

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

吸入暴露による網羅的遺伝子発現データの解析による  
吸入暴露評価と経口暴露の比較研究

分担研究者 菅野 純

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部长

研究要旨

本研究は、化学物質の経気道暴露による肺と肝に於ける遺伝子発現変化を経口暴露によるデータと比較しつつ解析し、経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に寄与する知見を得ることを目的とした。

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。ホルムアルデヒドについて、室内濃度指針値レベルの経気道短期暴露を受けたマウス肺、肝の網羅的遺伝子発現データを、経口単回暴露後の肺、肝のデータと比較解析した結果、最も多くの遺伝子の発現が変化した臓器は経気道暴露による肝であり、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に加え、DNA障害への対応に関与するRAD9の発現上昇が認められた。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も明らかになった。総じて、経気道の場合には肝、経口の場合は肺で、より多くの遺伝子発現変動が認められた(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)。7日間暴露においては、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の発現変化が捉えられた。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。次に、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上昇が顕著に認められた。実際、Nrf2, Junb, Fos, Hmox1, Gpx2, Txnrd1, Gclc等の関連遺伝子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たが、キシレンとは逆に連日暴露により、時間、用量依存的な応答が明瞭になる傾向があった。トルエンでは発現変化はほとんど認められなかった。

以上の結果は、網羅的遺伝子発現解析手法を用いることにより、シックハウス室内濃度指針値レベルの極低用量暴露に於いて生じる生体反応変化を捉えることが可能であることを示すものである。

## A. 研究目的

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、日常生活に於いて暴露される様々な気化性化学物質の安全性確保の為の、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した。

シックハウス症候群の原因物質とされる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が、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、この隔たりを埋める基盤としてのトキシコゲノミクス手法の適用に関する検討を進めた。

## 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°C一晩浸漬し、RNase を不活化した。肝は 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°C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砕液を調製した。得られた破砕液の 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ールに従い、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°C 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

始めに、ホルムアルデヒドについてデータ解析を進めた。ホルムアルデヒドの指針値 0.08ppm に対し、暴露濃度は、実地測定値(捕集管)で 0, 0.175, 0.302, 0.745ppm を 2 時間吸入させた。これは、マウスの呼吸量を 1 分当たり 13.2mL とした場合に、各々 13.8, 23.9, 58.9  $\mu$ g/kg/2hr の暴露量に相当する。2 時間の経気道暴露の後にすぐに臓器を採取した群を 2 時間群とし、更に 2, 6, 22 時間後採取群を 4, 8, 24 時間群とした。得られた肺、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)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。データ解析にあたっては、別途当方で得た経口単回暴露(0, 3, 10, 30mg/kg の 4 用量、時間は同一条件)後のデータと比較した。

経気道暴露において、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示唆された。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。以下に、経気道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。

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を要することを示唆するものと考えられた。

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更に解析を加える必要があると考えられた。

次に、6 時間/日 x 7 日間暴露、22 時間/日 x 7 日間暴露のデータを解析した結果、6 時間/日 x 7 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ることが分かった。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 x 7 日間暴露肺で、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。各々、指針値と暴露目標値は次の通りとした。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。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。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探るため、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、用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と考えられた。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、指針値に近い用量の暴露では、トルエン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り、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用しなければ、結論は得

られないと考えられた。

以上、本研究により得られた解析結果は、ホルムアルデヒド、キシレン、スチレンの経気道暴露による肺における種々な遺伝子の発現誘導を示すものであり、化学物質の極低用量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た。

#### D. 結論

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が明確に検出された。

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。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

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, Farabollini 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
- 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
- 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
- Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol*. 2006 20(9):2141–55 (2006)
- Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development*.

2006 133(9):1625-34.

Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H. PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. *Pathol.* 2006 209(4):522-31 (2006)

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics.* 2006 Mar 29;7:64.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 103(1):224-9.

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、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、2007年1月号、株式会社秀潤社

菅野 純、毒性の高精細解析に向けてのトキシコゲノミクス、医学のあゆみ Vol.218 No.12 2006.9.16 p1035-6

## 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、Percellom トキシコゲノミクス・プロジ  
ェクトの概要と基礎生物学への応用、明治薬  
科大学オープンカレッジ、2006 年 8 月 7 日、  
東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、  
第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年 7  
月 3-5 日、名古屋

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、  
中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第 10 回  
がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月  
15 日、東京

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞  
当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法  
の概略と生物研究への応用、九州大学医生  
研セミナー、2006 年 4 月 17 日、福岡

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞  
当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法  
\*の概略と生物研究への応用、第 104 回熊本  
大学発生研・拠点形成 A セミナー、2006 年 6  
月 5 日、熊本

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールと  
しての Percellome System、第 95 回日本病理  
学会総会、2006 年 4 月 30 日-5 月 2 日、東  
京

菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、  
中津則之、トキシコゲノミクスからのアプロー

チ、第 15 回環境ホルモン学会講演会、2005 年 6 月 2 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Per cell” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference “Toxicogenomics”, Jun 5-10, 2005, NH, USA

菅野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害の Percellome トキシコゲノミクス研究、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

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、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

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、相賀裕美子、菅野 純、Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the “Percellome” system as a model for molecular developmental toxicity、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 年 7 月 1～3 日、東京

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、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

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives”, August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Percellome” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、菅野純、Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 64 回日本癌学会学術総会、2005 年 9 月 14-16 日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中の植物エストロ



ジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、  
環境ホルモン学会第8回研究発表会、2005  
年9月27-29日、東京

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北  
嶋聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおける視床  
下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現  
の Percellome 解析、環境ホルモン学会第8  
回研究発表会、2005年9月27-29日、東京

Jun Kanno, Approaches by Basic Biology to  
Reinforce the Screening and Testing Strategy  
for the Endocrine Disruptors, KFDA/NITR  
International Symposium, Oct 11-12, 2005,  
Korea

菅野 純、ナノマテリアルの安全性確認に関  
する課題、三菱安全化学研究所講演会、  
2005年12月1日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun Kanno,  
Mass Distributed Clustering : A New  
Clustering Algorithm for Repeated  
Measurements in Gene Expression Data, The  
16th International Conference on Genome  
Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸  
夫、菅野純、Diethylnitrosamine 及び  
N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝  
子発現変動解析、第28回日本分子生物学会  
会、2005年12月7-10日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、  
マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマ  
イクロアレイ解析、第28回日本分子生物学会、

2005年12月7-10日、福岡

菅野純、中津則之、相崎健一、北嶋聡、五十  
嵐勝秀「Percellome Project による発がん関  
連 transcriptomics」-Diethylnitrosamine 等  
の Carcinogen の肝遺伝子発現解析 (B6  
versus C3H の検討から) - 第3回日本癌学  
会カンファレンス(2006.3)

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide  
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima,  
Yukio Kodama Percellome Project for  
phenotype-independent toxicogenomics  
CASCADE Annual Meeting(2006.3)

F. 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

化学物質の極低濃度暴露で生じる健康影響を検出するエンドポイントの有効性を実証することを目的として、トルエン、スチレンおよびキシレン(混合キシレン)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について研究した。その結果、トルエンは市販の標準ガスを利用した手法により室内濃度指針値である70ppbを考慮した目標暴露濃度70、200および700 ppbで吸入暴露する方法を開発できた。スチレンは市販の標準ガスを利用した手法により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で吸入暴露する方法を開発できた。キシレンは加熱バブリング法により気化させる手法により室内濃度指針値である 200、700および2000 ppbの目標暴露濃度吸入暴露する方法を開発できた。

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。

平成18年度は、市販の標準ガスを利用した暴露方法の実用性を検証するために、トルエンを対象と

し、室内濃度指針値である70ppbを考慮した目標暴露濃度70、200および700 ppbの吸入暴露方法の開発を行った。

平成19年度は、スチレンとキシレン(混合キシレン)を対象として、吸入暴露方法の開発を行った。すなわち、スチレンについては、市販の標準ガスを利用した暴露法により、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の吸入暴露方法の開発を行った。また、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加熱バブリング法(23℃)によりキシレンを気化させる方法を選択し、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 文献の収集等による検討

化学物質をppbオーダーの濃度で継続的に動物に経気道暴露するための手法を開発するために、ホルムアルデヒドを対象として、100 ppbから1 ppbの濃度で動物に経気道暴露する方法について、下記の項目について文献等の情報から検討を行った。

- ① 少量の化学物質を継続的に大気へ拡散させる方法(発生方法)
- ② 吸入チャンバー内の化学物質の濃度を極低濃度で一定に制御する方法
- ③ 吸入チャンバー内の化学物質の濃度をモニターし暴露濃度の精度を確認する方法

### B-2 極低濃度暴露手法の開発(トルエン)

トルエンを70、200および700 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) トルエンの発生方法の検討
- 3) トルエ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トルエンの濃度測定の方法の検討
- 5) 吸入チャンバー内のトルエン濃度の均一性
- 6) 飼育環境中のトルエン濃度の確認

### B-3 極低濃度暴露手法の開発(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-4 極低濃度暴露手法の開発(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 文献の収集等による検討

ホルムアルデヒドの経気道暴露による動物実験の方法について、過去の文献を検索した(表1)。

これらの報告の暴露濃度は、Swenbergら(1980)およびChangら(1981、1983)が2~15 ppm、Kernsら(1983)が2~14.3 ppm、Maronpotら(1986)が2~40 ppm、Monticelloら(1991、1996)が0.7~15 ppmであった。なお、他の化学物質との複合暴露実験では、KulleとCooper(1975)がオゾンとの混合暴露を0.5~2 ppm、Albertら(1982)が塩化水素との混合暴露を14 ppmの濃度で行っている。これらの動物実験で用いているホルムアルデヒドの発生、濃度制御および、濃度モニターの方法について以下に述べる。また、

過去の文献で用いられていない方法に関する情報についても記載した。

### 1 ホルムアルデヒドの発生方法

これまでの動物実験で用いられている発生方法は、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である。また、これまでの実験では用いられていない方法として、ホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法がある。

#### 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あり、Swenbergら(1980)、Changら(1981、1983)、Kernsら(1983)、Monticelloら(1991、1996)、KulleとCooper(1975)およびAlbertら(1982)がこの方法を用いている。

加熱温度は、Swenbergら(1980)が54～82℃、Changら(1981、1983)が70～90℃、Albertら(1982)が75～90℃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、Monticelloら(1991、1996)は窒素ガスを用いている。

#### 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り、Maronpotら(1986)が用いている。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。充填容量は500Lと2000Lのボンベ

がある。バランスガスとして窒素が用いられている。重合防止のための添加剤は使用されていないが、メーカーは有効期限を3ヶ月としている。1 m<sup>3</sup>の吸入チャンバーを使用し、換気量を12回/時間に設定し、6時間/日暴露した場合の標準ガスの必要量を表2に示した。なお、1 m<sup>3</sup>の吸入チャンバーは、ラットあるいはマウスを20匹収容し、暴露することができる。

### 2 ホルムアルデヒドの濃度制御の方法

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である。

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。その他の工夫として、Swenbergら(1980)、Changら(1981、1983)は、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。また、Changら(1981、1983)は、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。KulleとCooper(1975)、Albertら(1982)は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る。

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い。しかし、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)と報告されている(環境省、2002)。

### 3 吸入チャンバー内のホルムアルデヒド濃度をモニターする方法

Changら(1981、1983)、Kernsら(1983)、Maronpotら(1986)、Monticelloら(1991、1996)は赤外分光光度計を使用してホルムアルデヒド濃度をモニターし

ている。これに対し、KulleとCooper(1975)、Albertら(1982)は、吸入チャンバー内の空気を捕集し、Chromotropic acid法により、濃度分析を行っている。Swenbergら(1980)は赤外分光光度計による濃度監視を0.5時間ごとに行うとともに、7～10日ごとにChromotropic acid法による確認を実施している。

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。

## C-2 極低濃度暴露手法の開発(トルエン)

### 1 トルエンの吸入暴露システムの構築

#### 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)。

#### 2) 吸入チャンバー

動物を収容する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 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方法について検討した。

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。

#### 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 (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3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。

## 3 トルエン標準ガスと空気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。

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を表4に示した。

## 4 吸入チャンバー内のトルエンの濃度測定の方法

### 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-Σ100H、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)に合わせることにした。

### 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°C → (10°C/min) → 150°C(1min)、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。

## 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

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 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。

その結果、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。

## C-3 極低濃度暴露手法の開発(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、飼育ケージは前述したトルエンと同様のものを使用した。

### 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5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) ÷ 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6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個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、測定個所による変動係数(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、測定個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-4 極低濃度暴露手法の開発(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トルエ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7)

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-Σ100H、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℃→(5℃/min)→150℃、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。

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8)

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-Σ100H、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

### D-1 文献の収集等による検討

ホルムアルデヒドを対象として、極低濃度の化学物質を動物に経気道暴露する方法について検討するため、過去の動物実験における暴露手法について情報を収集した。これまでの動物実験の暴露濃度は、最も低濃度の実験でも0.5 ppmであり、今回の目標濃度である100 ppbから1 ppbの濃度レベルの実験にそのまま応用できる情報は入手できなかった。そこで、100 ppbから1 ppbの濃度レベルの極低濃度実験の実現のために、①ホルムアルデヒドの発生方法、②ホルムアルデヒドの濃度制御の方法、および③吸入チャンバー内のホルムアルデヒド濃度をモニターする方法について、過去の報告の中で応用可能なもの、および新規の方法について考察した。

#### 1)ホルムアルデヒドの発生方法

パラホルムアルデヒドを発生容器中で加熱する方法とホルマリン水溶液を噴霧させる方法がある。ホルマリン水溶液を噴霧させる方法は、水溶液中のホルムアルデヒド濃度を下げることによって極低濃度暴露を実現させる可能性が有る。しかし、市販されているホルマリン水溶液は重合防止のためメチルア

ルコールを添加しているため、メチルアルコールの影響を考慮する必要がある。これに対し、パラホルムアルデヒドを発生容器中で加熱する方法はホルムアルデヒドのみの蒸気を得られるという利点があり、過去の動物実験の多くがこの発生方法を採用してきた。しかし、目標とする極低濃度レベルの実験では、従来の実験の10倍から1000倍低い暴露濃度が要求されるため、極少量のホルムアルデヒドを恒常的に発生させる必要がある。パラホルムアルデヒドを加熱する方法は、温度やキャリアーガスの流量によってホルムアルデヒドの発生量の変動する。このため、極低濃度暴露では、テドラバックや混合槽に一定濃度のホルムアルデヒド蒸気を集め、ここから少量のホルムアルデヒド蒸気を吸入チャンバーに送気する方法を併用する必要がある。この課題を解決する方法として、環境中汚染物質の測定用に市販されているホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法がある。この方法では、一定濃度のホルムアルデヒド蒸気をガスボンベから得られ、また、送気量の調整も容易である。1 m<sup>3</sup>の吸入チャンバーを使用し、換気量を12回/時間とした場合、1 ppmの標準ガスを流量を0.2 L/分で送気すれば、1 ppbの暴露レベルを得ることができると予測される。現在市販されている大気汚染物質用の標準ガスは、ビニルクロライド、ジクロロメタン、クロロホルム、ベンゼン、1,2ジクロロエタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,3ブタジエン、アクリロニトリル、アセトアルデヒド等であり、ホルムアルデヒド以外の化学物質の極低濃度暴露実験にも応用できる可能性がある。

#### 2)ホルムアルデヒドの濃度制御の方法

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。極低濃度レベルの実験でも、フローメータまたはガスフローコントローラを用いたホルムアルデヒド蒸気と空気の混合が基本となる。しかし、ホルムアルデヒド蒸気の流量を調整するフローメータの機能には限界が