

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 総合研究報告書

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 総合研究報告書

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 17

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 197

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 207

4. 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

辻村 和也 235

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 259

IV. 研究成果の刊行物・別刷 261

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総合研究報告書

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・分析を実施した。

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・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実施した。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継続が不可能となったため、辻村班員は平成18年度までの分担研究となった。

小川は、既存の暴露施設が非極性のベンゼン等の低濃度吸入暴露に適したシステムであったことを踏まえ、このシステムに小変更を加え、極性のホルムアルデヒド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なものとするべく検討、改修を行った。これを受け、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカンについて、室内濃度指針値を参考に、短時間(2時間)の極低濃度暴露を行い、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。極低濃度暴露を実現するにあたり、特にアセトアルデヒドについて、バブリング方式では困難であったが、長野班員との検討を経て標準ガスボンベを用いる方法に切り替えた結果、安定した暴露が可能となった。

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、肺、肝について網羅的遺伝子発現解析を行った。ホルムアルデヒド暴露について、経気道の場合には肝、経口の場合は肺で、より多くの発現変動が示唆された(投与経路から遠いと思われる臓器に多く変動が認められた)。また、蟻酸成分を多く含む

可能性のあるバブリング式ガス発生時にアルコールデヒドロゲナーゼが肺で発現誘導されること、実際に蟻酸代謝に関わるクエン酸合成酵素や MOD1 も発現誘導されていることを明らかにした。また、7 日間暴露において、肺線維症に関係するケモカイン CXC モチーフリガンド 12 や、びまん性肺胞障害や器質化肺炎に関係するスロンボスポンディン 1 の発現変化を捉えた。これらはホルムアルデヒド影響メカニズム解析の糸口となると考えられた。キシレンについて、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、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、ホルムアルデヒドガスの発生方法について、市販の標準ガスを利用することによってガスの安定供給が可能となり、ホルマリン液に添加されているアルコールの影響を排除できることを示した。この標準ガス利用法を活用し、トルエンは標準ガスを用い、目標暴露濃度に対し約 90%、スチレンも標準ガスを用い、目標暴露濃度に対し 94%から 98%、キシレンは混合物であることを考慮し、加熱バブリング法を用い、目標暴露濃度に対し 100%から 109%の吸入暴露を可能とする条件を設定した。これらの条件設定を受け、トルエン、スチレン、キシレンについて 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。

辻村は、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの 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。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について、室内空気汚染化学物質の吸入暴露による変化を検討し、暴露モニターマーカーとしての可能性を検討したが、顕著な変動は認められなかったことから、マーカーとしての利用は困難であるとの結論を得た。

以上、本研究により、これまで捕捉不能であった、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であることが示された。更なる解析とデータの蓄積を続けることにより、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た。

分担研究者

小川 幸男 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長
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
辻村 和也 財団法人・化学物質評価研究
機構 日田事業所(平成 18 年
度まで)

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、インフォマテイ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した。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した。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した。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・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した。

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・改良と吸入暴露による網羅的遺伝子発現解析

第一検討物質として選択したホルマリンをマウスに吸入暴露するシステムを整備し、肺、肝を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。マウスへ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0.08ppmを参考にし、0.001ppm、0.01ppm、0.1ppmとし、暴露システム整備を検討した。

既存設備を活用してこのような極低濃度のホルムアルデヒド暴露システムを達成するために、当初、横層流型大型チャンバーと縦層流小型チャンバーを併用した希釈方法を検討したが、縦層流小型チャンバー発生装置単独でのホルムアルデヒド蒸気発生希釈

を検討したところ、小型チャンバー単独で目標濃度が得られることが判明した。検体を暖める温浴の温度、発生ガスを冷却する温度、バブリングする気流量、希釈流量などの調節を経てガス濃度調整を行い、高感度ホルムアルデヒドガスモニターによる測定と、捕集管による測定で安定して設定濃度を得られる条件を見出した。

他方、マウスを暴露装置に投入すると、その直後にガスモニター表示値が測定限界以下となる問題が明らかとなり、原因としてマウス被毛へのホルムアルデヒドガス吸着が考えられた。そのため、送気濃度を0.1、0.3、1.0ppmに上げ、容量の大きい横層流型大型チャンバーを用い、且つ、内部に電動ファンを設置しチャンバー内の気相を強力に攪拌することによりマウス存在下で所定の暴露装置内濃度が得られる条件を確定した。この条件でマウスへの暴露を行い、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。暴露時間は2時間とし、臓器採取は暴露終了直後、その2時間後、6時間後、及び22時間後の4時点にて実施した。

アセトアルデヒドは当初バブリング方式での発生法で検討を開始したが、濃度を目標の0.03ppm、0.1ppm、0.3ppmまで低下させることが困難であったため、ボンベ入りの標準ガス(濃度104ppm)を用いる方法へと変更した。トルエンも同様にボンベ入りの標準ガス(濃度203ppm)を用い目標濃度を0.07ppm、0.2ppm、0.7ppmとしてマウスに暴露した。

また、ホルムアルデヒド影響の解析を目的に実施したホルマリン暴露実験に関し、ホルマリンにメチルアルコールが含まれていることを考慮し、メチルアルコールを含まないホルムアルデヒド標準ガスボンベを用いる実験を追加した。

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は、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。

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、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。

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、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)及び(4)の条件にて経気道暴露された C57BL/6CrSlc マウスの肺と肝について、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法: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。データ解析に当たっては、別途当方で得た経口単回暴露後のデータと比較した。

(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

まず、ホルムアルデヒドガスの暴露設定条件について文献等既存情報の調査を行い、最適な方法を検討した。

1. 発生方法

シックハウス症候群で問題とされているホルムアルデヒドガスは極低濃度であり、従来の吸入暴露実験の設定のままでは困難であることが予想された。そこで、その濃度域での暴露を実現するために、ガス発生方法の調査を行った。その結果、従来用いられてきた、1) パラホルムアルデヒドを加熱する方法、2) ホルマリン水溶液を噴霧する方法に加え、3) ホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法が考えられた。

以下、各方法について記す。

1) パラホルムアルデヒドを加熱する方法

固体であるパラホルムアルデヒドを発生容器中で加熱し、昇華したホルムアルデヒドを希釈して動物に暴露する方法で、従来試験の多くがこれを用いている。加熱温度は、54～90℃であり、発生容器の容量と加熱温度によってホルムアルデヒド蒸気の発生量を調整している。発生したホルムアルデヒドを発生容器から送り出すキャリアーガスは、空気を使用している報告が多いが、窒素ガスを用いる報告もある。

2) ホルマリン水溶液を噴霧する方法

ホルマリン水溶液を、ネフライザーを用いて噴霧することによりホルムアルデヒド蒸気を発生させる方法である。この方法で使用するホルマリン水溶液は、重合を防止するために5%から13%の割合でメチルアルコールが添加されている。

3) ホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法

現在、大気汚染物質測定用に標準ガスが市販されている。ホルムアルデヒドについても、1 ppmと20 ppmの標準ガスが入手できる。この標準ガスボンベのホルムアルデヒドをさらに希釈して動物に暴露する方法である。ホルマリン液には安定化剤としてアルコールが添加されており、その影響が常に問題となるが、ボンベで供給される場合はアルコールが含まれておらず、この問題を回避することができる利点を有する。

2. 濃度制御方法

次に、発生したホルムアルデヒドを空気と混合し、設定濃度に希釈して、動物を収容した吸入チャンバーに送気する方法を調査検討した。その結果、いずれの報告も発

生したホルムアルデヒド蒸気と空気との流量比をフローメータにより調整し、一定濃度のホルムアルデヒド混合空気を作成していることが分かった。その他の工夫として、発生容器の容量と加熱温度によってホルムアルデヒド蒸気の発生量を調整していること、発生したホルムアルデヒド蒸気をテドラバックに一時的に集め、テドラバックからの流量により微調整していることが分かった。ホルムアルデヒド発生装置と吸入チャンバーの間に混合槽を設け、段階的に希釈していた。

希釈に使用する空気については、過去の実験報告では特に考慮されていなかった。一方で、大気中のホルムアルデヒド濃度は、一般環境大気で0.2～7 ppb(幾何平均値:2 ppb)、室内空気で16～211 ppb(幾何平均値:50 ppb)と報告されていた(環境省、2002)。

3. 吸入チャンバー内濃度モニター方法

極低濃度のホルムアルデヒド濃度をモニターする方法を調査した。

ホルムアルデヒドの測定方法は、1) 気中濃度を直接測定する方法、2) 捕集法による分析がある。

1) 気中濃度を直接測定する方法には、赤外分光光度計、ガスクロマトグラフィー、光音響ガスモニター等の機器が用いられている。赤外分光光度計によるホルムアルデヒドの分析限界は数ppmであり、空気中に混在する他のガスの影響を受けやすい。ガスクロマトグラフィーによる方法は、メタナイザによるメタン変換後にFID検出器で測定すると測定限界が100 ppb、PDD検出器で測定すると測定限界が30 ppbである。光音響ガスモニターは、赤外線を吸収する性格を利用する方法であり、測定限界が40 ppbであり、測定に要する時間が1分未満

である。

2) 捕集法による分析は、一般環境大気中のホルムアルデヒド濃度の測定に使用されている方法である。捕集剤にDNPH含浸シリカゲルを用い、高速液体クロマトグラフィーにより分析する方法では、20 Lの空気(1000 ml/分、20分)を捕集するとホルムアルデヒド濃度をppb単位で測定することができる。

次に、この標準ガス利用法を活用し、トルエン、スチレン、キシレンについて6時間/日x7日間暴露、22時間/日x7日間暴露を行い、肺、肝を採取した。以下、物質毎に記す。

1)トルエン

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70ppbを考慮して、0, 70, 200および700ppb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)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。

3)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。

(4)室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒド(22時間/日/7日間暴露)及びアセトアルデヒド(6時間/日/7日間暴露、22時間/日/7日間暴露)の低濃度吸入暴露実験、高感度指標及び有害性指標としての生体内ヒスタミンの有用性検討を行った。

マウス(C57BL/6 解剖時12週齢 雄)を対象とし、全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械)を用い、暴露用量は4濃度を設定し、暴露時間は1日6時間あるいは1日22時間、7日間連続暴露した。

発生法は、ホルムアルデヒドはホルマリン希釈液をばっ気、アセトアルデヒドは標準ガスを封入したボンベを用い発生させた。また、餌及び水については暴露中も自由摂取とした。ヒスタミン測定については、シックハウス症原因4物質(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン)を経口投与した時のマウス血漿中ヒスタミン濃度を酵素免疫測定(ELISA)で定量した。また、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの高濃度吸入暴露による血中ヒスタミン濃度の変動を検討した。両物質とも設定濃度を3及び15 ppmとした。暴露は、6時間の1回暴露とし、採血ポイントは、6時間暴露の直後とした。ヒスタミン濃度測定は、先の試験と同様に行った。

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

既存の暴露施設が非極性のベンゼン等の低濃度吸入暴露に適したシステムであったことを踏まえ、このシステムに小変更を加え、極性のホルムアルデヒド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なものとするべく検討、改修を行った。その施設を用いて実施した暴露実験について、化学物質毎に記す。

1)ホルムアルデヒド

発生方法については、ホルムアルデヒドガスの低濃度を安定的に得られるバブリング方式が最適であった。ガスの希釈法では、100倍希釈液をバブリングすることで、小型チャンバーとその発生器のみで目標濃度を達成することが可能であった。しかし、マウス被毛へのガス吸着が濃度低下を引き起こし、小型チャンバーの発生機では吸着量を上回るホルムアルデヒドガスの発生は計算上不能なため、横槽流大型チャンバーとその発生機を用いることとした。さらに、大型チャンバー内にサーキュレーターを設置し、内部空気を強力で攪拌することで、マウス被毛へのガス吸着による濃度の不均一を解消した。捕集管による濃度は、最高濃度の設定濃度 1.0ppm に対して 0.74ppm と 26% 低く、最低濃度 0.1ppm では 0.175ppm と 75% 高いが、中間濃度 0.3ppm は目的値を達成し、公比は約 2 であった(図 6)。このときの高感度ホルムアルデヒドガスモニター値(平均値±標準偏差)は最高濃度で 0.789 ± 0.046 ppm、中間濃度 0.402 ± 0.027 ppm、最低濃度 0.197 ± 0.019 ppm であり、一定濃度を安定的に保持し、動物に暴露することができた。

2)アセトアルデヒド

ホルムアルデヒド暴露試験と同様に、バブリング法を検討したところ、発生機内のガス濃度を目標値まで低下できない問題が生じた。そこで、新たに標準ガスポンペ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ポンペ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ポンペガスの流量を補正、濃度測定、を繰り返して行い、目標濃度 0.3、0.1、0.03ppm で暴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。

ポンペ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。

3)トルエン

トルエンの暴露試験は、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、これを希釈し暴露を行う方法を採用することにより短時間で実験設定が可能となり、また安定した濃度が得られると考えた。トルエン標準ガスをチャンバー内の総換気空気により希釈する方式で暴露を行った。

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 μ g/m³) 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ポンペ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、測定端末に於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 群チャンバーに於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)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。先の実験で用いたホルマリン液(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 ($260\text{mg}/\text{m}^3$)と設定している物質である。前年度の暴露試験に於いて、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、マウスに暴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暴露試験を追加した。

暴露濃度はバブリングで行ったのと同じ設定とした。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 3m^3 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、所定の濃度で暴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回の暴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 群チャンバーに於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。

5)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。

6)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。

7) テトラデカン

テトラデkan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

ホルマリン経気道暴露のデータを解析した結果、最も多くの遺伝子の発現が変化した臓器は肝であり、発現変動が示唆された遺伝子数は約 400 であった。一方、経気道暴露による肺では約 60 種類の遺伝子の発現変動が認められた。また、経口短期暴露では、肝で約 60 種類、肺で約 110 種類の遺伝子の発現変動が示唆された(投与経路から

遠いと思われる臓器に多く変動が認められた)。

以下で、吸入暴露により発現変動が認められた遺伝子について考察を加えた。まず、化学物質代謝に関わる遺伝子として、アラキドン酸、リノール酸を代謝する Cyp2c55 の他、Glutathione S-transferase (GST)、mu2、mu3、theta3 の発現誘導が認められた。どれも暴露後 24 時間の時点で暴露量依存的に発現上昇するパターンを示した。これは、吸収されたホルマリンによる代謝酵素誘導には、一定の時間が必要であることを示唆する。また、DNA 障害への対応に関与する RAD9 の発現上昇がやはり 24 時間目に用量依存的に認められた。これがホルマリンによる DNA 障害を反映するものであるかは検証が必要であるが、注目すべき変化である。更に、マレイン酸をピルビン酸へ代謝する Mod1(malate dehydrogenase)や、クエン酸回路に於けるオキサロ酢酸からクエン酸への代謝を担う CS (citrate synthase)の発現上昇も認められ、糖ヌクレオチド運搬体である Slc35b4 も発現上昇した。また、T 細胞活性化に関わる Ly6a(Sca-1)の発現が 2、24 時間の時点で発現上昇した。2 時間時点で発現上昇した遺伝子として、膜タンパクで金属イオン結合領域を持つが機能不明である Zinc finger DHHC domain containing 12 (Zdhhc12)やアポトーシスへの関与が示唆される B-cell leukemia/lymphoma 6(Bcl6)があり、ホルマリンの生物作用といかに関連するか注目された。

次に、6時間/日x7日間暴露、22時間/日x7日間暴露のデータを解析した結果、6時間/日x7日間暴露時に肺でアルコールデヒドロゲナーゼが発現誘導されることを見出した。そこで、暴露ガス発生方法を見直したところ、この発現誘導はメチルアルコール及び蟻酸成分を

多く含む可能性のあるバブリング式ガス発生時に起こっていた。実際、蟻酸代謝に関わるクエン酸合成酵素や MOD1 の発現誘導はバブリングガス発生時にのみ起こっていた。

さらに、肺線維症に係るケモカイン CXC モチーフリガンド 12 が2時間/日暴露肺で発現上昇していること、22 時間/日/7 日暴露肺で、びまん性肺胞障害や器質化肺炎に係るスロンボスポンディン 1 が発現上昇することが明らかとなった。肺の病態への関与が報告されているこれらの遺伝子発現変化はホルムアルデヒド暴露影響に係る可能性があると考えられた。

次に、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。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。

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、用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

まず、ホルムアルデヒドガスの暴露設定条件について検討した。その結果を次のようにまとめた。

1) 発生方法

市販されている標準ガスを利用することによってガスの安定供給が可能であるとともに、ホルマリン液に添加されているアルコールの影響を排除できる。

2) 空気との混合及び濃度制御の方法

流量比による制御が基本であり、極低濃度暴露の場合には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

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を確認するため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。

これらの結果は、他の辺員によるホルムアルデヒド暴露実験に生かした。これを踏まえ、次に、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 及び 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。

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、群間及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、及び、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。

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、ボ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) 新鮮空気との混合及び濃度制御の方法

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)及び両端(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。

次に、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る吸入チャンバー内のトルエン濃度を実測検討したところ、6時間/日/7日間、22時間/日/7日間暴露実験共に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。

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及び700 ppbの設定値が0.169、0.46及び1.54 L/分であったのに対し、理論値はそれぞれ0.141、0.404及び14.1 L/分であった。目標暴露濃度70、200及び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、暴露時間に於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と考えられた。

さらに、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。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 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、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 x 7日間、22時間/日 x 7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*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、 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 x 7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 x 7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 x 7日間、22時間/日 x 7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。

(4)室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの長期

低濃度吸入暴露実験を行うための暴露システムの整備に加え、高感度指標及び有害性指標としての生体内ヒスタミンの有用性検討を行った。

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)

ばつ気法による6時間の安定性は確認済みであったため、さらに5~22時間までを検討し、濃度平均値は中濃度で 0.0926 ± 0.0121 ppm、高濃度で 0.385 ± 0.0446 ppmと安定であることを確認した。

実験前の吸入実験室濃度は、平均値 0.00318 ppm(n=2)、使用前チャンバー内の濃度は、平均値で $0.00505 \sim 0.00866$ ppm(n=2)であった。実試験における発生濃度については、1、3及び7日の発生開始1、21時間後に採気、測定を行い、低濃度群： 0.0284 ± 0.00655 ppm(設定値 0.03 ppm)、中濃度群： 0.0934 ± 0.0107 ppm(設定値 0.1 ppm)及び高濃度群： 0.306 ± 0.0198 ppm(設定値 0.3 ppm)、対照群は、 0.00111 ± 0.000294 ppmと低濃度群の $1/25$ 程度のバックグラウンドが検出された。

ヒスタミン濃度においては、1日間暴露直後及び7日間暴露直後の2ポイントにおいてホルムアルデヒド暴露に依存する顕著な変動は見られなかった。

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)

実験前の吸入実験室での濃度は、平均値 0.00117 ppm(n=2)、使用前チャンバー内の濃度は、平均値 $0.000344 \sim 0.000721$ ppm(n=2)であった。発生濃度については、1、3及び7日の発生開始1、3及び5時間後に採気を行い、暴露濃度の平均値は、低濃度群： 0.0319 ± 0.000932 ppm(設定値 0.03 ppm)、中濃度群： 0.107 ± 0.0141 ppm(設定値 0.1 ppm)及び高濃度群： 0.329 ± 0.00880 ppm(設定値 0.3

ppm)、対照群は 0.00208 ± 0.000788 ppmと低濃度群の $1/15$ 程度のバックグラウンドが検出され、6時間/日/7日間の安定な発生が可能であった。

ヒスタミン濃度においては、1日間暴露終了直後及び翌日(暴露終了後16時間後)、7日間暴露終了直後及び翌日(暴露終了後16時間後)ポイントにおいてホルムアルデヒド暴露に依存する顕著な変動は見られなかった。

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)

実験前の吸入実験室濃度は、平均値 0.000477 ppm(n=2)、使用前チャンバー内の濃度は、 $0.000477 \sim 0.000860$ ppm(n=2)であった。発生濃度については、1、3及び7日の発生開始後1及び21時間後に採気を行い、実験時の各濃度群における実測濃度の平均値は、低濃度群： 0.0345 ± 0.00159 ppm(設定値 0.03 ppm)、中濃度群： 0.0924 ± 0.00431 ppm(設定値 0.1 ppm)及び高濃度群： 0.316 ± 0.0130 ppm(設定値 0.3 ppm)、対照群は、 0.00498 ± 0.00277 ppmと低濃度群の $1/7$ 程度のバックグラウンドが検出された。

ヒスタミン濃度においては、1日間暴露直後及び7日間暴露直後の2ポイントにおいてアセトアルデヒド暴露に依存する顕著な変動は見られなかった。

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドいずれも所定の濃度で暴露が実施でき、網羅的遺伝子発現データ解析のためのサンプルを採取した。

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

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン暴露について、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した。しかし、日常的に暴露される極低濃度域では、ヒスタミンの変動は確認できなかった。更に、毒性影響

が認められる濃度においてもアセトアルデヒドでやや上昇傾向は見られたが、用量相関性はなかった。

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・改良と吸入暴露による網羅的遺伝子発現解析

既存暴露施設のシステム変更を行い、極性気化性物質であるホルマリンをマウスに短期間安定して低濃度暴露するシステムを確立した。それにより、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカンについて、シックハウス症候群関連物質の室内濃度指針値を参考に定めた目標濃度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取得することに成功した。

(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

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン、及びスチレンについて網羅的遺伝子発現データを解析した結果、室内濃度指針値レベルの吸入暴露による遺伝子発現変動を明確に検出した。

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。

(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

ホルムアルデヒドについて、過去に於ける吸入暴露実験の報告及び現在の吸入暴露技術等の資料を収集し、100 ppb から 1 ppb の濃度範囲での暴露には、標準ガスの利用が効果的であるとの結論に至り、提案した。実際、アセトアルデヒドを始め、本件急坂に於ける極低用量暴露実験が安定化することが示された。この結果を踏まえ、トルエン、スチレン、キシレンの 6 時間/日 x 7 日間、22 時間/日 x 7 日間暴露実験を行い、ほぼ目標暴露濃度に近い精度での暴露を実施し、肺及び肝の遺伝子発現解析用サンプルを採取した。

(4)室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの 6 時間/日 x 7 日間、22 時間/日 x 7 日間暴露実験を行い、ほぼ目標暴露濃度に近い精度での暴露を実施し、肺及び肝の遺伝子発現解析用サンプルを採取した。

血中ヒスタミン濃度については、空気対照群と比較し、顕著な変動は無かった。また、高濃度吸入暴露した場合でも血中ヒスタミン濃度の顕著な変動はみられなかった。すなわち、ヒスタミンをシックハウス症候群の指標とすることは難しいと結論した。

E. 考察

本研究により、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン、及びスチレンについて、室内濃度指針値レベルの吸入暴露に伴い、肺、肝で遺伝子発現が変動することが確認された。この結果は、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、これまで捕捉不能であった、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であることを示唆するものである。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。

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

Ogawa Y., Sekita K., Umemura T., Saitoh M., Ono A., Kawasaki Y., Uchida O., Matsushima Y., Inoue T., Kanno J. *Gymnema sylvestre* Leaf Extract: A 52-Week Dietary Toxicity Study in Wistar Rats. *J Food Hyg. Soc. Japan*, 45: 8-18, 2004

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 (APISXX) of International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), December 3-6, 2007, invited speaker

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純、Toxicity study of *Garcinia cambogia* extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純 Toxicity study of *Garcinia cambogia* extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice 第32回日本トキシコロジー学会学術年会(2005.7)

H. 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