

表8-1 標準ガスの供給量(流量)から計算した標準ガスの使用量
(実験1:6時間暴露)

目標濃度	70 ppb	200 ppb	700 ppb
トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量(流量)	0.169 L/分	0.46 L/分	1.54 L/分
70 ppb、200 ppb、700 ppb の流量の合計	2.159 L/分		
1日(6時間)の流量の合計	777 L/6時間		
7日間(42時間)の流量の合計	5440 L/7日間		

表8-2 標準ガスの供給量(流量)から計算した標準ガスの使用量
(実験2:22時間暴露)

目標濃度	70 ppb	200 ppb	700 ppb
トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量(流量)	0.169 L/分	0.46 L/分	1.54 L/分
70 ppb、200 ppb、700 ppb の流量の合計	2.159 L/分		
1日(22時間)の流量の合計	2850 L/22時間		
7日間(42時間)の流量の合計	19950 L/7日間		

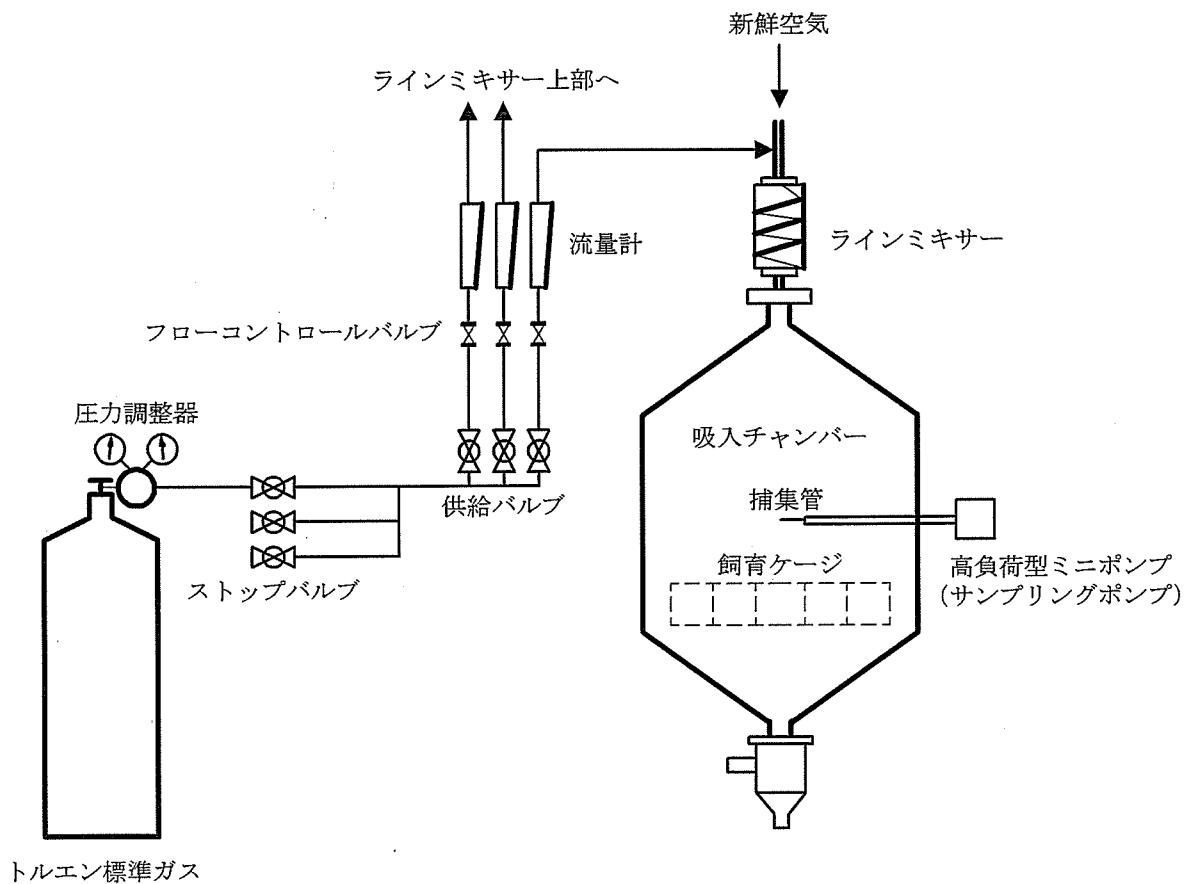


図1 吸入暴露装置のシステム

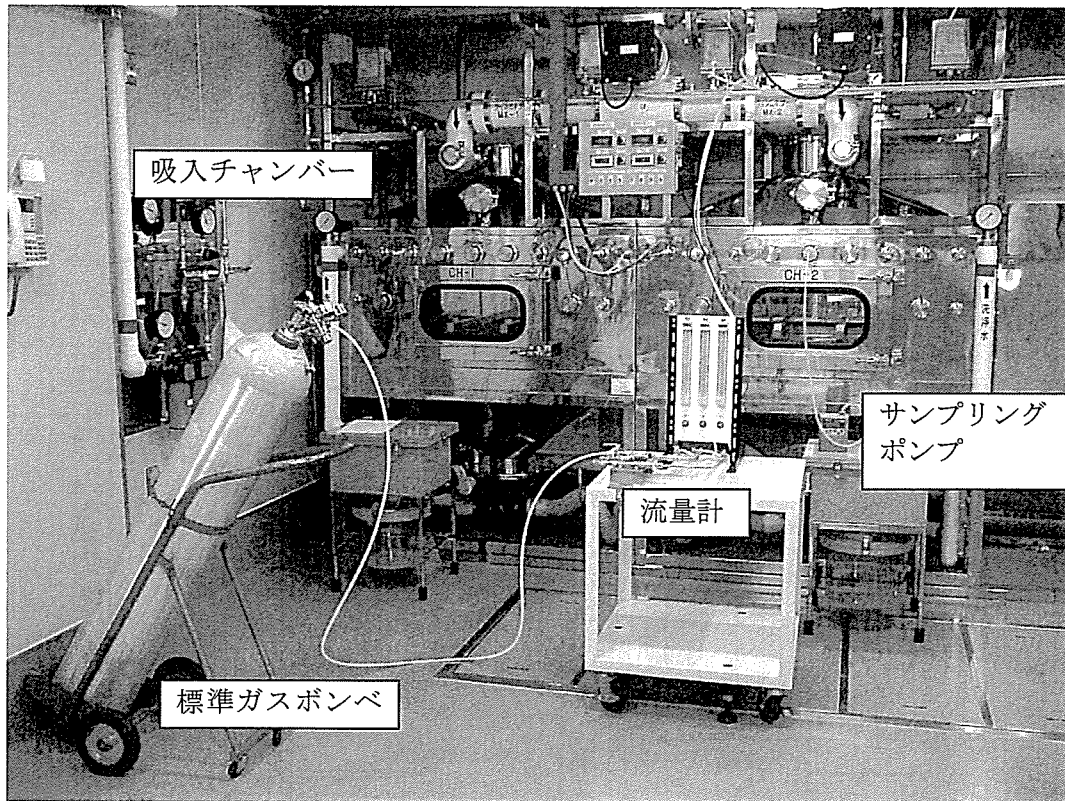


図 2 吸入暴露装置の概観

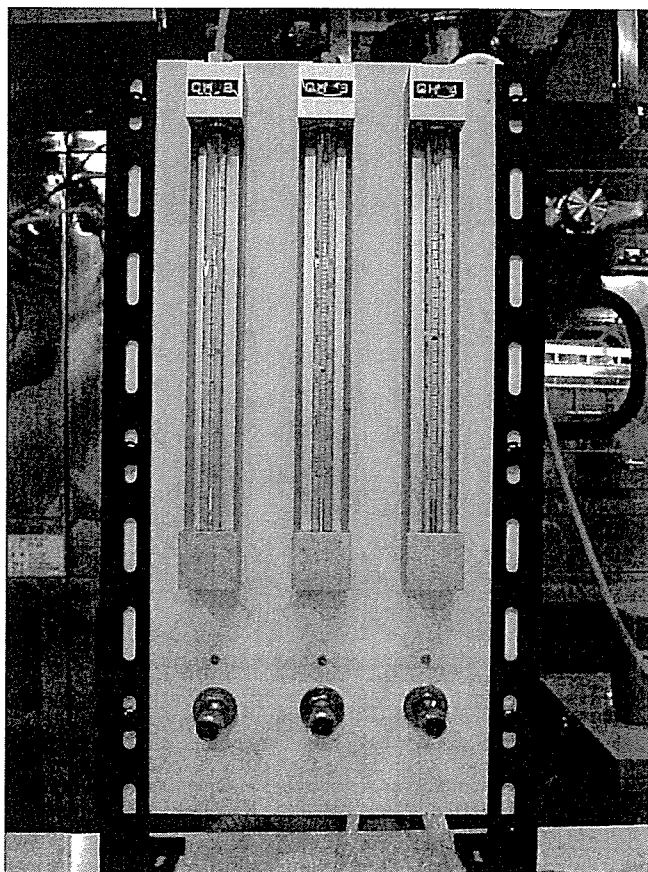


図 3 流量計

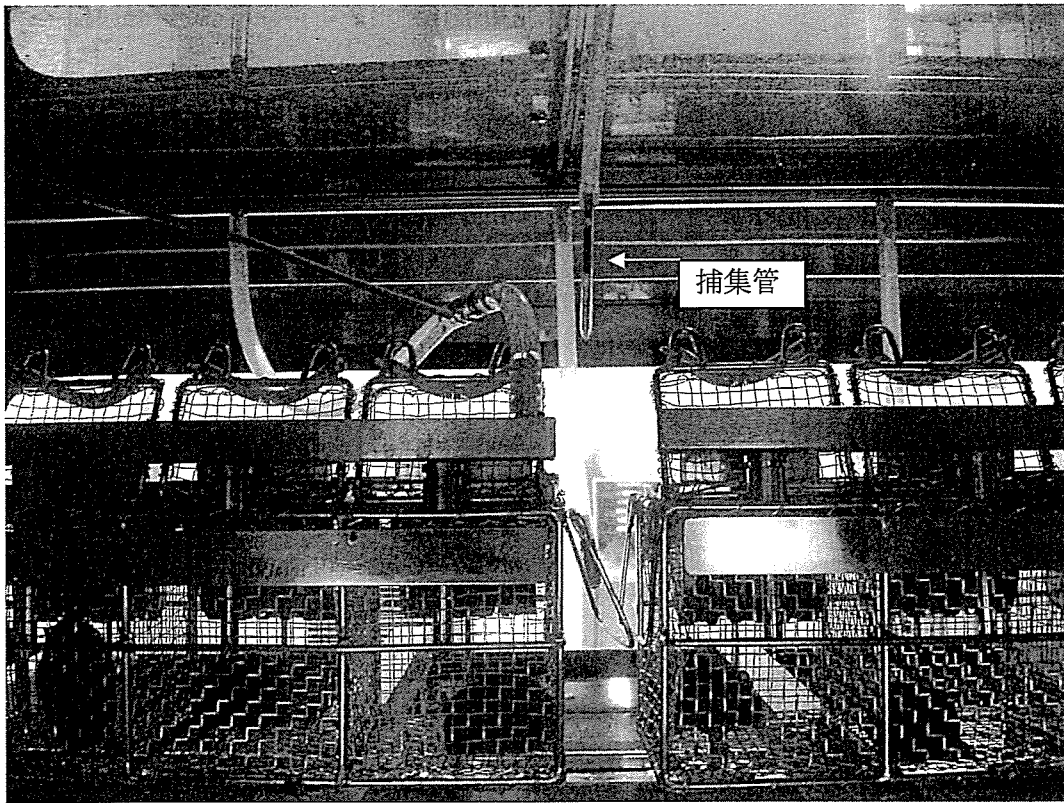


図4 チャンバー内の動物ケージと濃度測定用の捕集管

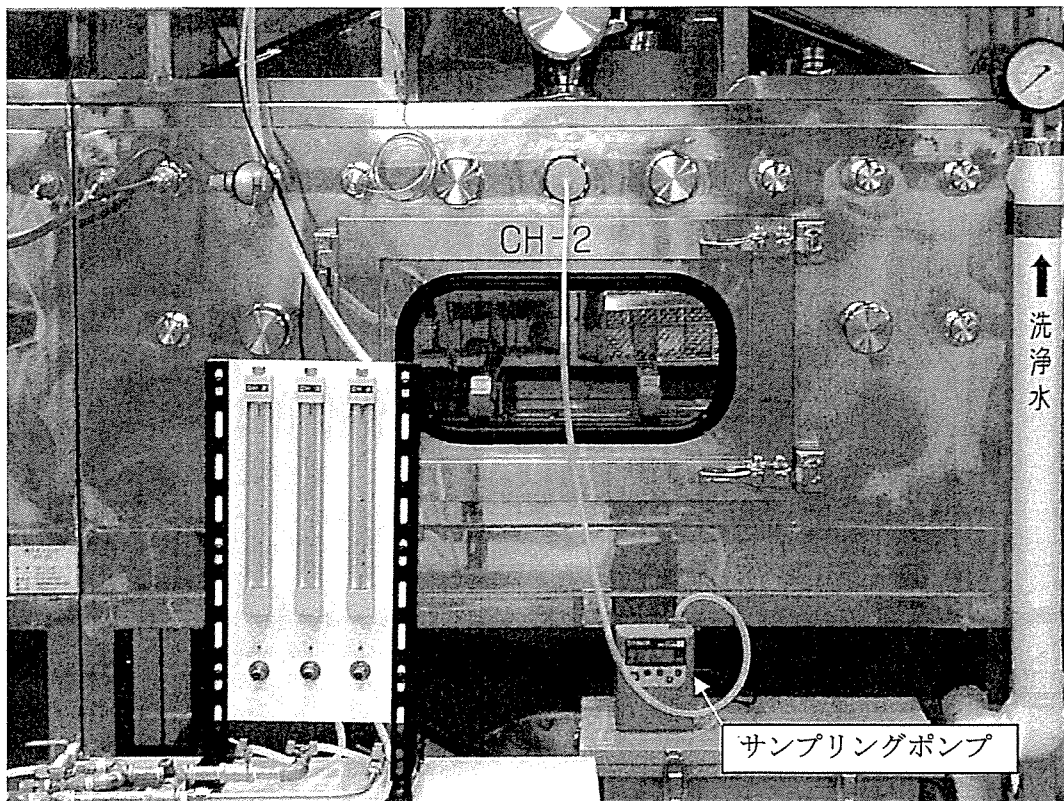


図5 濃度測定用のサンプリングポンプ

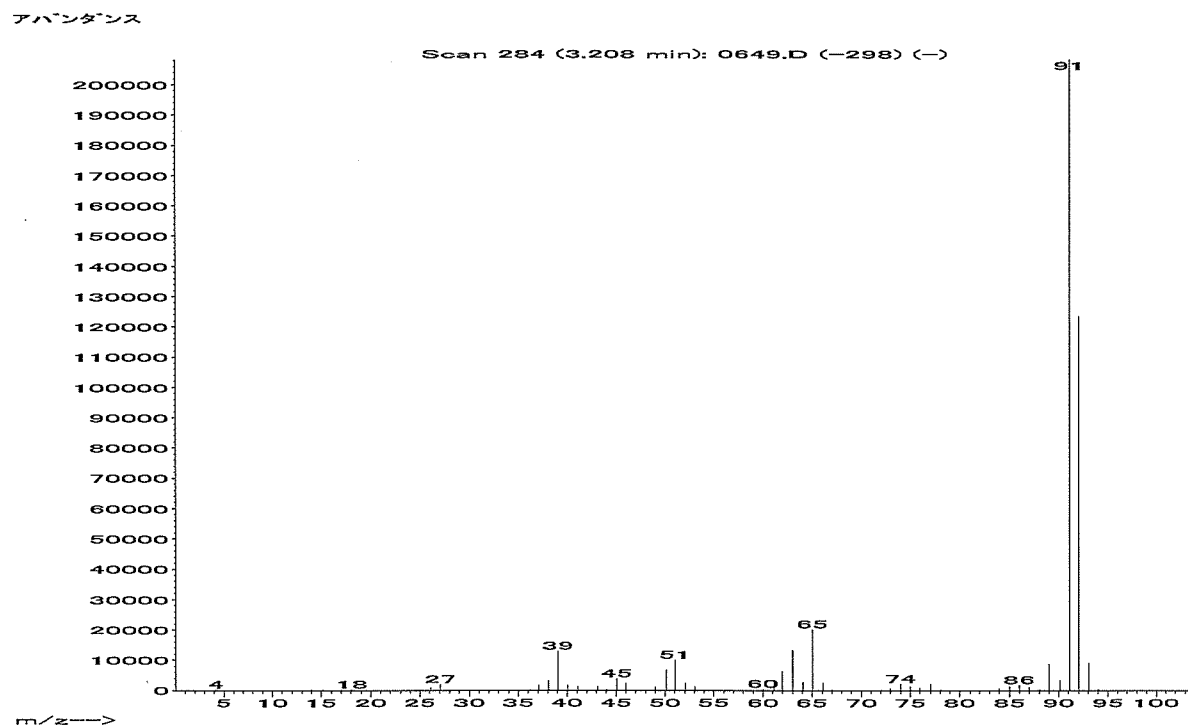


図 6 標準ガスの特性

研究目的

極低濃度暴露で生じる健康影響を検出するためのエンドポイントの有効性を実証

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を開発する

全体の研究計画

化学物質をppbオーダーで継続的に動物に経気道暴露する方法を開発する

生活環境中に存在する化学物質を対象にして数日から数週間にわたり動物に経気道暴露する

実現のために検討すべき課題

- 1)少量の化学物質を継続的に大気中に拡散させる方法(発生方法)
- 2)吸入チャンバー内の化学物質を一定濃度にコントロールする方法
(新鮮空気との混合、濃度制御)
- 3)吸入チャンバー内の化学物質の濃度を測定する方法(濃度モニター)

平成17年度(文献による検討)

化学物質の極低濃度暴露法の予測

1. 発生方法: 市販の標準ガスを利用すると簡便化できる
2. 新鮮空気との混合、濃度制御
 - 1)流量比による制御
 - 2)混合:ラインミキサー
混合槽を使用した段階希釈(希釈率を考慮)
 - 3)給気:活性炭による化学物質の除去
3. 濃度測定
濃度制御のためのモニター:直接測定
暴露精度の確認:捕集法による分析

平成18年度の計画

極低濃度暴露のトルエンを動物に吸入暴露

生体影響を遺伝子レベルで
解析するための試料を採取

トルエンの極低濃度暴露実験の概要

被験物質: 市販のトルエン標準ガス(ボンベに充填)

群構成: 3投与群 + 1対照群

暴露濃度: トルエンの室内濃度に関する指針値 70 ppb



700 ppb、200 ppb、70 ppb

暴露期間: 7日間(6時間と22時間/日)

使用動物: マウス、雄、各群、各解剖期当たり3匹
検疫5日間→同型の吸入チャンバーで
馴化飼育1週間→実験に使用

試料の採取: 肝臓、肺

試料の採取時期: 1日、3日及び7日目

(+ 6時間/日暴露は1回目の暴露

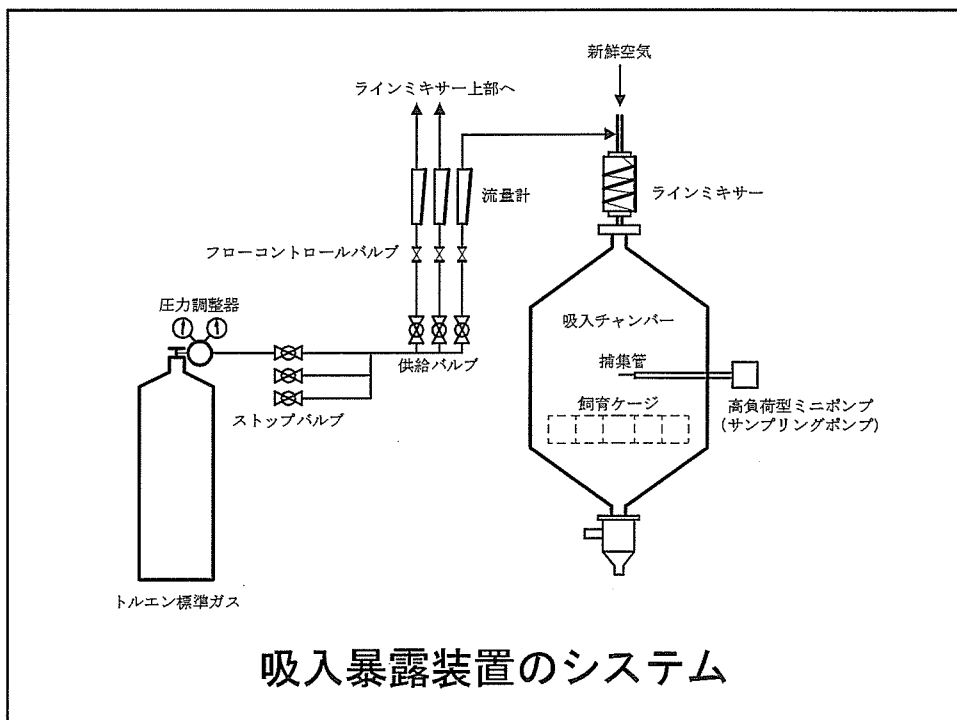
終了直後)

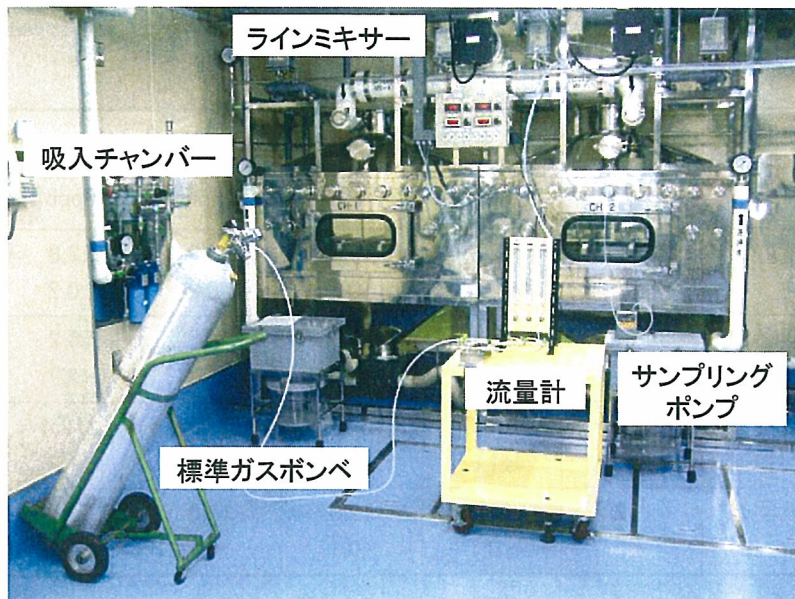
トルエンの暴露方法

1. 発生方法: 市販の高圧標準ガス(ボンベに充填)を利用(発注濃度100 ppm)
2. 吸入チャンバー: 全身暴露用、角錐型チャンバー(1060 L)
3. 新鮮空気との混合、濃度制御
 - 1) 新鮮空気: 外気をHEPAフィルターと活性炭で濾過
 - 2) 混合: ラインミキサー
 - 3) 濃度制御(トルエンの標準ガスと新鮮空気の流量比による制御)

トルエンの標準ガス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
4. 濃度測定

固相吸着-溶媒抽出法





吸入暴露装置の概観

飼育環境中のトルエン濃度

検疫室 (購入した動物の予備飼育)	1.7 ~ 3.6 ppb
飼育室 (吸入チャンバーを設置)	1.8 ~ 2.6 ppb
吸入チャンバー (使用前)	1.1 ~ 3.2 ppb

サンプリングシリンジで採気、GC/MSに直接注入

吸入チャンバー内の環境(6時間/日暴露)

	設定値	実測値			
		対照群	70ppb群	200ppb群	700ppb群
温度(°C)	20~24	22.8 ±0.3	23.0 ±0.4	22.8 ±0.2	22.8 ±0.2
湿度(%)	30~70	55.4 ±1.8	55.5 ±2.1	54.5 ±1.7	55.2 ±2.7
換気量 (L/分)	212	212.8 ±1.8	212.5 ±1.6	212.4 ±1.7	212.4 ±1.8
換気回数	12 ±1	12.0 ±0.1	12.0 ±0.1	12.0 ±0.1	12.0 ±0.1

7日間の平均±標準偏差

吸入チャンバー内の環境(22時間/日暴露)

	設定値	実測値			
		対照群	70ppb群	200ppb群	700ppb群
温度(°C)	20~24	22.9 ±0.2	23.0 ±0.4	22.9 ±0.3	22.9 ±0.2
湿度(%)	30~70	54.8 ±1.7	54.8 ±2.0	54.0 ±2.0	54.0 ±2.7
換気量 (L/分)	212	212.4 ±0.7	212.2 ±0.9	212.5 ±1.8	213.1 ±2.8
換気回数	12 ±1	12.0 ±0.0	12.0 ±0.1	12.0 ±0.1	12.0 ±0.2

7日間の平均±標準偏差



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

トルエンの標準ガス

製造メーカー：高千穂商事(株)

発注濃度：100 ppm（実測濃度：103～105 ppm）

媒体：窒素

充填圧力：8.86 Mpa

容器：47 L アルミ製ボンベ（充填推定量4100 L）

購入本数：13本

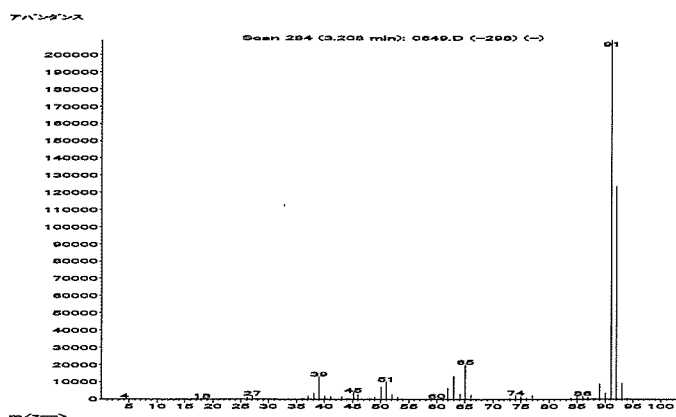
使用本数：予備実験 1本

6時間／日暴露実験 2本

22時間／日暴露実験 5本

トルエンの標準ガスの同一性

GC/MSIによる特性確認



トルエンに相当する分子イオンピークとフラグメントピーク



トルエンであることを確認

トルエンの標準ガスボンベの実測濃度

発注濃度: 100 ppm

実測濃度: 103 ppm 2本

104 ppm 2本

105 ppm 9本

(実験には105 ppm の標準ガスボンベを使用)



安定した濃度のトルエンの標準ガスの入手が可能

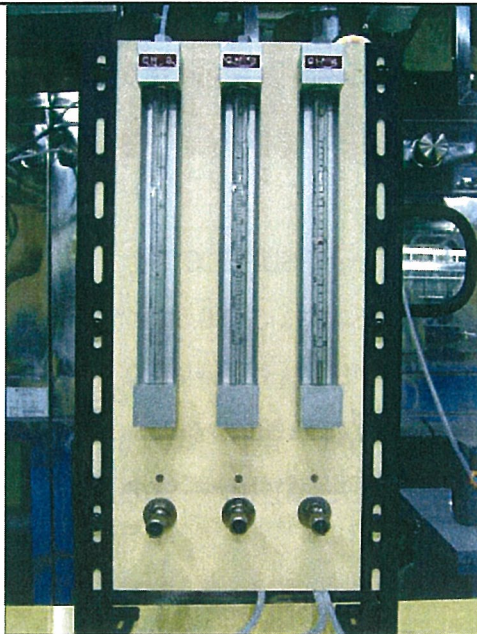
トルエン標準ガスのラインミキサーへの 供給量(流量)の理論値と設定値

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)



吸着は少ない



70 ppb群: 500 mL/分用
 200 ppb群: 1.2 L/分用
 700 ppb群: 3 L/分用

流量計

流量制御の精度(6時間/日暴露実験)

1) 標準ガスの供給量(流量)から計算した標準ガスの使用量

目標濃度	70 ppb	200 ppb	700 ppb
トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量(流量)	0.169 L/分	0.46 L/分	1.54 L/分
70 ppb、200 ppb、700 ppbの流量の合計		2.159 L/分	
1日(6時間)の流量の合計		777 L/6時間	
7日間(42時間)の流量の合計		5440 L/7日間	

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

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

1) 5440 L ≒ 2) 5230 L → 流量の精度は高い

吸入チャンバー内のトルエン濃度の測定方法

固相吸着－溶媒抽出法

1) 捕集

捕集管: ORBOTM-91 Tube, Large、SUPELCO社

サンプリングポンプ: 高負荷型ミニポンプ (0.5L/分)

捕集時間: 暴露全時間 (6時間/日暴露: 6時間)

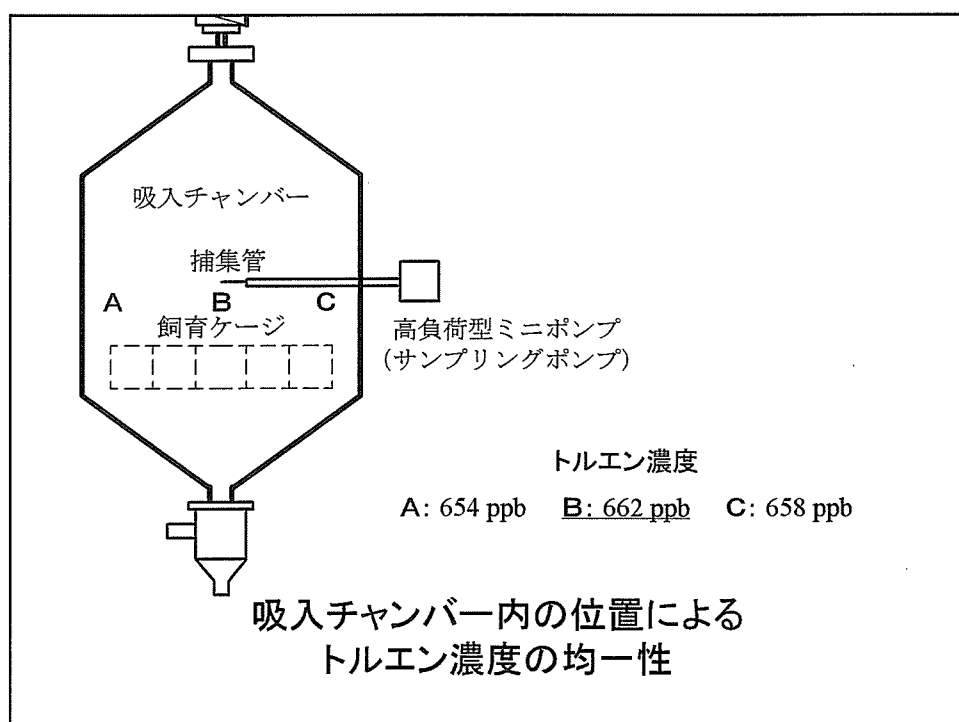
(22時間/日暴露: 22時間)

捕集位置: 吸入チャンバーの中央、動物ケージの上部

2) 分析

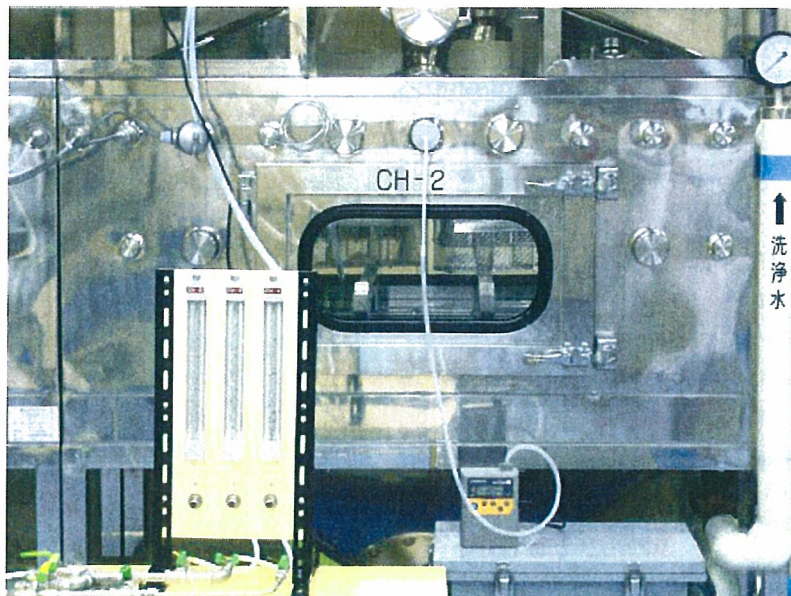
二硫化炭素で抽出

ガスクロマトグラフで分析

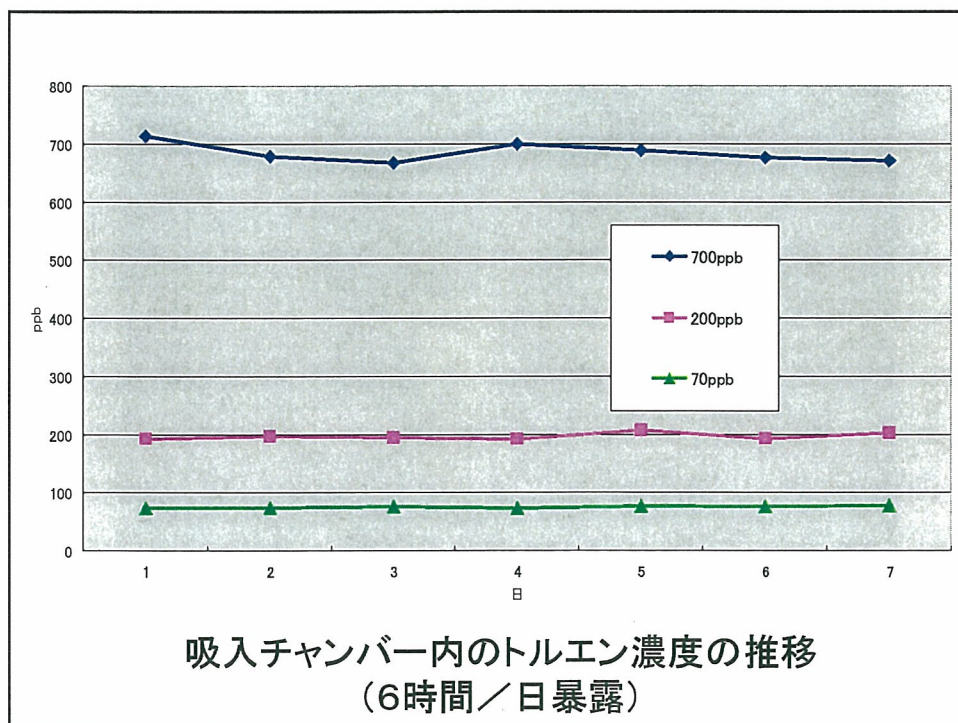




チャンバー内の動物ケージと濃度測定用の捕集管



濃度測定用のサンプリングポンプ



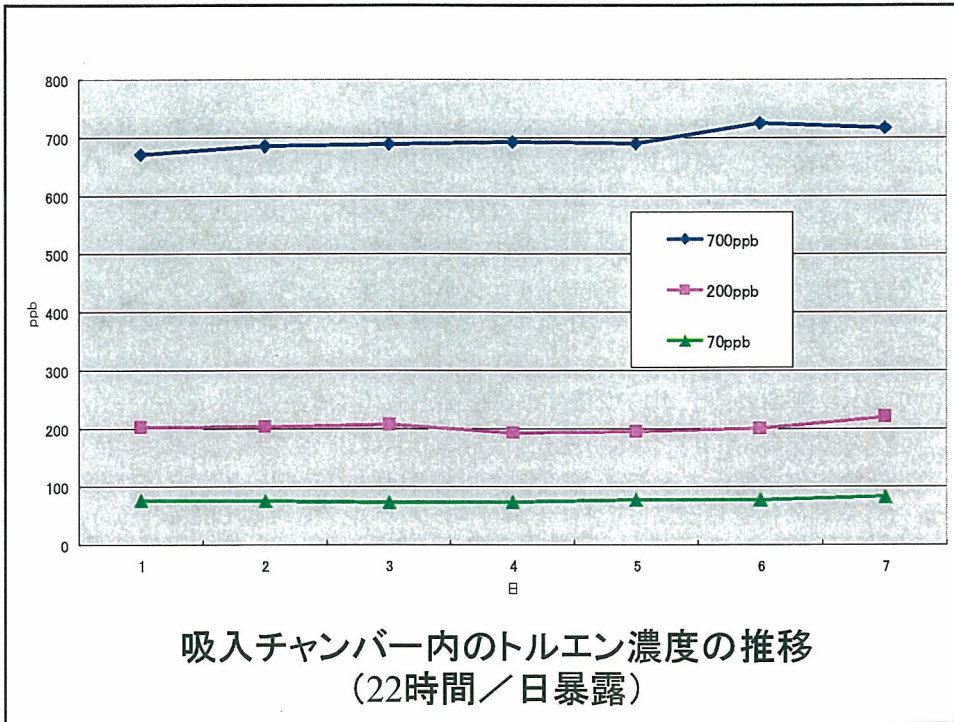
**吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値
(6時間/日暴露)**

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)。



**吸入チャンバー内のトルエン濃度の実測値
(22時間／日暴露)**

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		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)。

平成18年度の成果

トルエンを対象とし、目標暴露濃度70、200および700 ppbの吸入暴露実験を実施。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。

- 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。

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

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

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

本研究は、室内空気汚染化学物質の吸入暴露によるリスク評価の基盤整備として、網羅的な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(トキシゲノミクス)の構築を通して、日常生活にお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評価のために毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速且つ正確な吸入毒性評価システムを構築することを目的に実施した。その中で重要となるのは、より日常生活濃度レベルでの気化性化学物質の暴露である。昨年度、シックハウス症候群の原因物質と考えられているホルムアルデヒドの極低濃度吸入暴露方法を検討し、極低濃度(設定濃度 0.03 ppm)において6時間/日、7日間の安定な発生が可能となった。

本年度は、ヒトでのライフサイクルを考慮して、1日22時間暴露法を検討し、昨年度行ったホルムアルデヒドについては22時間/日、7日間暴露を行った。また、新規にアセトアルデヒドについては6時間/日及び22時間/日、7日間暴露法を検討した。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。その結果、ホルムアルデヒドについては、22時間/日、7日間の極低濃度での動物への暴露が可能となった。また、アセトアルデヒドについても、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0.03 ppmを含む0.1及び0.3 ppmの3濃度)での暴露が可能になった。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。

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及びアセトアルデヒド等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お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及びアセトアルデヒドの長時間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

実験として以下の4試験を行った。

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、7日間暴露)
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、7日間暴露)
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、7日間暴露)
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