

## B. 研究方法

### Total RNA の分離精製

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)に 4℃一晩浸漬し、RNase を不活化する。肝臓は5mm径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。肺は気管から生理食塩水を入れた後 RNA later を注入し、RNase 不活化を促した後、採取した。その後、RNA 抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット(キアゲン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 $\mu$ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

### GeneChip 解析

全 RNA 5  $\mu$ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0(マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

## C. 研究結果及び考察

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 $\times$ 7 日間暴露(6、22、70、166 時間後)、22 時間/日 $\times$ 7 日間暴露(22、70、166、190 時間後))させた際の肺と肝臓を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。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。得られた肺、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。

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 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。エピジェネティック制御は関連遺伝子群の発現変化が無くても、それらの酵素反応活性により調節される可能性がある。よって、現時点でエピジェネティック制御が関与してい

るかどうかについて結論づけることは出来ないと考えられる。そのためには、ゲノム DNA のメチル化及びヒストン修飾状況を詳細に調べ、実際にエピジェネティック変化が生じているか検討する必要がある。

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。よって、スチレンはキシレンとは逆に慢性的な暴露により遺伝子発現応答が起こりやすい方向、すなわちクロマチン構造が転写促進の方向にシフトしている可能性がある。

最後に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る。遺伝子機能カテゴリー等の既存情報に頼らない発現変動遺伝子検索法を適応し、トルエンの指針値域暴露による遺伝子発現変化に関し、結論を得る必要がある。

以上、今年度の解析結果は、キシレン、スチレンの経気道暴露により、肺で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のに十分なものであると考えられる。

#### D. 結論

網羅的遺伝子発現解析手法がホルムアルデヒド、アセトアルデヒドに続き、キシレン、スチレンの低用量経気道暴露による生体応答を捉えるのに有効な手法であることが実証された。すなわち、網羅的遺伝子発現解析手法は、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が示された。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。

この結果を踏まえ、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、高度化を推し進めていくことが重要である。

#### E. 研究発表

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130:811-823, 2007.

Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, Kanno J, Degawa M. A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats. *Drug Metab Dispos*, 35:1949-1955, 2007

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, 24:178-198, 2007

Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabolini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA,

Knudsen KE, Laufer H, Leblanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*,24:131-138, 2007

Takahashi Y, Yasuhiko Y, Kitajima S, Kanno J, Saga Y. Appropriate suppression of Notch signaling by Mesp factors is essential for stripe pattern formation leading to segment boundary formation. *Dev Biol*,304:593-603, 2007.

Morimoto M, Sasaki N, Oginuma M, Kiso M, Igarashi K, Aizaki K, Kanno J, Saga Y.(2007) The negative regulation of Mesp2 by mouse Ripply2 is required to establish the rostro-caudal patterning within a somite. *Development*, 134:1561-1569, 2007

Takahashi Y, Takagi A, Hiraoka S, Koseki H, Kanno J, Rawls A, Saga Y. Transcription factors Mesp2 and Paraxis have critical roles in axial musculoskeletal formation. *Dev Dyn*, 236:1484-1494, 2007

Baniasadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J. Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1. *Arch Pharm Res*, 30:444-452, 2007.

Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, Kanno J, Kanno H. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. *Exp Hematol*,35:1190-1200, 2007.

Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, Kanno J, Yamori T. Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. *Mol Pharmacol*. 2007 Aug 16

## 2. 学会発表

菅野 純、Chemosphere-Biosphere Interaction 解析ツールとしての Percellome Toxicogenomics、第34回日本トキシコロジー学会学術年会 特別講演 2007年6月27日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、菅野 純、モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノミクス(Percellome 手法)解析、第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月27-29日、東京

五十嵐 勝秀、種村健太郎、中津 則之、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質によるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした Percellome 解析、第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月27-29日、東京

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its possible contribution to 3R's, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences(WC6:第6回国際動物実験代替法会議)(Aug.21-25, 2007), Aug.23, Tokyo Oral

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体  $\alpha$  型の非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳機能解析、第 24 回日本疾患モデル学会総会、2007 年 8 月 31 日-9 月 1 日、つくば、口演

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Kodama Y, Takagi A, Kitajima S, TCDD-TCDF COMPARISON OF THE MOUSE LIVER TRANSCRIPTOME BY PERCELLOME ANALYSIS - A SEARCH FOR TEF GENE BY TIME AND DOSE-DEPENDENT RESPONSES -, Dioxin 2007(Sep2-7, 2007) Sep.4, 2007, Tokyo Oral

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, Percellome Toxicogenomics Project for Predictive Toxicology, 8th International ISSX meeting (Oct.9-12, 2007) Oct 9 short course speaker, Sendai

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体 ( $\alpha$  型) 非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳高次機能解析 第 100 回日本繁殖生物学会大会、2007 年 10 月 19-22 日、東京

五十嵐勝秀, 北嶋聡, 種村健太郎, 菅野純, エストロゲン受容体  $\alpha$  型の妊娠維持への関与 第 100 回日本繁殖生物学会大会、2007 年 10 月 19-22 日、東京

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

菅野 純、広瀬明彦、高木篤也、ナノマテリアルの毒性試験、毒性評価、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26-28 日、横浜(口演)

菅野 純、トキシコゲノミクス(Percellome Project) を基盤とした分子毒性学の展開の試み、第 145 回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会、教育講演、2008 年 3 月 28 日、相模原(教育講演)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

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副所長

協力研究者 西沢 共司 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部長  
笠井 辰也 日本バイオアッセイ研究センター 吸入試験室長補佐  
斉藤 新 日本バイオアッセイ研究センター 吸入試験室長補佐  
大西 誠 日本バイオアッセイ研究センター 分析室長  
武 信 日本バイオアッセイ研究センター 分析室長補佐

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、スチレンとキシレン(混合キシレン)を対象として室内濃度指針値(50 ppbと200 ppb)を考慮した濃度でマウスに全身暴露する方法について研究した。その結果、スチレンは市販の標準ガスを利用した暴露法により50、150および500 ppbの目標暴露濃度で吸入暴露する方法を開発することが出来た。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200、700および2000 ppbの目標暴露濃度で吸入暴露する方法を開発することが出来た。

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。また、毒性評価手法の開発に際しては、実際に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。

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。

平成18年度は、トルエンについて、室内濃度指針値である70ppbを考慮した吸入暴露を行うための暴露試験法の開発を試みた。その結果、市販の標

準ガスを利用した暴露方法により、70、200および700 ppbのの目標暴露濃度でトルエンを動物に吸入暴露する方法を開発することが出来た。

本年度は、スチレンとキシレン(混合キシレン)を対象として、極低濃度レベルでの吸入暴露実験の開発を試みた。すなわち、スチレンについては、室内濃度指針値である50ppbを考慮した目標暴露濃度50、150および500 ppbの吸入暴露方法、また、キシレンについては、室内濃度指針値である200ppbを考慮した目標暴露濃度200、700および2000 ppbの吸入暴露方法の開発を行った。

B. 研究方法

B-1 スチレン

スチレンを50、150および500 ppbの濃度で動物に吸入暴露方法を開発するために、下記の検討を行った。

- 1)吸入暴露システムの構築
- 2)スチレンの発生方法の検討
- 3)スチレン標準ガスと空気の混合および濃度制御の方法の検討
- 4)吸入チャンバー内のスチレンの濃度測定の方法の検討
- 5)吸入チャンバー内のスチレン濃度の均一性
- 6)吸入チャンバー内のスチレン濃度の日内変動
- 7)飼育環境中のスチレン濃度の確認

## B-2 キシレン

キシレンを200、700および2000 ppbの濃度で動物に吸入暴露方法を開発するために、下記の検討を行った。

- 1) 吸入暴露システムの構築
- 2) キシレンの発生方法の検討
- 3) キシレン蒸気と空気の混合および濃度制御の方法の検討
- 4) 吸入チャンバー内のキシレンの濃度測定の方法の検討
- 5) 暴露空気中のキシレンの異性体の比率
- 6) 暴露空気中のエチルベンゼンの濃度
- 7) 飼育環境中のキシレン濃度の確認

### (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

### C-1 スチレン

#### 1 スチレンの吸入暴露システムの構築

##### 1) スチレンの吸入暴露装置の概要

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スチレ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スチレ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スチレ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)。

##### 2) 吸入チャンバー

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。

#### 2 スチレンの発生方法

発生方法は市販の標準ガスを利用した方法について検討した。

120 Lのアルミ製ボンベに充填したスチレンの高圧標準ガス(発注濃度150 ppm)を、標準ガスのメーカー(高千穂商事(株))から入手した。媒体は窒素を使用した。また、充填圧力は0.9 MPaであった。この標準ガスについてスチレンとの同一性を確認した。

スチレンとの同一性は、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。

##### 1) スチレンとの同一性

標準ガスの特性を、GC/MS (Agilent Technologies 社製 Agilent Technologies 5973N)を用いて調べた結果、スチレ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、入手した試薬がスチレンであることを確認した (McLafferty 1994)。

##### 2) 標準ガスの実測濃度

入手した18本の高圧標準ガスボンベ(発注濃度150 ppm)の実測濃度を表1に示した。入手した高圧標準ガスボンベ18本の濃度は146 ppm~155 ppm(発注濃度の97%~103%)の範囲にあった。これらの高圧標準ガスボンベから、6時間暴露用に4本、22時間暴露用に14本を使用した。6時間暴露に使用したボンベの濃度は146 ppm~148 ppm(平均147 ppm)、22時間暴露に使用したボンベの濃度は148 ppm~155 ppm(平均152 ppm)であった。

#### 3 スチレン標準ガスと空気の混合および濃度制御の方法

スチレン標準ガスと空気の混合方法と暴露濃度のコントロール方法について検討した結果、下記の方法を選択した。

標準ガスボンベのスチレ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スチレンを吸入チャンバー内に送り込む。スチレ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する。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する。

各濃度群のスチレン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値は、スチレ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 + スチレン標準ガスの供給量)の設定値から下記

のように計算した。

供給量の理論値(L/分) = 目標濃度(ppb) ÷ スチレン標準ガスの濃度(150 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で、標準ガスの供給量(流量)の調整を行った。

スチレ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 + スチレン標準ガスの供給量)の設定値から計算したスチレン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値を表2に示した。

#### 4 吸入チャンバー内のスチレンの濃度測定の方法の検討

吸入チャンバー内のスチレンの濃度測定の方法について、被験物質の捕集方法および捕集管の前処理及び分析条件について検討した。

##### 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(ORBO™-100、Adsorbent、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。捕集管の設置位置は動物を収容したケージの上部とし、実験1(6時間暴露)と実験2(22時間暴露)とも50 ppb群、150 ppb群及び500 ppb群は吸入チャンバーの中央部(1箇所)および両端(2箇所)の計3箇所、対照群では吸入チャンバーの中央部1箇所から採気した。

捕集管の破過の可能性を確認するために、おおよそ50 ppb、150 ppb及び500 ppbの濃度のスチレン混合空気を、吸引流量0.5 L/分で6時間及び22時間、捕集管(ORBOTM-100、Adsorbent、SUPELCO製)に採気し、捕集管の活性炭第2層へのスチレンの移行を調べた。その結果、6時間採気では各濃度とも活性炭第2層へのスチレンの移行はなく、破過はなかった。これに対し、22時間採気では150 ppb及び500 ppbの濃度で活性炭第2層へのスチレンの移行が認められ破過が起きることがわかった。この結果から、150 ppbと500 ppbの22時間暴露は暴露全時間にわたる採気を行わず、採気時間を6時間とした。このため、捕集時間は、6時間暴露では各群とも暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ6時間とした。22時間暴露では対照群と50 ppb群では暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ22時間、150 ppb群と500 ppb群では捕集管の破過を考慮して暴露開始から6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、トルエン(和光純薬工業製 ∞Pure) 2 mL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。500 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。なお、抽出溶媒は鈴木ら(2004)の報告に基づいてトルエンを選択した。

ガスクロマトグラフの分析条件は、カラムはDB-1(0.53mmφ × 60m)、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100℃、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。

##### 5 吸入チャンバー内のスチレン濃度の均一性

吸入チャンバー内の位置によるスチレン濃度の均一性を確認するために、150 ppbと500 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(4箇所)の計5箇所について同時に採気し、スチレン濃度を測定した。捕集管の設置位置はいずれの測定箇所も動物を収容したケージの上部とした。

各チャンバーについて4回の測定を行った結果、測定箇所による変動係数(CV)は150 ppbの吸入チャンバーが3.53~8.75、500 ppbの吸入チャンバーが1.46~2.90であり、測定箇所によるばらつきは少なかった。

##### 6 吸入チャンバー内のスチレン濃度の日内変動

暴露時間22時間におけるスチレン濃度の時間変動を調べた。おおよそ150 ppbと500 ppbの濃度で22時間暴露を行い、暴露開始から6時間目、6時間目から12時間目、12時間目から16時間目、16時間目から22時間目の4回に分けて採気を行い、スチレン濃度を測定した。その結果、150 ppb群は最低値が188 ppb、最高値が200 ppbであった。また、500 ppb群は最低値が580 ppb、最高値が604 ppbであった。予備実験の段階であり両濃度群とも、目標濃度からは離れていたが、最低濃度に対する最高濃度の比は150 ppb群が1.06、500 ppb群が1.04であり、暴露時間22時間におけるスチレン濃度の変動は少ないことが確認できた。この結果から、22時間暴露における捕集時間は、対照群と50 ppb群では暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ22時間、150 ppb群と500 ppb群では暴露開始から6時間とした。

## 7 飼育環境中のスチレン濃度

下記の飼育環境の気中スチレン濃度を測定した。

- ①馴化期間に使用する吸入チャンバー
- ②暴露に使用する吸入チャンバー

各場所とも3箇所から高負荷型ミニポンプ(MP-Σ 100H、柴田科学製)を用いて捕集管(ORBO™-100、Adsorbent、SUPELCO製)に0.5 L/分の吸引流量で22時間採気した。スチレン濃度は、吸入チャンバー内のスチレンの濃度測定と同様の方法で測定した。

その結果、①馴化期間に使用する吸入チャンバー、及び②暴露に使用する吸入チャンバーの各測定点とも、スチレンは検出されなかった。

## C-2 キシレン

### 1 キシレンの吸入暴露システムの構築

#### 1) キシレンの吸入暴露装置の概要

キシレンについては、被験物質が複数の異性体より成る混合キシレンであるため、一般環境での暴露状態に合わせて常温に近い状態での加熱バブリング法(23℃)によりキシレンを気化させる曝露装置について検討した。

キシレンの吸入暴露装置のシステムを図6に示した。吸入暴露装置は、①キシレン蒸気の発生装置(図7)、②発生したキシレ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、③キシレ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した。

#### 2) 吸入チャンバー

吸入チャンバー、飼育ケージは前述したスチレンと同様のものを使用した。

### 2 キシレンの発生方法

被験物質が複数の異性体より成る混合キシレンであるため、一般環境での暴露状態に合わせて加熱バブリング法によりキシレンを気化させ一定濃度のキシレン蒸気を得る方法を選択した。

すなわち、標準ガスボンベを作製する場合はボンベ内で試薬の全量を蒸発させるため、標準ガスボンベ中のキシレン蒸気の組成は試薬と同一になる。しかし、各成分の蒸発の程度は蒸気圧により異なるため、一般環境で暴露されるキシレン蒸気の組成と標準ガスボンベ中のキシレン蒸気の組成との間に差がある可能性がある。このため、キシレンの発生方法として、標準ガスを利用した方法の代

わりに、加熱バブリング法を採用した。

被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)の発生容器内のキシレンを循環式恒温槽で加熱(22℃)しながら、清浄空気のパブリング(0.5 L/分)により蒸発させた。この被験物質を含む空気を循環式恒温槽で一定温度(17℃)に冷却後、清浄空気(一次希釈空気、10 L/分)と混合しながら循環式恒温槽で一定温度に再加熱(23℃)し、一定濃度のキシレン蒸気を得た。

なお、新鮮空気は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。

キシレン(*o*-体、*m*-体及び*p*-体の混合キシレン)は、和光純薬(株)の試薬(特級)を使用した。

#### 1) キシレンとの同一性

使用した試薬とキシレンとの同一性は、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。その結果、*o*-、*m*-及び*p*-キシレ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、入手した試薬がキシレンであることを確認した(McLafferty 1994)。

#### 2) キシレン試薬の組成(表3)

使用した和光純薬(株)の試薬(特級)における、異性体(*o*-体、*m*-体及び*p*-体)の比率および不純物であるエチルベンゼンの含有量を調べた。すなわち、標準ガスのメーカー(高千穂商事(株))で和光純薬(株)の試薬(特級)をボンベ内で全量蒸発させキシレン濃度として50 ppmと10 ppmの標準ガスを作製し、ガスクロマトグラフィーを用いてキシレンの異性体(*o*-体、*m*-体及び*p*-体)とエチルベンゼンの濃度を測定した。その結果、使用した和光純薬(株)の試薬(特級)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。

### 3 キシレン蒸気と空気の混合および濃度制御の方法

キシレン蒸気と空気の混合方法および暴露濃度のコントロール方法について検討した結果、下記の方法を選択した。

加熱バブリング法により得た一定濃度のキシレン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(二次希釈空気)と混合することにより設定濃度のキシレンを吸入チャンバー内に送り込んだ。キシレン蒸気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。

各濃度群のラインミキサーへのキシレン蒸気の供給量は、予備実験の結果からの予測値、すなわち200 ppb群が0.18 L/分、700 ppb群が0.55 L/分、2000 ppb群が1.62 L/分を目安にして開始し、前回のキシレン濃度の実測値を基に供給量の調整を行った。

この検討から得られた一次希釈キシレン蒸気(加熱バブリングして得られたキシレン蒸気を一次希釈空気希釈した状態)の予測供給量は、200 ppb群0.18 L/分、700 ppb群0.55 L/分、2000 ppb群1.62 L/分であった。

また、ガスクロマトグラフィーを用いて700 ppb群と2000 ppb群の吸入チャンバー内のキシレン濃度を経時的に測定・監視し、濃度変化の変動が見られた場合に流量の調整を行えるように備えた。

#### 4 吸入チャンバー内のキシレンの濃度測定

吸入チャンバー内のキシレンの濃度測定の方法について、被験物質の捕集方法および捕集管の前処理及び分析条件について検討した。

##### 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(ORBO™-91 Tube, Extra-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。捕集管の設置位置は動物を収容したケージの上部とし、実験1(6時間暴露)と実験2(22時間暴露)とも200 ppb群、700 ppb群及び2000 ppb群は吸入チャンバーの中央部(1箇所)および両端(2箇所)の計3箇所、対照群では吸入チャンバーの中央部1箇所から採気した。捕集時間は、6時間暴露では各群とも暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ6時間とした。22時間暴露では対照群と200 ppb群では暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ22時間、700 ppb群と2000 ppb群では捕集管の破過を考慮して暴露開始から6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)2 mLを加え、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群と2000 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DB-WAX(0.25 mmφ × 60m)、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100°C → (5°C/min) → 150°C、注入口温度は200°C、検出器温度は200°C、試料注入量は1 μLとした。

なお、キシレン濃度は、*m*-体と*p*-体を合わせたピーク、及び*o*-体のピークを計測し、両者を合計した。

#### 5 暴露空気中のキシレンの異性体の比率

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*o*-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%、*o*-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%、*o*-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。

#### 6 暴露空気中のエチルベンゼンの濃度(表4)

不純物として存在が予測されるエチルベンゼンの含量の確認を行った。すなわち、目標濃度700 ppbと2000 ppbの暴露を行い気中のキシレン濃度とエチルベンゼン濃度をガスクロマトグラフィーで45分おきに8回測定した。

目標濃度700 ppbでは、平均濃度はキシレンが582 ppb、エチルベンゼンが114 ppbであった。従って、キシレンとエチルベンゼンを合わせた濃度を100%とした時のキシレン濃度の割合は84%、エチルベンゼンの割合は16%であった。また、キシレン濃度を1とした時のエチルベンゼンの比は0.20であった。

目標濃度2000 ppbでは、平均濃度はキシレンが2014 ppb、エチルベンゼンが460 ppbであった。従って、キシレンとエチルベンゼンを合わせた濃度を100%とした時のキシレン濃度の割合は81%、エチルベンゼンの割合は19%であった。また、キシレン濃度を1とした時のエチルベンゼンの比は0.23であった。

#### 7 飼育環境中のキシレン濃度の確認

実験に先立って、下記の飼育環境の気中キシレン濃度を測定した。

① 馴化期間に使用する吸入チャンバー

② 暴露に使用する吸入チャンバー

各場所とも3箇所から高負荷型ミニポンプ(MP-Σ 100H、柴田科学製)を用いて捕集管(ORBO™-91 Tube, Extra-Large, SUPELCO製)に0.5 L/分の吸

引流量で22時間採気した。キシレン濃度は、吸入チャンバー内のキシレンの濃度測定と同様の方法で測定した。

その結果、①馴化期間に使用する吸入チャンバー、及び②暴露に使用する吸入チャンバーの各測定点とも、キシレンは検出されなかった。

#### D. 考察

スチレンについては①スチレンの標準ガスの品質、②スチレン標準ガスと空気の混合および濃度制御の方法、③吸入チャンバー内のスチレン濃度の測定方法、④吸入チャンバー内のスチレン濃度の均一性、⑤飼育環境中のスチレン濃度について検討し、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。また、キシレンについては①キシレン蒸気の発生方法、②キシレン蒸気と空気の混合および濃度制御の方法、③吸入チャンバー内のキシレン濃度の測定方法、④使用した試薬と暴露空気におけるキシレンの異性体およびエチルベンゼンの組成、⑤飼育環境中のキシレン濃度について検討し、加熱バブリング法による暴露方法の実用性について考察する。

##### D-1 スチレン

###### 1) スチレ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、標準ガスがスチレンであることが確認できた。

吸入チャンバーの換気量とスチレン標準ガスの供給量の流量比によるチャンバー内スチレ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150 ppm)18本の濃度は146 ppm~155 ppm(発注濃度の97%~103%)であり発注濃度に近く、また、ボンベ間のばらつきも少なかった。従って、スチレンは、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。

###### 2) 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ボンベのスチレ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、濃度制御はスチレ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について、その実用性について検証した。その結果、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、スチレン標準ガスの供給量を精度よく制御できることが確認できた。

3) 吸入チャンバー内のスチレン濃度の測定方法  
吸入チャンバー内のスチレン濃度は固相吸着-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、捕集剤からスチレンを溶媒抽出し分析した。捕集時間は、6時間暴露では暴露時間における総量を測定するために、各目標濃度とも暴露開始から暴露停止までの全時間とした。22時間暴露の捕集時間は、50 ppb群では暴露開始から暴露停止までとしたが、150 ppb群と500 ppb群では捕集管の破過が起きるため6時間とした。吸入チャンバー内のスチレン濃度は、最低濃度である50 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スチレン濃度の把握に有効であった。

###### 4) 吸入チャンバー内のスチレン濃度の均一性

吸入チャンバー内の位置によるスチレン濃度の均一性を確認するために、吸入チャンバーの吸入チャンバーの中央部(1箇所)および両端(4箇所)の計5箇所について、飼育ケージの直上部から同時に採気しスチレン濃度を測定した。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スチレ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スチレンと空気との混合が十分に行われたことを示している。

###### 5) 飼育環境中のスチレン濃度

実験に先立って①馴化期間に使用する吸入チャンバー内と②暴露に使用する吸入チャンバー内の気中スチレン濃度を測定した。その結果、スチレンは検出されなかった。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た。

以上のように、スチレンを被験物質とし、室内濃度指針値である50ppbを考慮した50、150および500 ppbを目標暴露濃度として暴露技術の開発を行ない、その実用性について検証した。その結果、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できた。

##### D-2 キシレン

###### 1) キシレン蒸気の発生方法

被験物質供給装置の発生容器内のキシレンを循環式恒温槽で加熱(22℃)しながら、清浄空気のパブリング(0.5 L/分)により蒸発させ、このキシレン蒸

気を含む空気を循環式恒温槽で一定温度(17℃)に冷却後、清浄空気(一次希釈空気、10 L/分)と混合しながら循環式恒温槽で一定温度に再加熱(23℃)する方法により、一定濃度のキシレン蒸気を得ることができた。一次キシレン蒸気の濃度(ラインミキサーへ供給したキシレン蒸気の濃度)は、流量と目標濃度から計算して約250 ppmと推定された。

## 2) 濃度制御の方法

一次希釈キシレン蒸気のラインミキサーへの供給量を流量計で調節することによって吸入チャンバー内のキシレン濃度を制御した。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。

## 3) 吸入チャンバー内のキシレン濃度の測定方法

吸入チャンバー内のキシレン濃度は固相吸着-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、捕集剤からキシレンを溶媒抽出し分析した。捕集時間は、6時間暴露では暴露時間における総量を測定するために、各目標濃度とも暴露開始から暴露停止までの全時間とした。22時間暴露の捕集時間は、200 ppb群では暴露開始から暴露停止までとしたが、700 ppb群と2000 ppb群では捕集管の破過が起きることが予測されたため6時間とした。その結果、吸入チャンバー内のキシレン濃度は、最低濃度である200 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キシレン濃度の把握に有効であった。

## 4) 使用した試薬と暴露空気におけるキシレンの異性体およびエチルベンゼンの組成

実験に使用したキシレンは3種類の異性体( $\sigma$ 体、 $m$ 体及び $p$ 体)により成る混合キシレンであり、また不純物としてエチルベンゼンを含有していることが予測されたため、試薬と暴露空気について異性体とエチルベンゼンの組成を調べた。

実験に使用した和光純薬(株)の試薬(特級)をボンベ内で全量蒸発させ分析した結果、試薬の組成は $\sigma$ -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、 $\sigma$ -キシレン30.3%、 $m$ -キシレン48.3%、 $p$ -キシレン21.4%であった。

暴露空気中のキシレン濃度とエチルベンゼン濃度の割合はキシレン81%、エチルベンゼン19%であった。また、キシレン濃度を1とした時のエチルベンゼンの比は0.20~0.23であった。このエチルベンゼンの割合は、試薬におけるエチルベンゼンの含量

15.4%に比較して、やや高い値であった。各成分の20℃における蒸気圧は、キシレンの $\sigma$ 体が0.7 kPa、 $m$ 体が0.8 kPa、 $p$ 体が0.9 kPa、エチルベンゼンが0.9 kPaであり、暴露空気中のエチルベンゼンの含量が試薬での割合に比較してやや高い値となった理由はエチルベンゼンの蒸気圧がキシレンの $\sigma$ 体と $m$ 体に比較して高いためであると考えられる。

暴露空気中の異性体の比率は、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 $\sigma$ 体の濃度の比率は、200、700及び2000 ppb群ともほぼ一定であり、 $m$ 体と $p$ 体を合わせた濃度が80.4~80.7%、 $\sigma$ 体の濃度が19.3~19.6%であった。試薬での組成は、 $m$ 体と $p$ 体の合計が69.9%、 $\sigma$ 体が30.3%であり、暴露空気中の $\sigma$ 体の割合19.3~19.6%は試薬中の $\sigma$ 体の割合30.3%に比較して低い値であった。この理由は $\sigma$ 体の蒸気圧(0.7 kPa)が $m$ 体と $p$ 体の蒸気圧(0.8 kPaと0.9 kPa)に比較して低いためであると考えられる。

本研究では、キシレンの発生方法として、標準ガスを利用した方法の代わりに、加熱バブリング法を採用した。その理由は、標準ガスボンベを作製する場合はボンベ内で試薬の全量を蒸発させるため、標準ガスボンベ中のキシレン蒸気の組成は試薬と同一になる。しかし、各成分の蒸発の程度は蒸気圧により異なるため、一般環境で暴露されるキシレン蒸気の組成と標準ガスボンベ中のキシレン蒸気の組成との間に差が生じる可能性があるためである。上述したように今回の研究結果でも、実験に使用した試薬をボンベ内で全量蒸発させた場合の成分比と暴露空気中の成分比には差が認められた。従って、蒸気圧の異なる複数の成分から成る混合液体を蒸発させる暴露実験では、被験物質蒸気の発生方法として、標準ガスを利用した方法の代わりに、加熱バブリング法を採用することが必要であることが立証された。

## 5) 飼育環境中のキシレン濃度

実験に先立って①馴化期間に使用する吸入チャンバー内と②暴露に使用する吸入チャンバー内の気中キシレン濃度を測定した。その結果、キシレンは検出されなかった。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た。

以上のように、キシレンを被験物質とし、室内濃度指針値である200ppbを考慮した200、700および2000 ppbを目標暴露濃度として暴露技術の開発を行ない、その実用性について検証した。その結果、一般環境での暴露状態に合わせて加熱バブリング

法(23°C)によりキシレンを気化させる方法が極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

## E. 結論

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)を対象として室内濃度指針値(50 ppbと200 ppb)を考慮した濃度で動物に全身暴露する方法の開発を試みた。その結果、スチレンは市販の標準ガスを利用した暴露法により50、150および500 ppb、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200、700および2000 ppbの目標暴露濃度で吸入暴露する方法を開発することが出来た。

## 参考文献

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

鈴木義浩、小谷野道子、阿部正憲、田名網保孝、2004、活性炭管を用いたスチレン測定についての考察、環境管理学会、室内環境学会合同研究発表会要旨

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 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 スチレン標準ガス(150 ppm)の濃度の実測値  
(スチレン、6 時間暴露)

ボンベ番号	実測濃度 (ppm)
GMY-16809	147
GMY-16811	148
GMY-16812	146
GMY-16999	148
平均	147

表 1-2 スチレン標準ガス(150 ppm)の濃度の実測値  
(スチレン、22 時間暴露)

ボンベ番号	実測濃度 (ppm)
GMY-7683	153
GMY-7687	153
GMY-8006	151
GMY-8308	153
GMY-8675	155
GMY-11680	155
GMY-11683	154
GMY-16810	151
GMY-16814	148
GMY-16817	149
GMY-16991	152
GMY-16992	151
GMY-16993	148
GMY-16994	149
平均	152

充填圧:0.9 MPa

容器の種類:120 L(アルミ製)

媒体:窒素

表 2 吸入チャンバーの換気量(新鮮空気の供給量 + スチレン標準ガスの供給量)の設定値、  
およびスチレン標準ガスのラインミキサーへの供給量(流量)の理論値  
(スチレン)

目標濃度	50 ppb	150 ppb	500 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
スチレン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値 *1	0.072 L/分	0.216 L/分	0.721 L/分

\*1: スチレ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) ÷ スチレン標準ガスの濃度(147 ppm × 1000) × 吸入チャンバーの換気量の設定値(212 L/分)

表3 実験に使用したキシレンの組成 \*1

	キシレンの異性体およびエチルベンゼンの組成 *2	キシレンの異性体の組成 *3
o-キシレン	25.6 %	30.3 %
m-キシレン	40.9 %	48.3 %
p-キシレン	18.1 %	21.4 %
エチルベンゼン	15.4 %	

\*1: 和光純薬(株)の試薬(特級)

\*2: キシレンとエチルベンゼンの合計を 100%とした時の各成分の組成

\*3: キシレンを 100%とした時のキシレンの異性体の組成

表4 暴露空気中のエチルベンゼン濃度

1) 目標濃度 700 ppb

	気中濃度	キシレンとエチルベンゼンの割合 *1	キシレンに対するエチルベンゼンの比*2
キシレン	582 ppb	84%	1
エチルベンゼン	114 ppb	16%	0.20

2) 目標濃度 2000 ppb

	気中濃度	キシレンとエチルベンゼンの割合 *1	キシレンに対するエチルベンゼンの比*2
キシレン	2014 ppb	81%	1
エチルベンゼン	460 ppb	19%	0.23

\*1: キシレンとエチルベンゼンの合計を 100%とした時のそれぞれの割合

\*2: キシレンを 1 とした時のエチルベンゼンの比

表5 吸入チャンバーの換気量、発生装置の設定条件(キシレン)

目標濃度	200 ppb	700 ppb	2000 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
発生装置のバブリング量(加熱温度→冷却温度→再加熱温度)		0.5 L/分 (22°C→17°C→23°C)	
一次希釈空気の流量		10 L/分	
一次希釈キシレン蒸気の供給量(流量)の予測値 *1	0.18 L/分	0.55 L/分	1.62 L/分

\*1: 予備実験から得られた予測値

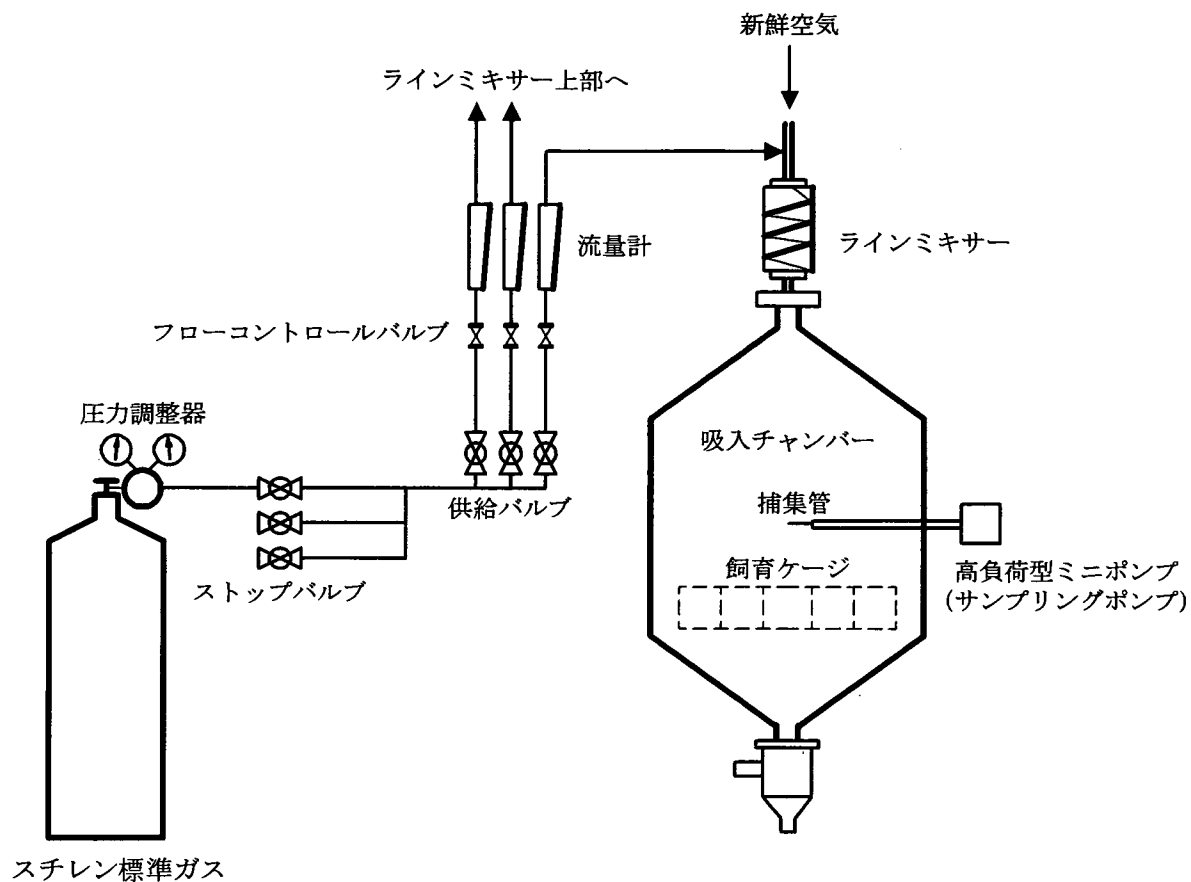


図1 吸入暴露装置のシステム(スチレン)



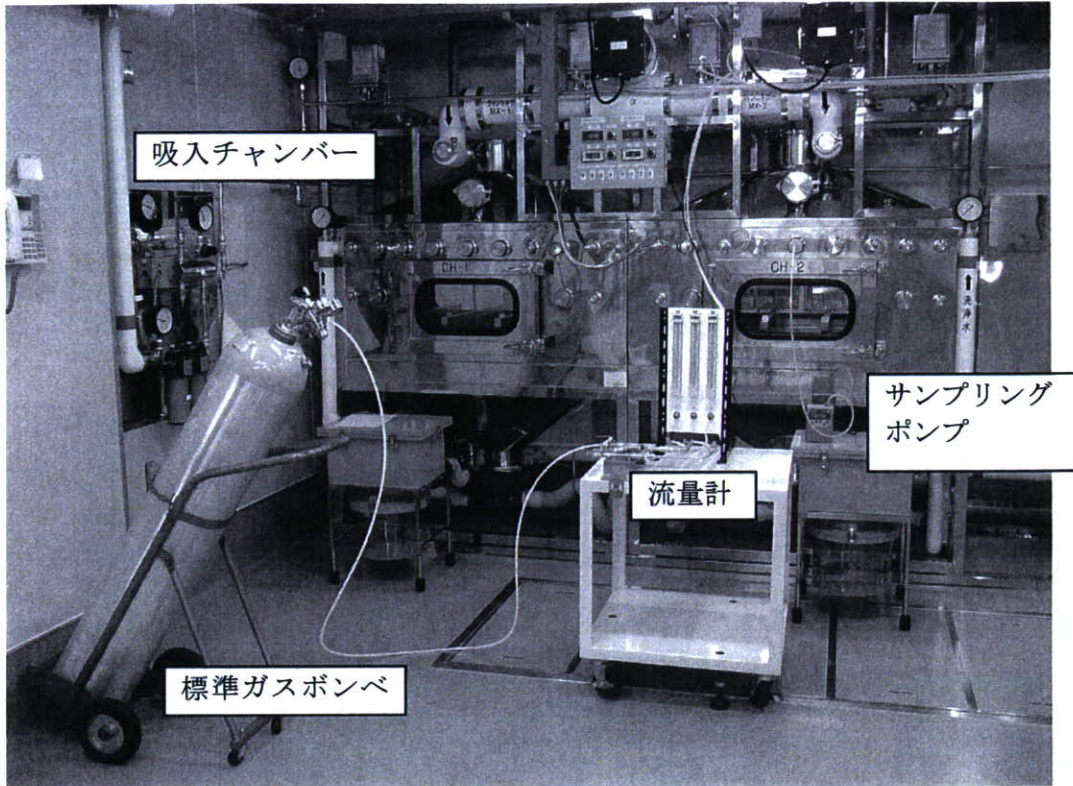


図 2 吸入暴露装置の概観

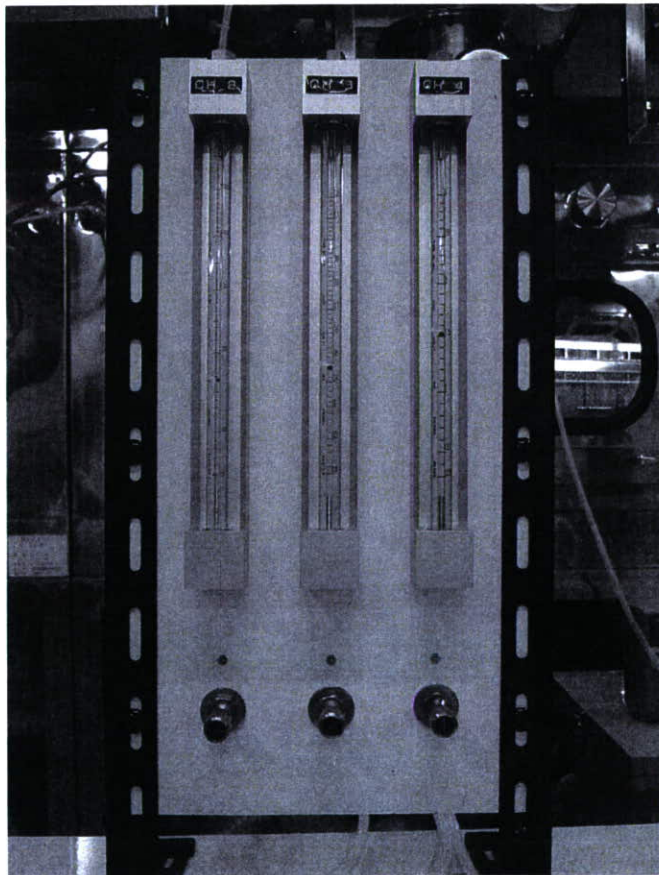


図 3 流量計





図4 チャンバー内の動物ケージと濃度測定用の捕集管

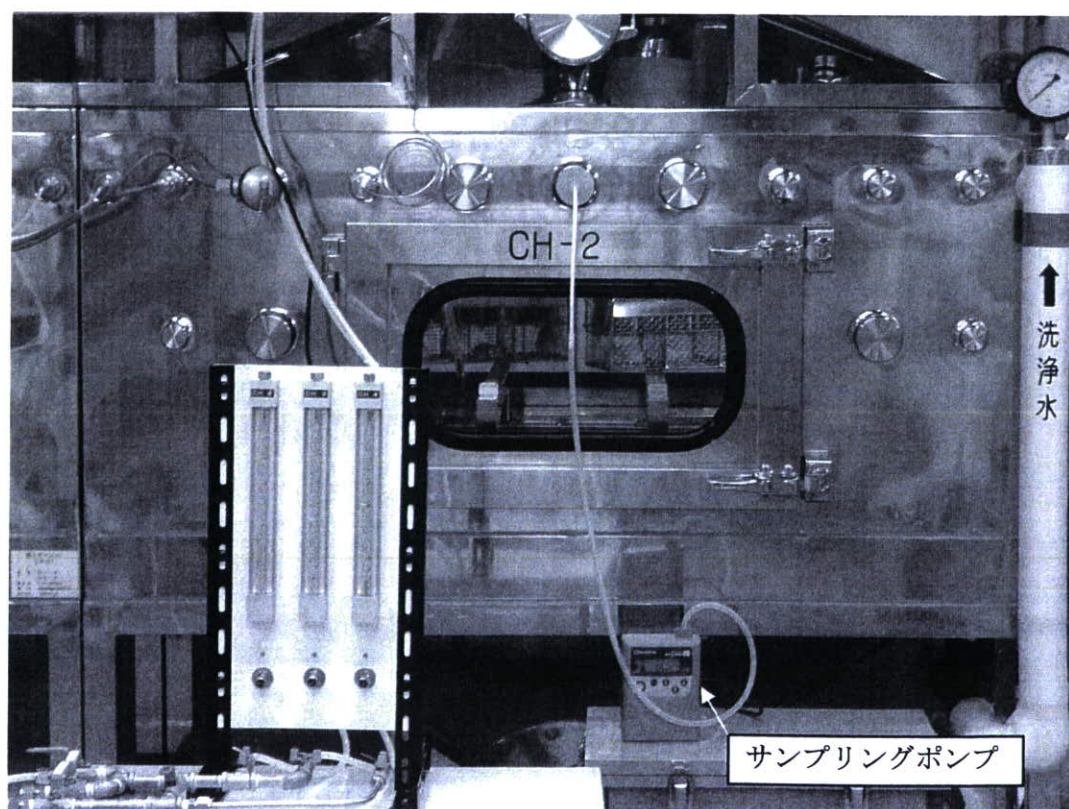


図5 濃度測定用のサンプリングポンプ

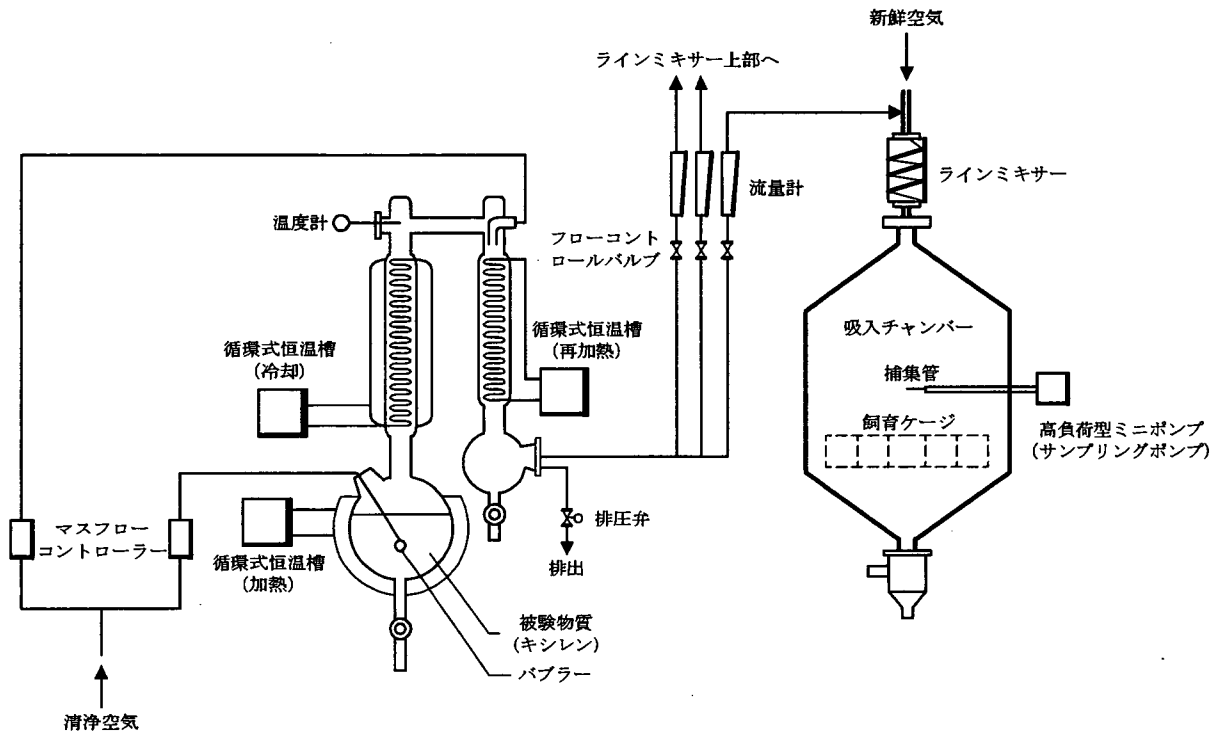


図6 吸入暴露装置のシステム(キシレン)

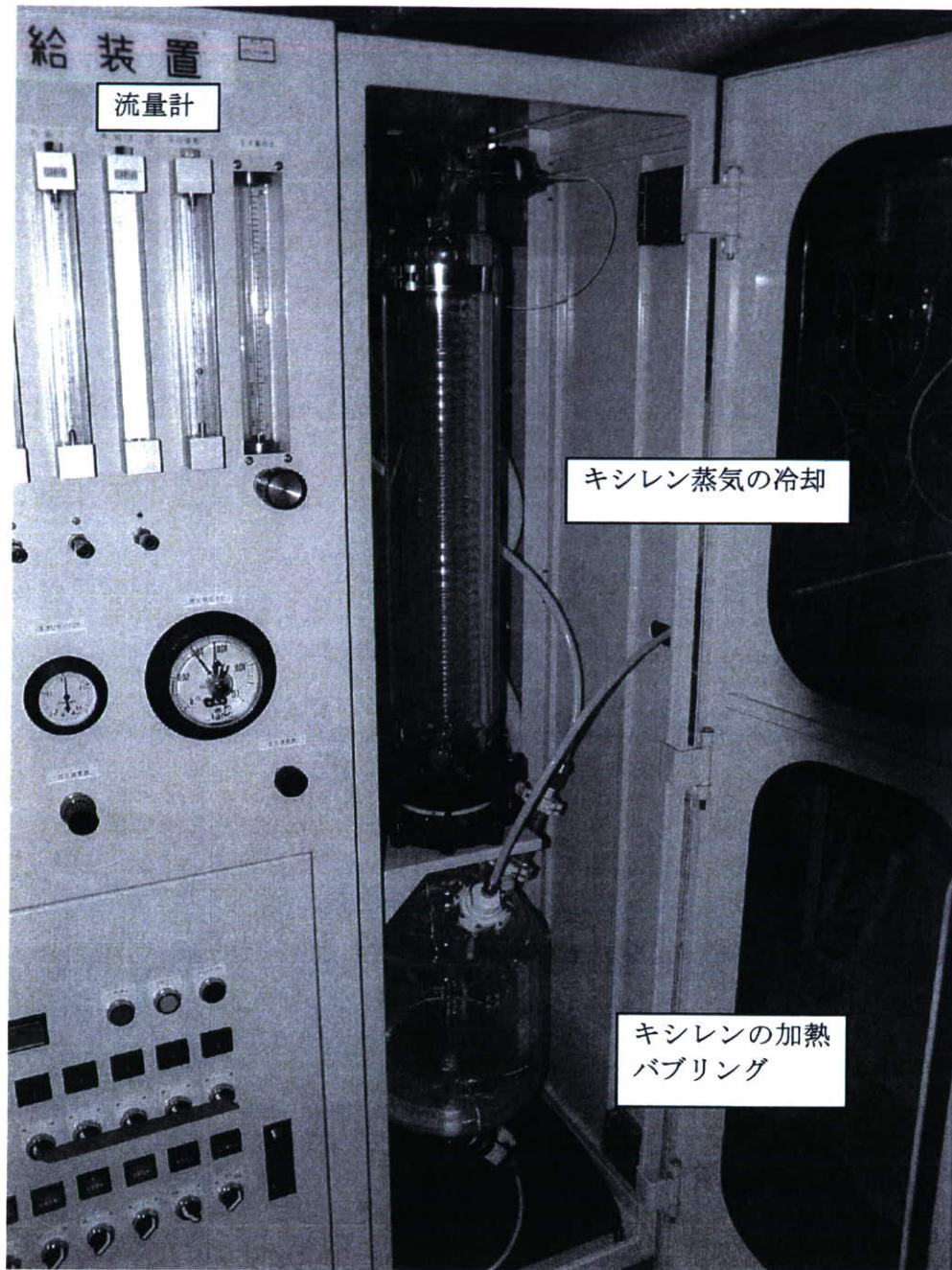


図 7 キシレン蒸気の発生装置



## 経済協力開発機構(OECD)における”Expert Consultation Meeting for the Revision of Test Guidelines 403, 412 and 413, and GD39”への参加報告

上記会議に出席し、OECDによる化学物質の毒性試験ガイドラインの改定について、情報収集および討議するとともに、提案を行ったので報告する。

会議の名称:”Expert Consultation Meeting for the Revision of Test Guidelines 403, 412 and 413, and GD39”

開催日:2007年 6月18-19日

開催場所:De Bilt(オランダ)

出席者: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)

### 1 会議の内容

OECDによる化学物質の毒性試験ガイドラインの内、現在のTest Guidelines 403(TG403, Acute inhalation toxicity、Test Guidelines 412(TG412, Repeated dose inhalation toxicity: 28-day or 14-day study)およびTest Guidelines 413(TG413, Subchronic inhalation toxicity)は1981年に制定されたものである。これらのガイドラインの改定案が担当国であるオランダから提案され、この案の内容について討議が行われた。参加国は、オランダ(事務局)、アメリカ、ドイツ、イギリス、フランス、スウェーデン、日本であった。別添1に参加者のリストを示した。

今回提出された改正TG 403、412、413は、いずれもオランダのTNO(Toxicology and Nutrition Institute)が作成したものであり、TNOのメンバーが説明し他の国が質問するという形で会議が進んだ。

#### 1)TG403, Acute inhalation toxicity(急性吸入毒性)

ドラフトの最終化のために、Concentration×Time Study(C times T study)に関する議論(方法と解説、有用性、検証の必要性)が行われた。

C times T studyの方法と有用性についてTNOから説明が行われた。すなわち、C times T studyは、高濃度の限界試験から開始し、生死状況により数段階の曝露濃度での試験を段階的(各濃度段階の試験の間隔は動物の死亡状況が確定できる期間、実際的には2~3日)に行う試験である。また、各濃度群(5匹/濃度群)について、15分目、30分目、1時間目、2時間目、4時間目に各1匹動物を吸入チャンバー(Nose-onlyチャンバーを使用する必要がある)から取り出し生死を調べるのを特徴としている。TNOの主張によれば、この方法の利点は①従来の方法(Standard protocol)に比べて使用動物数が少ない、②時間を加味した情報が得られる、としている。アメリカはオランダのこの主張に基本的に同調していた。ドイツのBayer社は、C times T studyの意義について疑問があることを主張していた。

C times T studyの検証の必要性についても討議が行われた。すなわちC times T studyの正しさの検証について、データベースによる検証の実施について議論された。その結果、従来の方法によるデータベースはアメリカEPAが提供、C times T studyによるデータベースはTNOが提供し、オランダと米国で検証作業を行い、来年の1月末までに結論を出すスケジュールが了承された。なお、従来の方法とC times T studyの比較のために、数物質について検証試験を行うことをアメリカとドイツ(Bayer社)が提案、また、データベースによる検証の問題点(比較するためのデータには、曝露方法の差など他の要因の差が内在している)についてアメリカなどから指摘があった。

#### 2)Draft Proposal for Revised Guideline 413(TG413, Subchronic inhalation toxicity)

改定ガイドラインは、鼻腔等の上部気道、および呼吸器に関連したリンパ節の病理検査が充実したのが特徴であり、NTOの病理学者であるDr.C. Frieke Kuperが病理検査について説明を行った。その後、Guidelineの各項目の内容について逐条的に議論された。提案されたガイドラインに対する主な修正項目は①試験開始時の動物の週齢(原案では8から12週齢)を「7から12週齢」に修正、②病理検査すべき臓器について、TG408(経口投与の亜急性試験)で指定されていない臓器は呼吸器とリンパ節以外はoptionalに変更である。その他の項目については、議論されたが、オランダは変更を受け入れなかった。私からは、従来から使用されている全身曝露チャンバーの有用性(提案されたガイドラインではNose-onlyチャンバーを推奨)、鼻腔の標本作製法の簡素化等について文章の変更を提案した。修正案をオランダが作成し配布する予定である。TG412(Repeated dose inhalation toxicity: 28-day or