24℃に対し、実験期間の実測温度は、対照群22.9~23.0℃(22.9±0.2℃)、70 ppb群23.0~23.1℃(23.0±0.4℃)、200 ppb群22.8~22.9℃(22.9±0.3℃)、700 ppb群22.9~23.0℃(22.9±0.2℃)であった(表1-2)。

実験1、実験2とも、実測温度は設定温度の範囲内で安定した値であった。暴露濃度による影響はみられなかった。また、実験間の差も認められなかった。

2) 湿度

実験1: 設定湿度30~70%に対し、実験期間の実測湿度は、対照群55.2~55.7%(平均±標準偏差 55.4±1.8%)、70 ppb群55.2~55.8%(55.5±2.1%)、200 ppb群54.4~54.9%(54.5±1.7%)、700 ppb群54.6~57.6%(55.2±2.7%)であった(表2-1)。

実験2: 実験期間の実測湿度は、対照群54.4~55.3%(平均±標準偏差54.8±1.7%)、70 ppb群54.4~55.3%(54.8±2.0%)、200 ppb群53.7~54.4%(54.0±2.0%)、700 ppb群53.5~54.5%(54.0±2.7%)であった(表2-2)。

実験1、実験2とも、実測湿度は設定の範囲内で安定した値であった。暴露濃度による影響はみられなかった。また、実験間の差も認められなかった。

3) 換気量

実験1: 吸入チャンバーの1分間当たりの設定換気量212 L(新鮮空気の供給量 + トルエン標準ガスの供給量)に対し、実験期間の実測換気量は、対照群211.3~214.2 L(平均±標準偏差212.8±1.8 L)、70 ppb群211.8~214.1 L(212.5±1.6 L)、200 ppb群211.5~213.6 L(212.4±1.7 L)、700 ppb群211.2~214.3 L(212.4±1.8 L)であった(表3-1)。

実験2: 設定換気量212 Lに対し、実験期間の実測換気量は、対照群212.1~214.2 L(212.8±1.8

L)、70 ppb群211.2~212.9 L(212.2±0.9 L)、200 ppb群211.1~213.2 L(212.5±1.8 L)、700 ppb群212.2~214.3 L(213.1±2.8 L)であった(表3-2)。

実験1、実験2とも、実測換気量は設定値である212 Lに近似した値であり、標準偏差も2%未満であった。暴露濃度による影響はみられなかった。また、実験1、実験2の実験間の差も認められなかった。

4) 換気回数

実験1:設定換気回数12±1回/時に対し、換気量から計算した吸入チャンバーの1時間当たりの換気回数は、対照群、70 ppb群、200 ppb群及び700 ppb群とも12.0~12.1回(平均±標準偏差12.0±0.1回)であった(表3-1)。

実験2:設定換気回数12±1回/時に対し、吸入チャンバーの1時間当たりの換気回数は、対照群は全期間に渡って12.0回(平均±標準偏差12.0±0.0回)、70 ppb群12.0~12.1回(12.0±0.1回)、200 ppb群11.9~12.1回(12.0±0.1回)、700 ppb群12.0~12.1回(12.0±0.2回)であった(表3-2)。

実験1、実験2とも、換気量から計算した換気回数は設定換気回数の範囲内であり、安定した値が得られた。暴露濃度による影響はみられなかった。また、実験1、実験2の実験間の差も認められなかった。

2 飼育環境中のトルエン濃度

実験に先立って飼育環境の気中トルエン濃度を測定した結果、①購入した動物を検疫のために予備飼育する検疫室は1.7~3.6 ppb、②吸入暴露装置を設置する飼育室は1.8~2.6 ppb、③吸入チャンバー内は1.1~3.2 ppbのトルエンが検出された。

3 トルエンの標準ガスの品質

1) トルエンとの同一性

標準ガスの特性を、GC/MSを用いて調べた結

果、トルエンに相当する分子イオンピーク及びフラグメントピークを示し、入手した標準ガスがトルエンであることを確認した(図6)(McLafferty 1994)。

2) 標準ガスの実測濃度

入手した13本の高圧標準ガス(発注濃度100 ppm)の実測濃度を表4に示した。2本が103 ppm、2本が104 ppm、9本が105 ppmであった。実験には、入手した高圧標準ガスボンベの中から、同一の濃度を示す標準ガスボンベが最も多かった105 ppmの標準ガスボンベを用いた。使用した標準ガスボンベの本数は、予備実験が1本、実験1(6時間/日、7日間暴露)が2本、実験2(22時間/日、7日間暴露)が5本であった。

4 トルエンの標準ガスのラインミキサーへの供給量

トルエン標準ガスの実測濃度と吸入チャンバーの換気量(新鮮空気の供給量+トルエン標準ガスの供給量)の設定値から計算したトルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値、および予備実験から得られた設定値を表5に示した。

トルエンの暴露目標濃度である70、200および700 ppbを達成するためのトルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値はそれぞれ0.141、0.404および14.1 L/分であったのに対し、予備実験から得られた設定値は0.169、0.46および1.54 L/分であった。理論値に対する実際の設定値の比は、それぞれ1.20、1.14および1.09であった。実験1、実験2とも、トルエン標準ガスの供給量は暴露期間期間を通して上記の設定値に調整し、チャンバー内濃度の実測値に基づく供給量の微調整は行わなかった。

5 吸入チャンバー内のトルエン濃度の均一性

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、700 ppbの吸入チャンバーについて吸入チャンバーの中央部(1箇所)および

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結果、中央部が662 ppb、両端が654 ppbと 658 ppbであり、各部位とも近似した濃度であった。

6 吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値

各濃度群の吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値と目標濃度に対する%を表6に示した。

実験1(表6-1): 目標トルエン濃度70 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、72~77 ppb(平均±標準偏差74±2 ppb)であり、目標濃度に対する%は102.9~110.0%(平均106.1%)であった。目標濃度200 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、192~207 ppb(196±6 ppb)であり、目標濃度に対する%は96.0~103.5%(98.1%)であった。目標濃度700 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、666~713 ppb(684±17 ppb)であり、目標濃度に対する%は95.1~101.9%(97.7%)であった。対照群の吸入チャンバーは、検出限界未満であった。

実験2(表6-2): 目標トルエン濃度70 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、73~82 ppb(平均±標準偏差76±3 ppb)であり、目標濃度に対する%は104.3~117.1%(平均108.0%)であった。目標濃度200 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、191~219 ppb(202±9 ppb)であり、目標濃度に対する%は95.5~109.5%(101.0%)であった。目標濃度700 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、670~724 ppb(695±19 ppb)であり、目標濃度に対する%は95.7~103.4%(99.3%)であった。対照群の吸入チャンバーからは、1~4 ppb(2±1 ppb)のトルエンが検出された。

7 トルエンの標準ガスボンベの使用状況

予備実験: 標準ガスボンベ1本を使用した。

実験1: 標準ガスボンベの使用状況を表7-1に示した。7日間の標準ガスボンベの使用本数は2本であった。1本目を5日目までの暴露に使用した。5日

目の残圧は0.8 MPaであった。2本目を6日以降に使用した。

実験2: 標準ガスボンベの使用状況を表7-2に示した。7日間の標準ガスボンベの使用本数は5本であった。ボンベの残圧(使用終了時のボンベの残圧の目安は0.4~0.6 MPa)と夜間の無人運転時間(16時間)を考慮して標準ガスボンベの交換を行った。

D. 考察

前年度の文献等の調査から、化学物質を生活環境中の濃度に即した極低濃度で実験動物に経気道暴露する吸入暴露手法として、市販の標準ガスを利用すると簡便な暴露法が開発できることが予測された。

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および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。以下に、①吸入チャンバー内の環境、②飼育環境中のトルエン濃度、③トルエンの標準ガスの品質、④空気との混合および濃度制御の方法、⑤吸入チャンバー内のトルエン濃度の測定方法について検討し、市販の標準ガスを利用した暴露方法の実用性について考察する。

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℃、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、群間およ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、および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。

6時間/日と22時間/日の暴露実験時に、新鮮空気のみを暴露した対照群のチャンバー内のトルエン濃度を測定した。チャンバー内に供給した新鮮空気は、外気をHEPAフィルターと活性炭フィルターにより濾過して使用した。最初に実施した6時間/日の暴露実験では、チャンバー内からトルエンは検出されなかったが、22時間/日の暴露実験では、暴露期間を通して1~4 ppbのトルエンが検出された。この結果から、HEPAフィルターと活性炭フィルターによる新鮮空気の濾過は、トルエンの除去に有効であるが、フィルターの有効期間には限界があることが示唆される。また、対照群についても被験物質の濃度を測定することの必要性が示された。

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、ポ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) 新鮮空気との混合および濃度制御の方法

新鮮空気との混合は標準ガスポ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)および両端(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、吸入チャンバー内でのトルエン濃度が均一であることが確認できた。この結果は、①本実験で使用した吸入チャンバーが被験物質を各動物に均一に暴露するために適した構造を有していること、および②今回用いた空気との混合方法によってトルエンと空気との混合が十分に行われたことを示している。

トルエン濃度70、200および700 ppbの吸入暴露のためのトルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量(流量)は、予備実験の結果から0.169、0.46および1.54 L/分に設定した。この設定値に従って、7日間(6時間/日と22時間/日)の暴露実験を実施した。6時間/日暴露実験では、目標トルエン濃度70 ppb、200 ppb、700 ppbに対し、吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値は72~77 ppb(平均±標準偏差74±2 ppb)、192~207 ppb(196±6 ppb)、

666～713 ppb(684±17 ppb)であり、目標濃度に対する%は102.9～110.0%(平均106.1%)、96.0～103.5%(98.1%)、95.1～101.9%(97.7%)であった。また、22時間/日暴露実験では、目標トルエン濃度70 ppb、200 ppb、700 ppbに対し、吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値は73～82 ppb(76±3 ppb)、191～219 ppb(202±9 ppb)、670～724 ppb(695±19 ppb)であり、目標濃度に対する%は104.3～117.1%(108.0%)、95.5～109.5%(101.0%)、95.7～103.4%(99.3%)であった。目標トルエン濃度70 ppbの吸入チャンバーで最終日に117.1%になった以外は、各濃度群も暴露期間を通して目標濃度に対して90%から110%の範囲で暴露濃度が維持できた。従って、本試験で用いた濃度制御の方法、すなわち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って、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。

トルエン標準ガスの供給量(流量)の精度を確認するために、「標準ガスの供給量(流量)の設定値から計算した標準ガスの使用量の値」を「標準ガスボンベの使用開始時の充填圧と使用終了時の残圧から計算した標準ガスの使用量の値」と比較した。6時間/日暴露実験および22時間/日暴露実験における暴露期間7日間の「標準ガスの供給量(流量)の設定値から計算した標準ガスの使用量の値」は5440 Lおよび19950 L(表7)であるのに対し、「標準ガスボンベの使用開始時の充填圧と使用終了時の残圧から計算した標準ガスの使用量の値」は5230 Lおよび19250 L(表8)であり、ほぼ一致した値であった。今回用いたフローコントロールバルブと流量計は通常の暴露実験に使用している市販品であるが、トルエン標準ガスの供給量を精度よく制御できたと考える。

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および700 ppbの設定値が0.169、0.46および1.54 L/分であったのに対し、理論値はそれぞれ0.141、0.404および14.1 L/分であった(表5)。目標暴露濃度70、200および700 ppb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、暴露時間にお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700 ppb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、今回の測定方法は、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。

E. 結論

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について検討した。その結果、以下の結論を得た。

1) 吸入チャンバー内の環境は、温度、湿度、換気

- 量および換気回数とも設定条件の範囲内であり、安定した飼育環境下での実験が可能であることを確認した。
- 2) 飼育環境中から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があると考えられる。
 - 3) トルエン標準ガスは、均一な濃度の市販品が入手できる。
 - 4) 新鮮空気との混合は標準ガス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た。その結果、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。
 - 5) 吸入チャンバー内のトルエン濃度は、各濃度群とも固相吸着－溶媒抽出法により測定できた。しかし、吸入濃度の精度を向上させるために、即時性のある測定法の開発が今後の課題となる。

参考文献

McLafferty FW. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. New York:John Wiley and Sons

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 1-1 吸入チャンバー内環境の測定結果:温度(実験1:6時間暴露)

単位:℃

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	70ppb 群	200ppb 群	700ppb 群
全期間				
平均值	22.8	23.0	22.8	23.0
標準偏差	0.3	0.4	0.2	0.2
日別平均值				
1 日目	22.9	23.1	22.9	23.1
2 日目	22.8	23.0	22.8	23.0
3 日目	22.8	23.0	22.8	23.0
4 日目	22.8	23.0	22.8	23.0
5 日目	22.8	23.0	22.8	23.0
6 日目	22.8	23.0	22.8	23.0
7 日目	22.8	23.0	22.8	23.0
8 日目*	22.8	23.0	22.8	23.0

*:最終暴露の翌日

表 1-2 吸入チャンバー内環境の測定結果:温度(実験2:22時間暴露)

単位:℃

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	70ppb 群	200ppb 群	700ppb 群
全期間				
平均值	22.9	23.0	22.9	22.9
標準偏差	0.2	0.4	0.3	0.2
日別平均值				
1 日目	23.0	23.1	22.9	23.0
2 日目	22.9	23.0	22.8	22.9
3 日目	22.9	23.1	22.8	22.9
4 日目	22.9	23.0	22.9	22.9
5 日目	22.9	23.0	22.9	22.9
6 日目	22.9	23.0	22.9	22.9
7 日目	22.9	23.0	22.9	22.9
8 日目	22.9	23.0	22.8	22.9

表 2-1 吸入チャンバー内環境の測定結果:湿度(実験1:6時間暴露)

単位:%

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	70ppb 群	200ppb 群	700ppb 群
全期間				
平均值	55.4	55.5	54.5	55.2
標準偏差	1.8	2.1	1.7	2.7
日別平均值				
1 日目	55.5	55.6	54.4	57.6
2 日目	55.7	55.8	54.5	56.2
3 日目	55.4	55.4	54.4	54.8
4 日目	55.5	55.7	54.5	54.8
5 日目	55.4	55.4	54.6	54.8
6 日目	55.4	55.5	54.5	54.7
7 日目	55.2	55.2	54.5	54.6
8 日目*	55.7	55.5	54.9	55.2

*:最終暴露の翌日

表 2-2 吸入チャンバー内環境の測定結果:湿度(実験2:22時間暴露)

単位:%

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	70ppb 群	200ppb 群	700ppb 群
全期間				
平均值	54.8	54.8	54.0	54.0
標準偏差	1.7	2.0	2.0	2.7
日別平均值				
1 日目	55.3	55.3	54.3	54.3
2 日目	55.3	55.2	54.4	54.5
3 日目	54.6	54.8	54.0	53.9
4 日目	54.7	54.8	54.1	53.8
5 日目	54.7	54.7	54.1	54.1
6 日目	54.4	54.4	53.7	53.5
7 日目	54.7	54.6	53.9	53.8
8 日目	55.0	54.8	54.2	54.2

表 3-1 吸入チャンバー内環境の測定結果:換気量と換気回数(実験1:6時間暴露)

単位:換気量 L/min 換気回数 回/時

チャンバー 群	CH-1		CH-2		CH-3		CH-4	
	対照群		70ppb 群		200ppb 群		700ppb 群	
	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数
全期間								
平均値	212.8	12.0	212.5	12.0	212.4	12.0	212.4	12.0
標準偏差	1.8	0.1	1.6	0.1	1.7	0.1	1.8	0.1
日別平均値								
1日目	211.3	12.0	211.9	12.0	211.5	12.0	211.2	12.0
2日目	212.5	12.0	211.8	12.0	212.0	12.0	211.6	12.0
3日目	213.1	12.1	212.2	12.0	212.4	12.0	211.8	12.0
4日目	213.2	12.1	212.3	12.0	212.6	12.0	212.3	12.0
5日目	212.5	12.0	212.2	12.0	212.3	12.0	212.2	12.0
6日目	213.1	12.1	213.2	12.1	212.6	12.0	213.2	12.1
7日目	212.8	12.0	212.9	12.1	212.2	12.0	212.9	12.1
8日目*	214.2	12.1	214.1	12.1	213.6	12.1	214.3	12.1

*:最終暴露の翌日

表 3-2 吸入チャンバー内環境の測定結果:換気量と換気回数(実験2:22時間暴露)

単位:換気量 L/min 換気回数 回/時

チャンバー 群	CH-1		CH-2		CH-3		CH-4	
	対照群		70ppb 群		200ppb 群		700ppb 群	
	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数
全期間								
平均値	212.4	12.0	212.2	12.0	212.5	12.0	213.1	12.1
標準偏差	0.7	0.0	0.9	0.1	1.8	0.1	2.8	0.2
日別平均値								
1日目	212.6	12.0	212.9	12.1	212.2	12.0	213.1	12.1
2日目	212.7	12.0	212.3	12.0	212.3	12.0	213.1	12.1
3日目	212.1	12.0	211.2	12.0	211.1	11.9	212.2	12.0
4日目	212.3	12.0	212.0	12.0	212.4	12.0	213.2	12.1
5日目	212.5	12.0	212.4	12.0	213.2	12.1	213.5	12.1
6日目	212.4	12.0	212.3	12.0	212.7	12.0	212.8	12.0
7日目	212.5	12.0	212.5	12.0	213.2	12.1	213.6	12.1
8日目	212.5	12.0	212.4	12.0	213.2	12.1	214.3	12.1

表 4 トルエン標準ガス(100 ppm)の濃度の実測値

ボンベ番号	実測濃度 (ppm)
CQC-335	105
CQC-336	105
CQC-337	104
CQC-338	105
CQC-343	103
CQC-344	105
CQC-345	105
CQC-346	105
CQC-347	105
CQC-348	103
CQC-349	105
CQC-350	105
CQC-351	104

充填圧:8.86 MPa

容器の種類:47 L(アルミ製)

媒体:窒素

表 5 吸入チャンバーの換気量(新鮮空気の供給量 +トルエン標準ガスの供給量)の設定値、およびトルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量(流量)の理論値と設定値

目標濃度	70 ppb	200 ppb	700 ppb
吸入チャンバーの換気量(新鮮空気の供給量)の設定値	212 L/分	212 L/分	212 L/分
トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値 *	0.141 L/分	0.404 L/分	1.41 L/分
トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の設定値(流量)	0.169 L/分	0.46 L/分	1.54 L/分
設定値/理論値	1.20	1.14	1.09

*: トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値(L/分) =

目標濃度(ppb) ÷ トルエン標準ガスの実測濃度(105 ppm × 1000) × 吸入チャンバーの換気量の設定値(212 L/分)

表 6-1 吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値(実験 1:6 時間暴露)

単位:ppb

	動物数*	対照群	70ppb群	200ppb群	700ppb群
1日目午後0時から午後6時	12匹	0	72(102.9)	192(96.0)	713(101.9)
2日目午後0時から午後6時	6匹	0	73(104.3)	195(97.5)	677(96.7)
3日目午後0時から午後6時	6匹	0	74(105.7)	194(97.0)	666(95.1)
4日目午後0時から午後6時	3匹	0	73(104.3)	192(96.0)	699(99.9)
5日目午後0時から午後6時	3匹	0	76(108.6)	207(103.5)	688(98.3)
6日目午後0時から午後6時	3匹	0	75(107.1)	192(96.0)	676(96.6)
7日目午後0時から午後6時	3匹	0	77(110.0)	201(100.5)	670(98.0)
平均濃度		0	74(106.1)	196(98.1)	684(97.7)
標準偏差		0	2	6	17

(目標濃度に対する%)

*:各吸入チャンバー内の動物の収容数(12匹で開始し、暴露開始日、暴露開始から1日後と3日後に各3匹を搬出した)。

表6-2 吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値(実験2:22時間暴露)

単位:ppb

	動物数*	対照群	70ppb群	200ppb群	700ppb群
1日目午後0時から2日目午前10時	9匹	4	75(107.1)	201(100.5)	670(95.7)
2日目午後0時から3日目午前10時	6匹	2	74(105.7)	203(101.5)	684(97.7)
3日目午後0時から4日目午前10時	6匹	2	73(104.3)	206(103.0)	689(98.4)
4日目午後0時から5日目午前10時	3匹	1	73(104.3)	191(95.5)	693(99.0)
5日目午後0時から6日目午前10時	3匹	2	76(108.6)	194(97.0)	688(98.3)
6日目午後0時から7日目午前10時	3匹	2	76(108.6)	200(100.0)	724(103.4)
7日目午後0時から8日目午前10時	3匹	1	82(117.1)	219(109.5)	717(102.4)
平均濃度		2	76(108.0)	202(101.0)	695(99.3)
標準偏差		1	3	9	19

(目標濃度に対する%)

*:各吸入チャンバー内の動物の収容数(9匹で開始し、暴露開始から1日後と3日後に各3匹を搬出した)。

表 7-1 標準ガスポンベの使用量状況およびポンベの圧量から計算した標準ガスの使用量
(実験1:6時間暴露)

ポンベ番号	使用期間	使用開始時の圧力 (標準ガスの充填量*1)	使用終了時の圧力 (標準ガスの残量*2)	標準ガスの 使用量*3
CQC338	1日目～5日目	8.86 MPa (4100 L)	0.8 MPa (370 L)	3730 L
CQC336	6日目～7日目	8.86 MPa (4100 L)	5.6 MPa (2600 L)	1500 L
計	7日間、42時間			5230 L

*1:標準ガスの充填量=ポンベの容量47 L×8.86(MPa)×9.87(気圧)=4100 L (1 MPa=9.87気圧)

*2:標準ガスの残量=ポンベの容量 47 L×圧力(MPa)×9.87(気圧)

*3:標準ガスの使用量=標準ガスの充填量 - 標準ガスの残量

表7-2 標準ガスポンベの使用量状況およびポンベの圧量から計算した標準ガスの使用量
(実験2:22時間暴露)

ポンベ番号	使用期間	使用開始時の圧力 (標準ガスの充填量*1)	使用終了時の圧力 (標準ガスの残量*2)	標準ガスの 使用量*3
CQC344	1日目～3日目	8.86 MPa (4100 L)	0.6 MPa (280 L)	3820 L
CQC345	2日目～4日目、 7日目	8.86 MPa (4100 L)	0.8 MPa (370 L)	3730 L
CQC346	3日目～4日目	8.86 MPa (4100 L)	0.4 MPa (190 L)	3900 L
CQC347	5日目、7日目	8.86 MPa (4100 L)	0.4 MPa (190 L)	3900 L
CQC349	6日目、7日目	8.86 MPa (4100 L)	0.4 MPa (190 L)	3900 L
計	7日間、154時間			19250 L

*1:標準ガスの充填量=ポンベの容量47 L×8.86(MPa)×9.87(気圧)=4100 L (1 MPa=9.87気圧)

*2:標準ガスの残量=ポンベの容量 47 L×圧力(MPa)×9.87(気圧)

*3:標準ガスの使用量=標準ガスの充填量 - 標準ガスの残量