

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 幸男

平成 20(2008)年 3 月

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 幸男

平成 20(2008)年 3 月

研究報告書目次

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、高度化に関する研究

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・改良

小川 幸男 11

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 135

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 141

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 187

IV. 研究成果の刊行物・別刷 189

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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安全性生物試験研究センター毒性部 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、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の生成・分析を実施する。

本研究の具体的な対象としてシックハウス症候群への対応を取り上げた。シックハウス症候群は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、生殖発生及び肝臓・腎臓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開始した。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）。実験動物はマウスに限定した。なお、実験施設改修工事のため、暴露試験及び生体中のヒスタミン測定の継続が不可能となったため、辻村班員は昨年度で分担研究を終了した。

今年度小川は、これまで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、室内濃度指針値を参考に、暴露目標値として、キシレン(0.20, 0.70, 2.0ppm)、スチレン(0.05, 0.15, 0.50ppm)、テトラデカン(0.04, 0.12, 0.40ppm)を設定し、暴露を実現させるために必要な暴露法改良を行った。捕集管による実測により、これらの実験に於いて、設定値とほぼ同様の濃度で実際の暴露が行われたことを確認し、マウス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。菅野は、国立医薬品食品衛生研究所毒性部に於いて開発された定量性に優れるトキシコゲノミクス手法(Percellome 法)を適用し、網羅的遺伝子発現解析を行った。酸化ストレス応答、アポトーシス、CYP などの遺伝子機能カテゴリーに分類された複数の遺伝子リストを検討した結果、キシレンにおいて最も顕著に、酸化ストレス反応に関わる遺伝子群の発現が上昇していることが示された。実際、2 時間暴露肺で酸化ストレス反応に関わる Nrf2, Junb, Fos, Hmox1, Gpx2,

Txnrd1, Gclc 等の発現が上昇していた。また、これらの反応は連日暴露により、減弱する傾向があった。スチレンに於いても酸化ストレス反応関連遺伝子の発現上昇が弱いながらも認められ、キシレンとは逆に連日暴露により、時間、容量依存的な応答が明瞭になることが示された。トルエンでは発現変化はほとんど認められなかった。長野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、スチレンとキシレン(混合キシレン)を対象に小川と同じ濃度でマウスに全身暴露する実験を実施した。スチレンは、市販の標準ガスを利用した暴露法を用い、目標濃度に対し平均濃度で94%から98%の吸入暴露を可能とした。キシレンは、加熱バブリング法を用い、目標濃度に対し平均濃度で100%から109%の吸入暴露を可能とした。暴露空気中のキシレンの異性体の割合は o-体の濃度が 19%、m-体と p-体を合わせた濃度が 81%であった。また、混合キシレンの不純であるエチルベンゼンの濃度は、キシレン濃度を 1 とした場合 0.20 から 0.23 であった。これらの結果を受け、両化学物質の 6 時間/日 x7 日間暴露、22 時間/日 x7 日間暴露を行い、肺、肝を採取し、菅野が解析を担当した。

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
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
副所長

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、生殖発生及び肝臓・腎臓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。

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

1 年目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臓を採取した。

2 年目は、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臓を採取した。

今年度は、キシレン、スチレン、及びテトラデカン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臓を採取した。以下に物質毎に記す。

1. キシレン

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(混合比率、およそ1:2:1:1)であり、それらの蒸気圧がわずかに異なっている。これを踏まえ、バブリング方式を利用する発生系を用い、これにより発生させたガスを希釈して暴露を行った。

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0.20 ppmから、低濃度を0.20 ppmとし、公比3で0.7、2.0 ppmと設定した。

濃度検知は、捕集管(活性炭カラム)を用いる方法で測定した。チャンバー内濃度の安定性はTVOCモニターを用いて測定した。

2. スチレン

スチレンは標準ガスボンベを利用する流路系を用い、これを横層流型チャンバー内へ換気送流させている清浄空気により希釈し暴露させた。

スチ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0.05ppm($220 \mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.05ppmとし、公比3で0.15、0.5ppmと設定した。

濃度検知は、捕集管(活性炭カラム)を用いる方法で測定した。チャンバー内濃度の安定性はTVOCモニターを用いて測定した。

3. テトラデカン

テトラデカンは蒸気圧が低く標準ガスの作成ができないため、バブリング方式により発生させたガスを希釈して暴露を行うこととした。

テトラデカ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0.04ppm($330 \mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.04ppmとし、公比3で0.12、0.4ppmと設定した。

テトラデカンは蒸気圧が低いため、バブリング方式を用いた場合、現在の発生器によっては発生させたガスのチャンバー内への供給量が不足し、目標濃度を達成できない。そのため、発生器から高用量群への配管を2本に増やすことで供給量を増加させることとし、発生器の改造を行った。

濃度検知は、捕集管(活性炭カラム)を用いる方法で測定した。チャンバー内濃度の安定性はTVOCモニターを用いて測定した。

(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

(1)、(3)の条件にて経気道暴露されたC57BL/6CrSlcマウスの肺と肝臓を採取して、当方が開発したPercellome手法(遺伝子発現値の絶対化手法:Kanno et al. BMC Genomics 29;7:64.)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。

(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

今年度は、スチレン、キシレンをマウスに6時間/日、22時間/日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臓を採取した。以下に

物質毎に記す。

1. スチレン

標準ガスを用いて設定濃度の暴露を行った。設定濃度は室内濃度指針値の50ppbを考慮して、0, 50, 150および500ppbの4段階とした。1日当りの暴露時間は6時間もしくは22時間とした。暴露濃度の測定は、捕集管にて吸入チャンバー内の空気を採取し、ガスクロマトグラフによって行った。

2. キシレン

キシレンは複数の異性体より成る混合物であることを考慮し、標準ガスを用いずに、加熱バブリング法による気化を行うこととした。設定濃度は室内濃度指針値である200ppbを考慮して0, 200, 700および2000ppbの4段階とした。1日当りの暴露時間は6時間もしくは22時間とした。暴露濃度の測定は、捕集管にて吸入チャンバー内の空気を採取し、ガスクロマトグラフによって行った。

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

本年度はキシレン、スチレン、テトラデカンについて、2時間暴露実験の暴露条件設定及び網羅的遺伝子発現プロファイルの取得を行った。各々の化学物質毎に詳細を記す。

1. キシレン

一般的に有機溶剤として使用されているキシレンは、ジメチルベンゼンの3種類の異性体o-(オルト)、m-(メタ)、p-(パラ)及びエチルベンゼンの混合剤であることから、バブリング式の発生器を用いることとした。暴露濃度は、室内汚染化学物質の室内濃度指針値である0.20 ppm ($870 \mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.20 ppmとし、中・高用量を0.7、2.0 ppmと設定した。

予備的な調整を経て、捕集管による濃度が0.20 ppm群は0.161 ppm、0.7 ppm群は0.569 ppm、2.0 ppm群は1.918 ppmである条件で暴露実験を実施した。このときの成分比はオルトを1としてメタ及びパラの混合は3.62、エチルベンゼンは1.18であった。

2. スチレン

ボンベ入りのスチレン標準ガスを希釈する方式で暴露を行った。暴露濃度は、室内汚染化学物質の室内濃度指針値である0.05ppm($220 \mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.05ppmとし、中濃度を0.15ppm、高濃度を0.5ppmと設定した。捕集管による測定値が、低濃度は0.035ppm、中濃度は0.128ppm、高濃度は0.738 ppmである条件で暴露実験を実施した。

3. テトラデカン

テトラデカンは蒸気圧が低く、既存の流路系では、発生させたガスのチャンバー内への供給量が不足し、高濃度の0.4ppmを達成できなかった。そこで、高用量群の配管を2本に増やすことでガスの供給量を増加させることとし、バブリング式発生器の改造を行った。暴露濃度は、室内汚染化学物質の室内濃度指針値である0.04ppm($330 \mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.04ppmとし、中濃度を0.12ppm、高濃度を0.4ppmと設定した。予備的な調整を経て、捕集管による測定値が、低濃度では0.040ppm、中濃度では0.12ppm、高濃度では0.378ppmである条件で暴露実験を実施した。

(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)

本年度はトルエン、キシレン、及びスチレンについてデータ解析を進めた。

C57BL/6CrSlc マウスに経気道暴露 (4 用量にて、2 時間単回暴露 (2、4、8、24 時間後)、6 時間/日×7 日間暴露 (6、24、150、168 時間後)、22 時間/日×7 日間暴露 (22、70、166、190 時間後)) させた際の肺と肝臓について、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。各々、指針値と暴露目標値は次の通りである。トルエン: 0.07ppm に対し、0.07、0.2、0.7ppm、キシレン: 0.20ppm に対し、0.2、0.7、2.0ppm、スチレン: 0.05ppm に対し、0.05、0.15、0.50ppm。

データ解析に当たり、酸化ストレス応答、oxidoreductase、CYP、Heat shock protein、Immune response、Apoptosis、solute carrier super family、Epigenetics、Nuclear Receptors、Matrix Metalloproteinases、の 10 種類の遺伝子機能カテゴリーに属する遺伝子群の発現変化を、当方が開発したデータ解析ソフトウェアの一つである multi-surface viewer (MSV) を用いて調べた。

その結果、キシレンによって酸化ストレス反応関連遺伝子を始め、GST 等多数の遺伝子の発現が上昇していることが分かった。さらには、その反応は連日暴露により弱くなる傾向があった。

そこで、その背景にエピジェネティック制御が関わっている可能性を検討するため、DNA methyltransferase、Histone deacetylase などのエピジェネティック制御に関わる遺伝子群の発現変化をキシレンのデータについて調べたが、特に変化は認められなかった。

一方、スチレンでも酸化ストレス反応関

連遺伝子の発現上昇が弱いながらも認められたが、キシレンとは逆に連日暴露の方が、時間、容量依存的な応答がはっきりしていることが分かった。

トルエンについては、暴露用量はスチレンと同等であるものの、ほとんど発現変化が認められなかった。ただし、経口投与で高用量の場合、トルエンは酸化ストレス反応を始め様々な遺伝子発現を上昇させることを確認しており、今回の結果が意味するところは、トルエンが指針値に近い用量の暴露では良く知られた生体反応経路に関与する遺伝子群の発現変化を引き起こさないことであると考えられた。

(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

本年度はスチレン、キシレンについて、6 時間/日 x 7 日間、22 時間/日 x 7 日間暴露実験の暴露条件設定及び暴露実験の実施と肝、肺の採取を行った。各々の化学物質毎に詳細を記す。

1. スチレン

吸入チャンバー内の環境について、温度、湿度、換気量、換気回数を実測し、それらがほぼ設定値通りであったことを確認した。次に、飼育環境中のスチレン濃度を実験に先立って測定したところ、スチレンが検出されることは無いことを確認した。吸入暴露装置設定に必要な予備試験を行った後、暴露実験を実施した。吸入チャンバー内のスチレン濃度のばらつき、日内変動を測定したが、ばらつき、日内変動共に少ないことを確認した。各濃度群の実測値を以下に記す。

6時間/日 x 7日間暴露：目標スチレン濃度 50 ppb の吸入チャンバーの実測濃度は、44~55 ppb (平均±標準偏差 47±5 ppb) で

あり、目標濃度に対する%は87.3~109.3% (平均94.0%)であった。目標濃度150 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、132~149 ppb (145±6 ppb)であり、目標濃度に対する%は87.8~99.6% (96.6%)であった。目標濃度500 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、469~516 ppb (488±18 ppb)であり、目標濃度に対する%は93.8~103.2% (97.6%)であった。対照群の吸入チャンバーはいずれの期間も検出限界未満であった。

22時間/日x7日間暴露: 目標スチレン濃度50 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、32~67 ppb (平均±標準偏差48±12 ppb)であり、目標濃度に対する%は64.7~134.0% (平均95.5%)であった。目標濃度150 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、132~162 ppb (141±10 ppb)であり、目標濃度に対する%は88.2~107.8% (93.7%)であった。目標濃度500 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、456~523 ppb (482±26 ppb)であり、目標濃度に対する%は91.2~104.6% (96.4%)であった。対照群の吸入チャンバーはいずれの期間も検出限界未満であった。

以上、6時間/日x7日間、22時間/日x7日間暴露実験ともに、設定に近い条件での暴露が実施されたことを確認した。

2. キシレン

吸入チャンバー内の環境について、温度、湿度、換気量、換気回数を実測し、それらがほぼ設定値通りであったことを確認した。次に、飼育環境中のキシレン濃度を実験に先立って測定したところ、キシレンが検出されることは無いことを確認した。実験に使用したキシレン試薬の組成を、ボンベ内で全量蒸発させるこ

とにより分析した結果、その組成は σ -キシレン25.6%、 m -キシレン40.9%、 p -キシレン18.1%、エチルベンゼン15.4%であった。また、キシレンを100%とした場合のキシレンの異性体の組成は、 σ -キシレン30.3%、 m -キシレン48.3%、 p -キシレン21.4%であった。これらを踏まえ、吸入暴露装置設定に必要な予備試験を行った後、暴露実験を実施した。吸入チャンバー内のキシレン濃度のばらつき、日内変動を測定したが、ばらつき、日内変動共に少ないことを確認した。各濃度群の実測値を以下に記す。

6時間/日x7日間暴露: 目標キシレン濃度200 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、198~216 ppb (平均±標準偏差207±6 ppb)であり、目標濃度に対する%は99.0~108.0% (平均103.5%)であった。目標濃度700 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、673~748 ppb (703±25 ppb)であり、目標濃度に対する%は96.1~106.9% (100.4%)であった。目標濃度2000 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、1808~2252 ppb (2009±161 ppb)であり、目標濃度に対する%は90.4~112.6% (100.5%)であった。対照群の吸入チャンバーはいずれの期間も検出限界未満であった。

異性体別の濃度について記す。200、700及び2000 ppb群の異性体別の濃度は、 m -体と p -体を合わせた濃度が159 ppb~173 ppb (平均±標準偏差167±5 ppb)、543ppb~603 ppb (567±20 ppb)及び1459 ppb~1813 ppb (1621±128 ppb)であった。また、 σ -体の濃度が39 ppb~43 ppb (平均±標準偏差40±1 ppb)、130ppb~145 ppb (136±5 ppb)及び349 ppb~439 ppb (388±33 ppb)であった。

異性体の比率について記す。総キシレ

ン濃度を100%とした時の m -体と p -体を合わせた濃度および σ -体の濃度の比率(平均値)は、200、700及び2000 ppb群とも m -体と p -体を合わせた濃度が80.7%、 σ -体の濃度が19.3%であり、一定の比率であった。また、各暴露日の比率も平均値に近い安定した値であった。

22時間/日x7日間暴露:目標キシレン濃度200 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、176~236 ppb(平均±標準偏差210±23 ppb)であり、目標濃度に対する%は88.0~1180%(平均105.0%)であった。目標濃度700 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、620~784 ppb(729±52 ppb)であり、目標濃度に対する%は88.5~112.0.8%(104.1%)であった。目標濃度2000 ppbの吸入チャンバーの実測濃度は、1851~2442 ppb(2180±206 ppb)であり、目標濃度に対する%は92.6~122.1%(109.0%)であった。対照群の吸入チャンバーはいずれの期間も検出限界未満であった。

異性体別の濃度について記す。200、700および2000 ppb群の異性体別の濃度は、 m -体と p -体を合わせた濃度が141 ppb~190 ppb(平均±標準偏差169±19 ppb)、499ppb~628 ppb(587±41 ppb)および1487 ppb~1971 ppb(1753±168 ppb)であった。また、 σ -体の濃度が35 ppb~46 ppb(平均±標準偏差41±4 ppb)、121 ppb~156 ppb(142±11 ppb)および364 ppb~471 ppb(427±38 ppb)であった。

異性体の比率について記す。総キシレン濃度を100%とした時の m -体と p -体を合わせた濃度および σ -体の濃度の比率(平均値)は、200と700群では m -体と p -体を合わせた濃度が80.5%、 σ -体の濃度が19.5%、2000 ppb群では m -体と p -体を合わせた濃度が80.4%、 σ -体の濃度が

19.6%であり、各濃度群ともほぼ一定の比率であった。また、各暴露日の比率も平均値に近い安定した値であった。

以上、6時間/日x7日間、22時間/日x7日間暴露実験ともに、設定に近い条件での暴露が実施されたことを確認した。

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

キシレン及びテトラデカンハバブリング法に、スチレンは標準ガスボンベによる暴露で、設定濃度に近い値で一定濃度を安定的に保持でき、動物に暴露することが可能であった。

動物室内の各物質の濃度は、キシレン 2.0 ± 0.8 ppb($8.19\pm 3.81\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)、スチレンは0.4ppb以下($1.9\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下)、テトラデカンは 0.8 ± 0.4 ppb($6.36\pm 3.17\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)と各物質で設定した暴露低濃度とは1桁以上低い値であった。キシレンの一般環境大気での最大濃度は $44.5\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (σ -, m -, p -の合計)(環境省、2003)であり、動物室内における濃度はそれを遙かに下回り、一般家庭の室内空気中で検出される平均濃度5ppb(国土交通省、2003)を若干下回っていた。動物室あるいはチャンバー内へ大気中から導入する換気空気は、ヘパフィルターにより微細な粉塵や細菌を、活性炭フィルターにより多くの化学物質を除去するよう設計されている。従って、外気からのキシレン等のガスの混入は無いかあるいは極めて少ないものと思われ、また動物室内では一般家庭のような室内の建材や設備からのガスの発生も少なく、対照群チャンバー及び動物室内の濃度は一般環境大気よりも相対的に低く保たれていた。

本実験においては、最低暴露濃度と対照

群チャンバー及び動物室内のこれらガス濃度の差が一桁以上あることから、遺伝子発現実験に対する影響は与えていないものと考えられる。

キシレン、スチレン及びテトラデカン、ホルムアルデヒドのように動物への吸着によると思われる濃度低下は現れなかった。キシレン及びテトラデカンで用いたバブリング法によっても安定した濃度のガスを発生供給が可能であったが、スチレンで用いた標準ガスの方がさらに安定したガス濃度を得ることができ、低濃度ガスを暴露するには最適な方法と思われた。

(環境省、2003)

環境省環境保健部環境安全課、「平成14年度地方公共団体等における有害大気汚染物質のモニタリング調査結果(表7)」(2003)

http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/mon_h14/hyo_07.html

(国土交通省、2003)

国土交通省住宅局住宅生産課「平成14年度室内空気中の化学物質の実態調査の結果について」(2003)

http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha03/07/071219_.html

(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

今年度、トルエン、キシレン、及びスチレンについて解析した結果、指針値レベルの暴露により酸化ストレス反応関連遺伝子群等の明確な発現変動を検出した。この結果は、網羅的遺伝子発現解析手法が、ヒトに於ける症候発現濃度を動物に暴露した場合にも有効な生理反応検出手法として活用できることを示すものである。これにより、これまで指摘されてきた、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隔たりがあるという課題を遺伝子発現解析手法が克服しうることが示された。

これを踏まえ、今後、網羅的遺伝子発現解析手法を活用した経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化をさらに推し進めていくことが重要である。

(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

今年度の検討により、スチレンは、市販の標準ガスを利用した暴露法により目標濃度に対し平均濃度で94%から98%の吸入暴露を達成し、この暴露方法が極低濃度暴露実験に利用できることがわかった。また、キシレンは、加熱バブリング法によりキシレンを気化させる方法により目標濃度に対し平均濃度で100%から109%の吸入暴露を達成し、この暴露方法が極低濃度暴露実験に利用できることがわかった。以下、化合物毎に得られた結論を記す。

1. スチレン

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にあり、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) 飼育環境中からはスチレンが検出されなかった。従って、スチレンに関しては、バックグラウンドとしての暴露は考慮する必要がないと考えられる。

3) スチレン標準ガスは、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%以内の誤差範囲でスチレンの極低濃度暴露ができることを確認した。ただし、濃度制御の操作（標準ガスのラインミキサーへの供給量（流量）の調整）によっては、濃度のばらつきが大きくなることが示唆された。

5) 吸入チャンバー内のスチレン濃度は、各濃度群とも固相吸着-溶媒抽出法により測定可能であった。

2. キシレン

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にあり、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) 飼育環境中からはキシレンが検出されなかった。従って、キシレンに関しては、バックグラウンドとしての暴露は考慮する必要がないと考えられる。

3) 試薬の組成は o-キシレン 25.6%、m-キシレン 40.9%、p-キシレン 18.1%、エチルベンゼン 15.4%であった。また、キシレンを 100%とした場合のキシレンの異性体の組成は、o-キシレン 30.3%、m-キシレン 48.3%、p-キシレン 21.4%であった。

4) 本研究で用いた加熱バブリング法により、安定した濃度のキシレン蒸気が得られると考えられた。

5) 新鮮空気との混合は発生蒸気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%以内の誤差範囲でキシレンの極低濃度暴露ができることを確認した。

6) 暴露空気中のキシレンの異性体の割合は o-体の濃度が 19%、m-体と p-体を合わせた濃度が 81%であった。また、混合キシレンの不純であるエチルベンゼンの濃度は、キシレン濃度を 1 とした場合 0.20 から 0.23 であった。

7) 吸入チャンバー内のキシレン濃度は、各濃度群とも固相吸着-溶媒抽出法により測定可能であった。

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、トルエン、キシレン、スチレンについて、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ことは、遺伝子発現解析法の検出感度が、低濃度吸入暴露影響を解析するために十分であることを実証するものであり、今後更に本手法を用いた経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化を発展させるべきと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 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

3. その他

なし

2. 学会発表

菅野 純、相崎健一、中津則之、北嶋 聡、
児玉幸夫、小川幸男、Percellome
Toxicogenomics for the Development of
Mechanism-based Predictive
Toxicology 第 66 回日本癌学会総会、
シンポジウム「がん創薬におけるイノベ
ーション」 2007 年 10 月 3 日、横浜、口
演

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi
Kitajima, Yukio Kodama, Yukio Ogawa,
PERCELLOME TOXICOGENOMICS PROJECT FOR
MECHANISM BASED PREDICTIVE
TOXICOLOGY: AN APPROACH TO MINIMISING
TOXICITY IN DRUG DEVELOPMENT. The 1st
Asia Pacific Regional Meeting
(APISSX) of International Society for
the Study of Xenobiotics (ISSX),
December 3-6, 2007, invited speaker

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

高次元データを塊に分割する装置
(特許第 3995099 号)

2. 実用新案登録

なし

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)
分担研究報告書

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

研究課題名: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

主任研究者 小川幸男 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
研究協力者 山本雅也 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
研究協力者 五十嵐勝秀 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
研究協力者 近藤優子 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
研究協力者 小野 敦 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
研究協力者 安彦行人 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

研究要旨

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、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。

具体的な目標として、少数のマウスの肺及び肝臓における遺伝子発現の網羅的なプロファイル生成により室内空気汚染化学物質等の毒性評価を従来の吸入毒性試験に比して、迅速、正確かつ詳細に予測するシステムの開発を目指す。このシステムの開発により、1)吸入毒性評価の効率化(実験期間及び解析時間の短縮)、2)実験動物から人への外挿の正確さの向上、3)毒性発現メカニズムに支えられた包括的な吸入毒性評価(急性毒性、慢性毒性、呼吸器限局性、及び全身性の影響などの統合を含む)、の面で飛躍的な進捗が望める。殊に、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。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であるが、更にこのシステムに小変更を加え、極性のホルマリンを含む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し、急性吸入毒性に関わる極低濃度暴露システムとした上で、急性吸入暴露実験を実施する。こ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。

急性吸入暴露(2時間単回)実験に際して、キシレン及びテトラデカンにはバブリング法、スチレ

ンはボンベ入り標準ガスを使用することで暴露期間内の安定した極低濃度ガスが得られ、これらの急性吸入暴露及び肺、肝臓サンプルの採取が終了した。テトラデカン蒸気は蒸気圧が低く、バブリング法での高濃度群へのガスの供給量が充分得られないことから、発生器の供給系のラインを増設することで目標濃度を達成した。

A. 研究目的

本試験は、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に、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。

殊に、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。しかし、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。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、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、横層流型の大型チャンバー(容積3m³、柴田科学、Photo. 1)、縦層流大型チャンバー(容積600L、柴田科学、Photo.2)、及び縦層流小型チャンバー(容積30L、柴田科学、Photo.2)を所有し、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、このシステムに変更を加え、極性のホルマリンまで多くの異なる気化性化学物質にも対応が可能なものとし、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、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、マウスに暴露、肝臓及び肺のサンプリングを行い、遺伝子発現解析に

供する。

B. 研究方法

所有する暴露施設のシステムを改修、極性物質まで多くの異なる気化性化学物質にも対応が可能なものとし、急性吸入毒性に関わる極低濃度暴露システムの開発・改良、マウスを用いた2時間の急性吸入暴露実験を実施する。極低濃度暴露のための化学物質の精密な発生方法、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、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。

これらの発生方法等の開発・検討結果に基づき吸入チャンバー内の化学物質濃度の測定を行いつつ、雄のC57BL/6CrSlcマウス(12週齢、日本SLC)に2時間の暴露を行い、マウスの肺及び肝臓サンプルは、2時間の暴露直後(12時)、暴露終了2時間後(14時)、暴露終了6時間後(18時)、暴露終了22時間後(翌日10時)に、1群3匹の4群計48匹から遺伝子発現量解析用に採取する。

動物は雄のC57BL/6CrSlcマウス(日本SLC)を10週齢にて購入、2週間順化飼育後実験に供した。飼育ケージは木製チップを敷いたポリカーボネートケージ(200×300×130mm)を用いて個別飼育し、暴露時には4連の金網ケージ(77×230×120mm)に収容した。なお暴露時は給餌及び給水を行わなかった。動物室内の環境は、室温23±1℃、湿度55±5%、換気は16回/時、明暗サイクルは12時間点灯(8:00～20:00点灯、20:00～8:00消灯)とした。

暴露チャンバーは、大型横層流(容積3m³、柴田科学、Photo. 1)を用い、内部環境は温度23±1℃、湿度55±5%、明暗サイクルは12時間点灯(8:00～20:00点灯、20:00～8:00消灯)とし換気は

650L/分(13回/時)、室内との差圧は-5~-10mmH₂Oとした。外気を空調機により温湿度調整を行い、HEPAフィルター及び活性炭フィルターを通し浄化した換気空気を用い、発生させたガスの希釈を行い暴露チャンバー内へ送気した。

1. キシレン

キシレンはトルエンと同様に塗料などの溶剤、ホルムアルデヒドと同様に接着剤などに用いら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(混合比率、およそ1:2:1:1)であり、それらの蒸気圧がわずかに異なっている。

これら4種類の蒸気圧に従った比率配合でキシレンのボンベ入りの標準ガス作成を依頼したが、ボンベ圧、内容量ともに少なく、2時間の暴露が不可能なため、バブリング方式を利用する発生系を用い、これにより発生させたガスを希釈して暴露を行った。

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0.20 ppmから、低濃度を0.20 ppmとし、公比3で0.7、2.0 ppmと設定した。

濃度検知は、捕集管(活性炭カラム、柴田科学、Photo. 2)を用いる方法で測定した。捕集管法は活性炭カラムにチャンバー内空気を流し、活性炭に捕集した有機ガスを二硫化炭素で抽出し、これをガスマススペクトルで測定する方法で、「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する方法の一つである。120分間のチャンバー内及び動物飼育室内空気を定流量ポンプ(1L/分:MPΣ-300(柴田科学、Photo. 2)、0.1L/分、0.03 L/分:SP208-1000 Dual (ジーエルサイエンス、Photo. 2))で捕集管へ通し、これを測定機関(財団法人東京顕微鏡院)に送付し、分析を依頼した。

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、Photo. 4)を用いて測定した。

1日6時間及び22時間、7日間連続暴露試験は日本バイオアッセイ研究センターに委託し、行った。

2. スチレン

スチレンは重合の後に発泡などの加工を施され、容器などに用いられている素材である。これらの樹脂製容器からスチレンが単離して、室内を汚染することが知られている。スチレンの暴露試験は、アセトアルデヒドガスの暴露試験で新たに設置した標準ガスボンベを利用する流路系を用い、標準ガスボンベを購入し単純に希釈するだけで暴露を行う方法が、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、濃度150ppmのスチレン標準ガスボンベ(Photo. 3)を高千穂商事より購入し、これを横層流型チャンバー内へ換気送流させている清浄空気により希釈し流入させた。

スチ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0.05ppm(220 μg/m³)から、低濃度を0.05ppmとし、公比3で0.15、0.5ppmと設定した。

濃度検知は、捕集管(活性炭カラム、柴田科学、Photo. 2)を用いる方法で測定した。捕集管法は活性炭カラムにチャンバー内空気を流し、活性炭に捕集した有機ガスをトルエンで抽出し、これをガスマススペクトルで測定する方法で、「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する方法の一つである。マウスへの120分間の暴露中のチャンバー内及び動物飼育室内空気を定流量ポンプ(1L/分:MPΣ-300(柴田科学、Photo. 2)、0.08L/分SP208-1000 Dual (ジーエルサイエンス、Photo. 2))で捕集管へ通し、これを測定機関(財団法人東京顕微鏡院)に送付し、分析を依頼した。

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、Photo. 4)を用いて測定した。

1日6時間及び22時間、7日間連続暴露試験は日本バイオアッセイ研究センターに委託し、行った。

3. テトラデカン

テトラデカンは灯油の一成分であり、塗料の溶剤や殺虫剤などに用いられている有機溶剤である。テトラデカンは蒸気圧が低く標準ガスの作成ができないため、バブリング方式により発生させたガスを希釈して暴露を行うこととした。

テトラデカ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0.04ppm(330 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.04ppmとし、公比3で0.12、0.4ppmと設定した。

テトラデカンは蒸気圧が低いため、バブリング方式を用いた場合、現在の発生器によっては発生させたガスのチャンバー内への供給量が不足し、目標濃度を達成できない。そのため、発生器から高用量群への配管を2本に増やすことで供給量を増加させることとし、発生器の改造を行った。

濃度検知は、捕集管(活性炭カラム、柴田科学、Photo. 2)を用いる方法で測定した。捕集管法は活性炭カラムにチャンバー内空気を流し、活性炭に捕集した有機ガスを抽出し、これをガスマスペクトルで測定する方法で、「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する方法の一つである。マウスへの120分間の暴露中のチャンバー内及び動物飼育室内空気を定流量ポンプ(1L/分:MP Σ -300(柴田科学、Photo. 2)で捕集管へ通し、これを測定機関(財団法人東京顕微鏡院)に送付し、分析を依頼した。

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、Photo. 4)を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

当所内の動物実験倫理委員会が定めた指針に則り、動物の飼育には適正な居住空間を確保、清潔なケージや器材を使用し、動物に苦痛を与えないため、採血および屠殺処分に際しては麻酔を行うなど、細心の注意を払っている。

C. 研究結果及び考察

1. キシレン

一般的に有機溶剤として使用されているキシレンは、ジメチルベンゼンの3種類の異性体o-(オルト)、m-(メタ)、p-(パラ)及びエチルベンゼンの混合剤で、その混合比率は製造時の原材料や製造条件で異なるがおよそ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、温度や圧力の条件が一定であれば恒に同一の割合で気化する。キシレンのボンベ入りの標準ガスを用いて暴露試験を行うには、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ヒトが暴露される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分間程度の暴露しかできない少ない内容量(480L)のため、ボンベ入りガスの使用を断念し、ホルムアルデヒドガスの暴露で使用したバブリング式の発生器(柴田科学、Photo 1)を用いることとした。タンク内の発生ガス濃度を検知管で測定した結果、本発生器を用いて、目標値に近い濃度をチャンバー内で作ることが可能であることを確認した。発生器における温度条件を固定することにより、恒に同じオルト、メタ、パラ及びエチルベンゼンの混合割合のガスを得ることが可能となる。キシレンの暴露濃度は、室内汚染化学物質の室内濃度指針値である0.20 ppm(870 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.20 ppmとし、中・高用量を0.7、2.0 ppmと設定した。

初回の濃度設定試験では発生流量を0.8L/分に設定し、0.20 ppmには0.55L/分、0.7 ppmには1.80L/分、2.0 ppmには5.50L/分を供給した。0.2ppm群チャンバーにおいて測定したTVOCモニター(FTVR-01、フィガロ技研、Photo. 4)値では7857.7 \pm 111.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値 \pm 標準偏差、Fig.1)安定した濃度推移を示したが、捕集管(活性炭カラム、柴田科学、Photo. 2)による低濃度は目標値0.2ppmに対し0.059ppmと低い濃度であった。2回目の濃度設定試験では発生流量を2.8L/分に設定し、0.20 ppmには0.39L/分、0.7 ppmには1.04L/分、2.0 ppmには4.41L/分を供給した。

0.2ppm群チャンバーにおいて測定したTVOCモニター値では $2292.0 \pm 65.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値±標準偏差、Fig.2)と安定した濃度推移を示したが、捕集管による濃度は0.20 ppm群で0.175ppmとやや低く、0.7 ppm群は0.375ppm、2.0 ppm群は1.116ppmと低かった。3回目の濃度設定試験では発生流量を2.8L/分のまま、0.20 ppmには0.44L/分、0.7 ppmには1.94L/分、2.0 ppmには7.90L/分を供給した。0.2ppm群チャンバーにおいて測定したTVOCモニター値では $3748.1 \pm 233.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値±標準偏差、Fig.3)と安定した濃度推移を示し、捕集管による濃度は0.20 ppm群は0.207 ppm、0.7 ppm群は0.938ppm、2.0 ppm群は2.884ppmであった。

この濃度試験の結果からさらに流量に補正を加え0.20 ppmには0.42L/分、0.7 ppmには1.45L/分、2.0 ppmには5.48L/分を供給した。0.2ppm群チャンバーにおいて測定したTVOCモニター値では $2826.6 \pm 63.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値±標準偏差、Fig.4)と安定した濃度推移を示し、捕集管による濃度は0.20 ppm群は0.193 ppm、0.7 ppm群は0.717ppm、2.0 ppm群は1.859ppmと目標値に近い値であった。

本試験においては、流量に補正を加え0.20 ppmには0.44L/分、0.7 ppmには1.42L/分、2.0 ppmには5.90L/分を供給した。0.2ppm群チャンバーにおいて測定したTVOCモニター値では $3275.9 \pm 299.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値±標準偏差、Fig.5)と安定した濃度推移を示し、捕集管による濃度は0.20 ppm群は0.161 ppm、0.7 ppm群は0.569 ppm、2.0 ppm群は1.918 ppmであった。このときの成分比はオルトを1としてメタ及びパラの混合は3.62、エチルベンゼンは1.18であった(Fig.6)。濃度設定試験全体の平均においても1:3.55:1.14(Fig.7)と本試験における割合と大きく変わらず発生器条件における濃度割合は、液体成分としての混合比とは異なることがわかった。

対照群チャンバー内の測定濃度は $0.0012 \pm 0.0007 \text{ ppm}$ ($5.420 \pm 3.372 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値±標準

偏差)、室内濃度は $0.0020 \pm 0.0008 \text{ ppm}$ ($8.190 \pm 3.811 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値±標準偏差)と低濃度群の0.207ppmに比し著しく低い濃度であり、一般環境大気での最大濃度 $44.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (o-,m-,p-の合計)(環境省、2003)を動物室内は遙かに下回り、一般家庭の室内空気中で検出される平均濃度5ppb(国土交通省、2003)を下回る濃度であり、影響はないものと考えられた。

1日6時間及び22時間、7日間連続暴露試験は日本バイオアッセイ研究センターに委託し、行った。詳細は委託研究報告 I)及びII)を参照。

2. スチレン

発生方法については、ボンベ入りのスチレン標準ガスを希釈する方式で暴露を行った。高千穂商事から購入した標準ガスの濃度は158及び154ppmであった。このガスをチャンバー内の総換気空気650L/分により希釈し、暴露した。

スチ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0.05ppm($220 \mu\text{g}/\text{m}^3$)から、低濃度を0.05ppmとし、中・高用量を0.15、0.5ppmと設定した。ボンベガスをチャンバー内の総換気空気650L/分により希釈した。初回の濃度測定試験では、設定濃度0.5ppmに対し標準ガスを2.17L/分 流した高濃度群の捕集管(活性炭カラム、柴田科学、Photo. 2)測定による濃度は0.326 ppmと35%低く、設定濃度0.05ppmに対し標準ガスを0.22 L/分 流した低濃度群の捕集管測定による濃度は0.036 ppmと28%低く、設定濃度0.15ppmに対し標準ガスを0.65 L/分 流した中間濃度群は0.081 ppmと46%低かった。この試験における低濃度群をTVOCモニター(FTVR-01、フィガロ技研、Photo. 4)で測定した値は $362.7 \pm 28.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値±標準偏差、Fig.8)と安定的に濃度を保持した。2回目の濃度測定試験では、設定濃度0.5ppmに対し標準ガスを3.33L/分 流した高濃度群の捕集管測定による濃度は0.645 ppmと29%高く、設定濃度0.05 ppmに対し標準ガスを0.29 L/分 流した低濃度群の捕集管測定による濃度は