

あるため、安定した混合比を得るための限界が存在する。すなわち、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、空気200 L/分に対し、ホルマリン蒸気の流量を調節するフローメータの安定した流量は0.2 L/分程度であり、希釈率は1000倍以内を限度と考える必要がある。この希釈率の範囲で極低濃度暴露の目標濃度を達成するためには、前述した混合槽による段階希釈や標準ガスを使用した方法が必要になる。その他、極低濃度暴露の特殊性として、希釈する空気中に含まれる化学物質に対する考慮する必要がある。このため、送気側に活性炭等のフィルターを装備し、希釈に使用する空気から化学物質の除去する必要がある。

### 3) 吸入チャンバー内のホルムアルデヒド濃度を測定する方法

経気道暴露実験では、通常、15分毎に吸入チャンバー内の化学物質の濃度を測定し、暴露精度を確認している。また、濃度制御の操作でも、ホルムアルデヒド蒸気と空気の混合比を調節するために短時間にチャンバー内の濃度をモニターすることが必要である。これまでのホルムアルデヒドの暴露実験は赤外分光光度計による濃度監視を行なっているものが多い。しかし、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。このため、ppb単位の極低濃度暴露には赤外分光光度計による濃度監視は応用できない。また、その他の気中濃度を直接測定する方法の測定限界も、ガスクロマトグラフィーが30 ppb、光音響ガスモニターが40 ppbであり、目標とする10 ppb以下の測定には使用できない。これに対し、捕集法による分析はppb単位の測定が可能であるが、空気の捕集時間、抽出、測定のために要する時間が長く、通常の暴露実験で吸入チャンバー内濃度の精度監視として実施している15分毎の測定には適していない。今回の調査では、極低濃度暴露実験で吸入チャンバー内の濃度を常時監視するための条件にあった分析手法を入手できなかった。

た。①濃度制御をモニターするための混合槽や標準ガスの濃度測定には直接測定が適し、②吸入チャンバー内の暴露濃度の精度を確認のためには捕集法による分析が適している。従って、現在の分析技術を使用してホルムアルデヒドの極低濃度暴露実験を実現するためには、両者を併用するのが合理的であると考えられる。

以上の検討結果をもとに、トルエン、スチレンおよびキシレンを被験物質とし、室内濃度指針値を考慮した極低濃度レベルで吸入チャンバーを用いた全身暴露による吸入暴露方法を開発した。すなわち、トルエンについては、市販の標準ガスを利用した暴露方法により、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での動物への吸入暴露を可能にする方法を開発した。スチレンについては、市販の標準ガスを利用した暴露方法により、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での動物への吸入暴露を可能にする方法を開発した。また、キシレンについては、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、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での動物への吸入暴露を可能にする方法を開発した。

以下に、トルエンについては①トルエンの標準ガスの品質、②トルエ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トルエン濃度の測定方法、④吸入チャンバー内のトルエン濃度の均一性、⑤飼育環境中のトルエ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、スチレンについても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。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-2 極低濃度暴露手法の開発(トルエン)

### 1)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。

### 2)新鮮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。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、トルエン標準ガスの供給量を精度よく制御できた。

### 3)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、暴露時間にお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70 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。

### 4)吸入チャンバー内の位置によるトルエン濃度の均一性

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、吸入チャンバー内のトルエ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トルエ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、および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。このことから、チャンバー内に供給する新鮮空気は、外気を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ことが必要と考えた。

### D-3 極低濃度暴露手法の開発(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検証できた。

#### D-4 極低濃度暴露手法の開発(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、清浄空気のバブリング(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(*o*-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*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。

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*o*-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*o*-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*o*-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%、*o*-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%、*o*-体が30.3%であり、暴露空気中の*o*-体の割合19.3~19.6%は試薬中の*o*-体の割合30.3%に比較して低い値であった。この理由は*o*-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℃)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検証できた。

#### E. 結論

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、化

学物質を生活環境中の濃度に即した極低濃度で動物に経気道暴露する方法について研究した。その結果、以下の結論を得た。

1)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。

2)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。

3)キシレン(混合キシレン)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。

#### 参考文献

Chang JCF, Steinhagen WH, Barrow CS. 1981. Effect of single or repeated formaldehyde exposure on minute volume of B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 61: 451-459.

Chang JCF, Gross EA, Swenberg JA, Barrow CS. 1983. Nasal cavity deposition, histopathology, and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposure in B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 68: 161-176.

Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. 1983. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research* 43: 4382-4392.

Kulle TJ, Cooper GP. 1975. Effects of formaldehyde and Ozone on the trigeminal nasal sensory system. *Arch Environ Health* 30: 237-243.

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

Kuschner M, Nelson N, Snyder CA. 1982. Gaseous formaldehyde and hydrogen chloride induction of nasal cancer in the rat. JNCI 68: 597-603.

Maronpot RR, Miller RA, Clarke WJ, Westerberg RB, Decker JR, Moss OR. 1986. Toxicity of formaldehyde vapor in B6C3F1 mice exposed for 13 weeks. Toxicology 41: 253-266.

Monticello TM, Miller FJ, Morgan KT. 1991. Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subchronic inhalation of formaldehyde. Toxicology and Applied Pharmacology 111: 409-421.

Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leininger JR, Kimbell JS, Seilkop S, Star TB, Gibson JE, Morgan KT. 1996. Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. Cancer Research 56: 1012-1022.

Swenberg JA, Kerns WD, Mitchell RI, Gralla EJ, Pavkov KL. 1980. Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor. Cancer Research 40: 3398-33402.

環境省環境保健部環境リスク評価室、化学物質の環境リスク初期評価(平成9~12年度)、2002年  
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 ホルムアルデヒドの経気道暴露による動物実験の方法

暴露濃度	暴露期間	暴露形態	動物種	発生方法	濃度制御	濃度測定	文献名(施設)
2 ~ 15 ppm	6時間/日、5日/週、18ヶ月	全身暴露 (吸入チャンバー、5 m <sup>3</sup> )	ラット	パラホルムアルデヒドを加熱(54~82℃)	加熱容器の大きさ、加熱温度、流量により調整	赤外分光光度計(0.5時間ごと) Chromotropic acid methodで確認(7-10日ごと)	Swenberg et al., 1980 (CIIT、Battel Columbus)
2 ~ 15 ppm	6時間/日、4日	全身暴露 (吸入チャンバー、391 L)	マウス、ラット	パラホルムアルデヒドを加熱(70~90℃)	加熱容器の大きさ、加熱温度、流量により調整	赤外分光光度計	Chang et al., 1981、1983 (CIIT)
2 ~ 15 ppm	10分間	頭部暴露	マウス、ラット	パラホルムアルデヒドを加熱、テドラバックに集める(3000~3500 ppm)	テドラバックからの流量を調節 0.4 ~ 56 ppm	赤外分光光度計	Chang et al., 1981、1983 (CIIT)
2.0 ~ 14.3 ppm	6時間/日、5日/週、24ヶ月	全身暴露 (吸入チャンバー、5 m <sup>3</sup> )	マウス、ラット	パラホルムアルデヒドを加熱		赤外分光光度計	Kerns et al., 1983 (Battel Columbus、CIIT)
2 ~ 40 ppm	6時間/日、5日/週、13週間	全身暴露 (吸入チャンバー、2.3 m <sup>3</sup> )	マウス	ホルムアルデヒド水溶液(1.8%、W/V)をネフライザーで噴霧		赤外分光光度計	Maronpot et al., 1986 (NIEHS、Battel Pacific NW)
0.7 ~ 15 ppm	6時間/日、5日/週、1日~24ヶ月	全身暴露 (吸入チャンバー、8 m <sup>3</sup> )	ラット	パラホルムアルデヒドを加熱(窒素をキャリアーガスとする)	キャリアーガスの流量により調整	赤外分光光度計(継続モニターし1時間ごとに記録)	Monticello et al., 1991、1996 (CIIT)

表 1(続き) ホルムアルデヒドの経気道暴露による動物実験の方法

暴露濃度	暴露期間	暴露形態	動物種	発生方法	濃度制御	濃度測定	文献名
0.5 ~ 2 ppm (+オゾン)	1時間	頭部暴露	ラット	パラホルムアルデヒドを加熱	混合槽を設置、流量により調整	Chromotropic acid method	Kulle & Cooper.,1975 (Univ. Cincinnati)
14 ppm (+塩化水素)	6時間 / 日、5日 / 週、生涯	全身暴露 (吸入チャンパー、1.5 m <sup>3</sup> )	ラット	パラホルムアルデヒドを加熱 (75 ~ 90°C)	混合槽を設置、流量により調整	Chromotropic acid method (0.5時間ごと)	Albert et al.,1982 (New York Univ.)

表 2 標準ガスの必要量

目標濃度	1 ppm 標準ガス			20 ppm 標準ガス		
	標準ガスの流量/分	必要量/日 (6時間)	1000 L ボンベの暴露可能日数	標準ガスの流量/分	必要量/日 (6時間)	1000 L ボンベの暴露可能日数
1 ppb	0.2 L	72 L	27 日	0.01 L	3.6 L	540 日
10 ppb	2 L	720 L	2.7 日	0.1 L	36 L	54 日
100 ppb	20 L	7200 L	0.27 日	1 L	360 L	5.4 日

1 m<sup>3</sup>の吸入チャンパーを使用し、換気量を12回/時間、6時間/日暴露とした場合



表 3 トルエン標準ガス(100 ppm)の濃度の実測値

ボンベ番号	実測濃度 (ppm)
CQC-335	105
CQC-336	105
CQC-337	104
CQC-338	105
CQC-343	103
CQC-344	105
CQC-345	105
CQC-346	105
CQC-347	105
CQC-348	103
CQC-349	105
CQC-350	105
CQC-351	104

充填圧:8.86 MPa

容器の種類:47 L(アルミ製)

媒体:窒素

表 4 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、およびトルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量(流量)の理論値

目標濃度	70 ppb	200 ppb	700 ppb
吸入チャンバーの換気量(新鮮空気の供給量)の設定値	212 L/分	212 L/分	212 L/分
トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値 *	0.141 L/分	0.404 L/分	1.41 L/分

\*: トルエン標準ガスのラインミキサーへの供給量の理論値(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)

表5-1 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 5-2 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 6 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

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7 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8 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9 吸入チャンバーの換気量、発生装置の設定条件

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

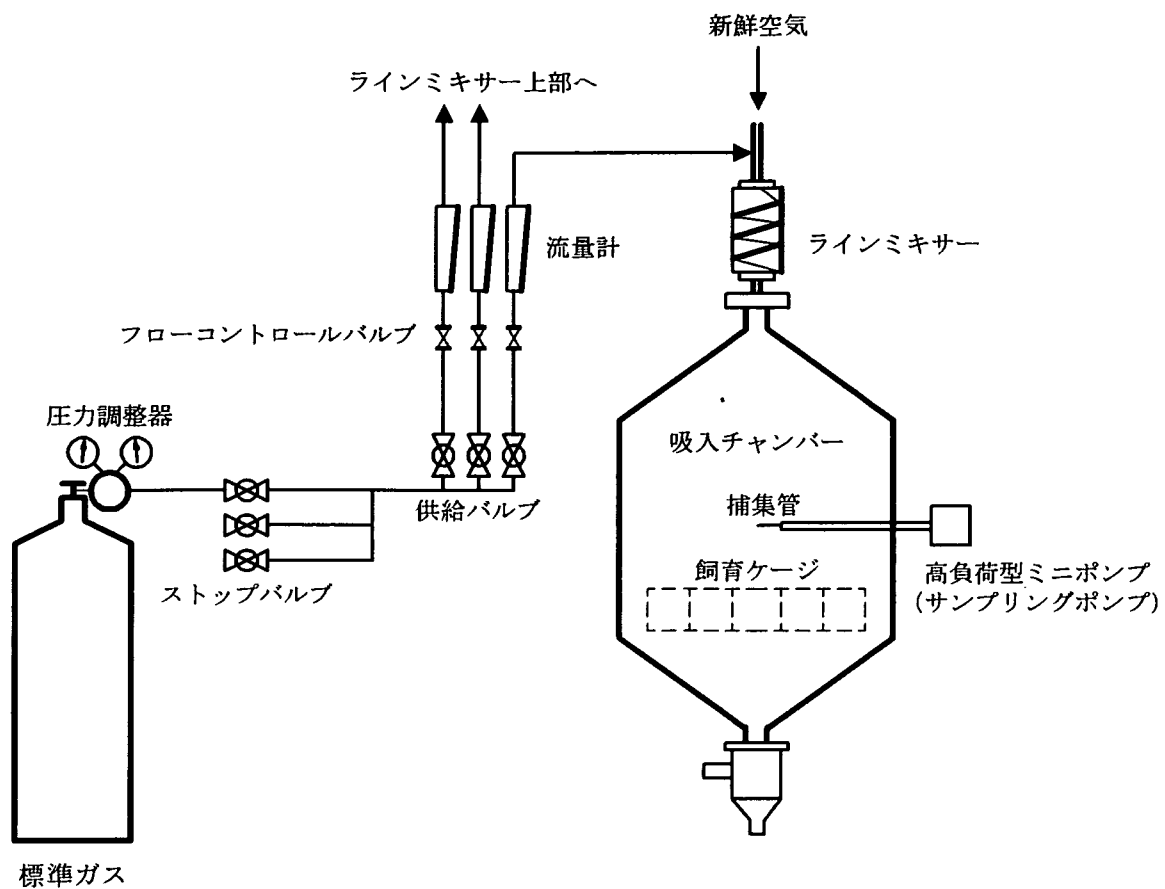


図1 吸入暴露装置のシステム(トルエン、スチレン)

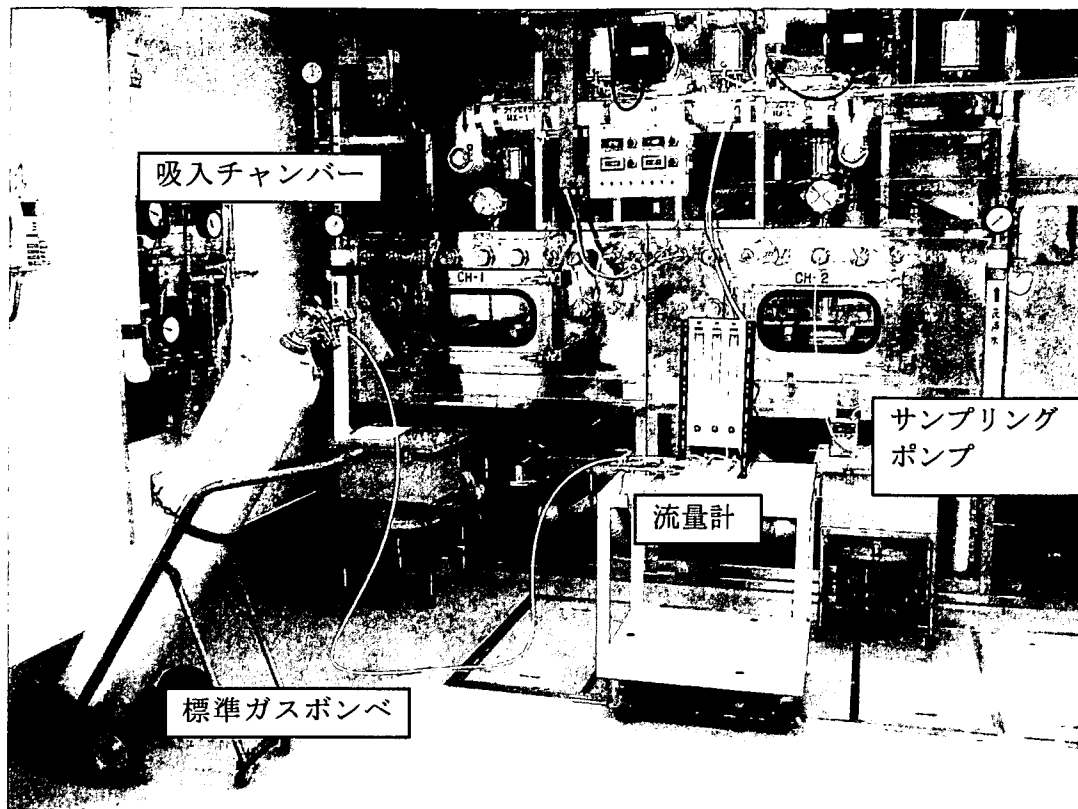


図2 吸入暴露装置の概観

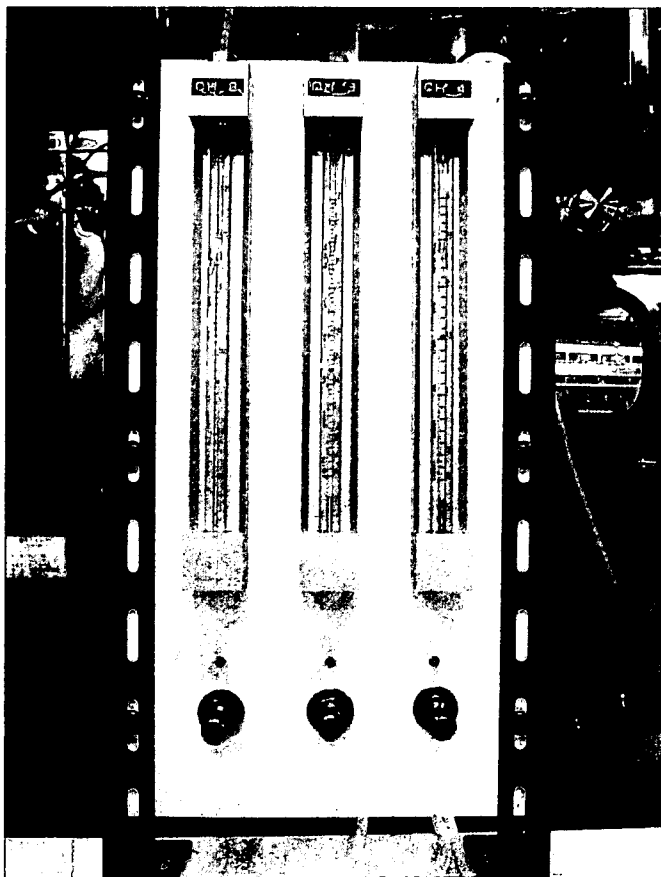


図3 流量計

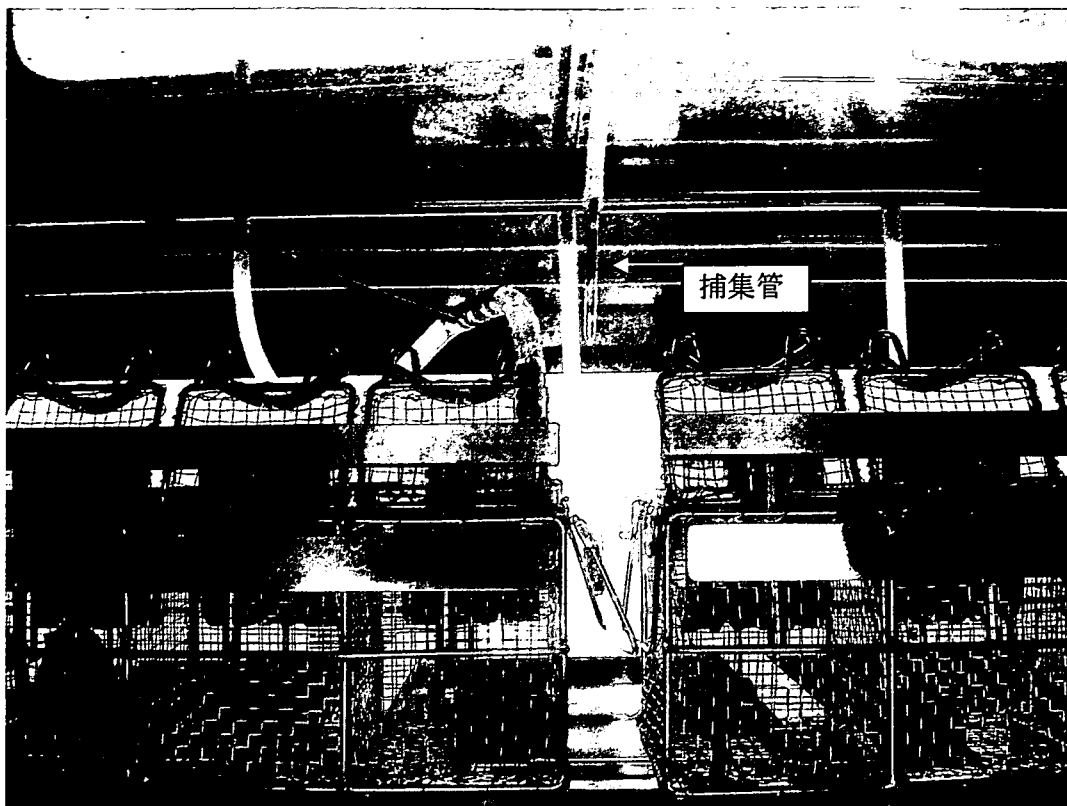


図4 チャンバー内の動物ケージと濃度測定用の捕集管

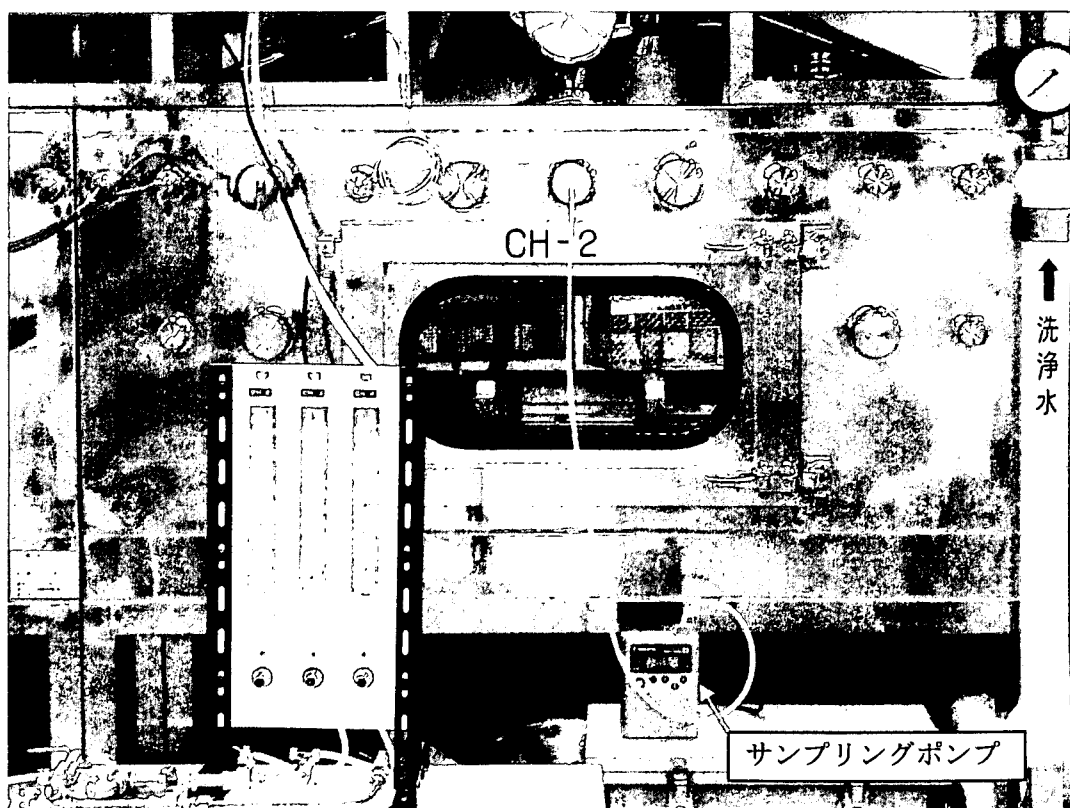


図5 濃度測定用のサンプリングポンプ

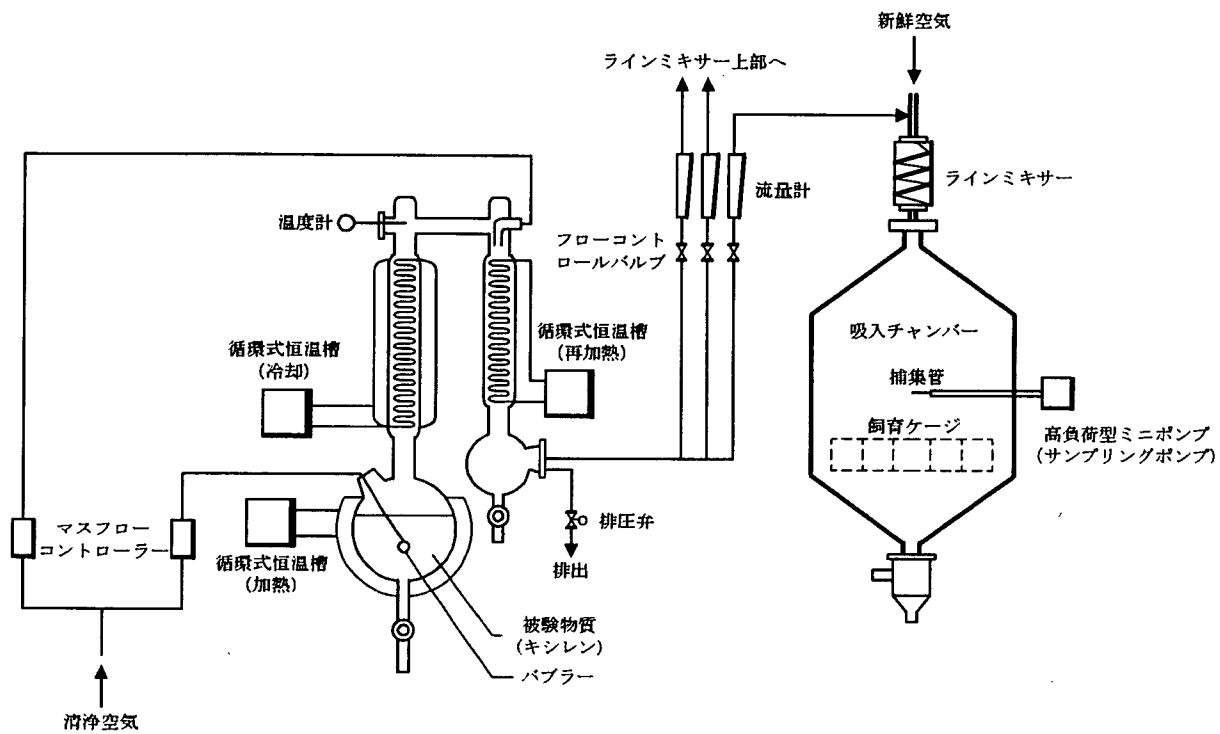


図6 吸入暴露装置のシステム(キシレン)

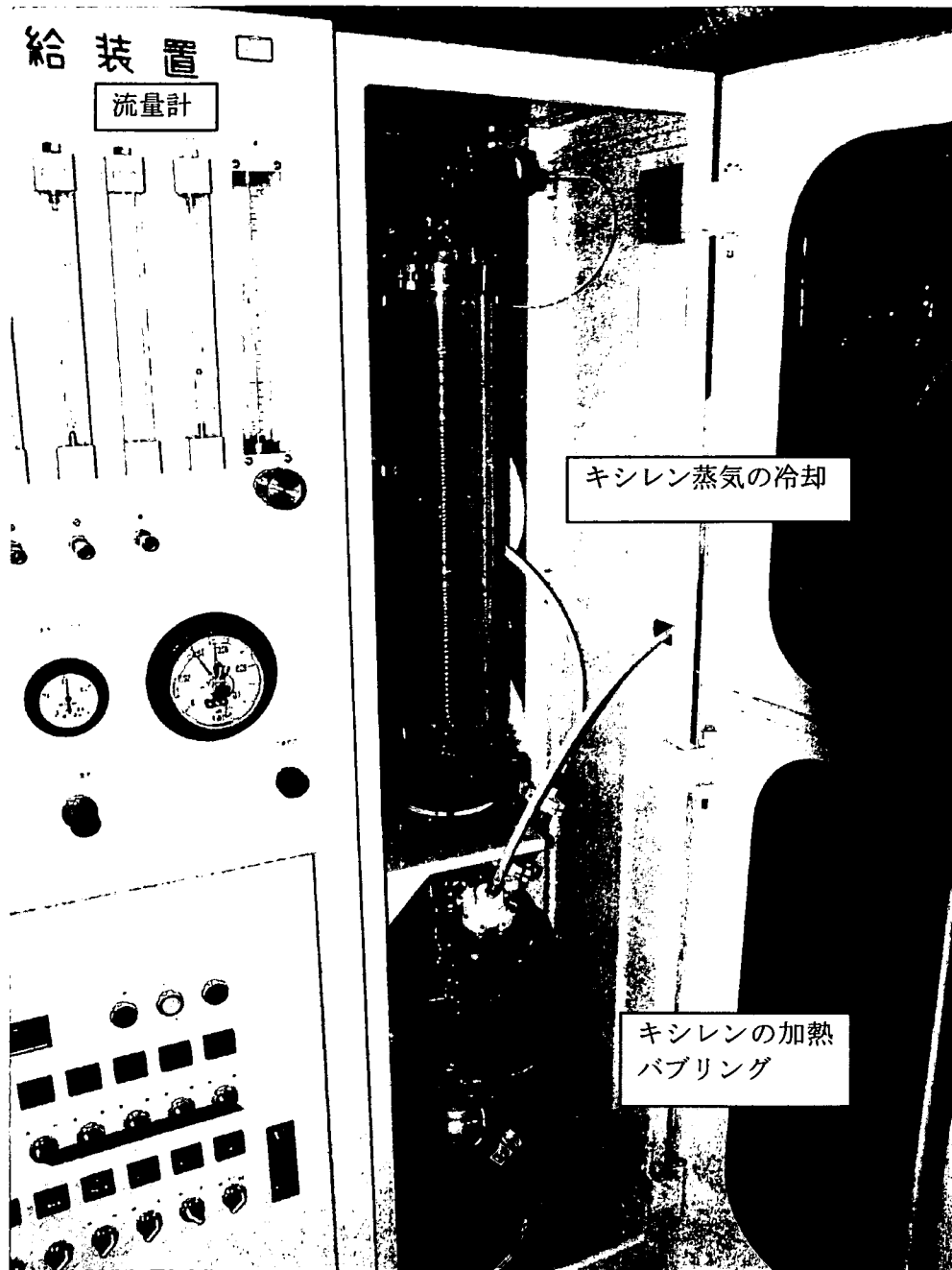


図 7 キシレン蒸気の発生装置



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露に関する研究

分担研究者 辻村 和也

財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

研究要旨

本研究は、室内空気汚染化学物質の吸入暴露によるリスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術(トキシゲノミクス)の構築を通して、日常生活において使用あるいは受動的に暴露される様々な気化性化学物質の安全性評価のために毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速且つ正確な吸入毒性評価システムを作成することを目的に実施した。

その中で重要となるのは、より日常生活濃度レベルでの気化性化学物質の暴露である。シックハウス症候群の原因物質と考えられているホルムアルデヒドの極低濃度吸入暴露方法を検討し、極低濃度(設定濃度 0.03 ppm)において6時間/日、7日間の安定な発生が可能となったことを受け、ヒトでのライフサイクルを考慮して、1日22時間暴露法を検討し、22時間/日、7日間暴露を行った。また、アセトアルデヒドについては6時間/日及び22時間/日、7日間暴露法を検討した。加えて、アレルギー関連物質のひとつである血中ヒスタミンを測定することにより、室内空気汚染化学物質の吸入暴露による影響を検討した。

その結果、ホルムアルデヒドについては、22時間/日x7日間の極低濃度での動物への暴露が可能となった。また、アセトアルデヒドについても、6時間及び22時間/日、7日間の極低濃度(室内濃度指針値 0.03 ppm を含む 0.1 及び 0.3 ppm の3濃度)での暴露が可能になった。

また、各試験における血中ヒスタミン濃度は、空気対照群と比較し、顕著な変動は無かった。

A.研究目的

シックハウス症候群は、様々な要因が複雑に関係していると考えられるが、原因の一つと考えられるホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド等13物質については室内濃度指針値が設定されている。この指針値は、短期暴露時の刺激感覚、長期暴露による神経行動機能、生殖発生及び肝臓・腎臓への影響に基づいて指針値が設定されてい

る。しかし、従来の動物法での症候検出可能濃度とヒトにおいて実際報告されている症候発生濃度には隔たりがある。

本研究では、室内空気汚染化学物質であるホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの長時間低濃度吸入暴露方法を確立するほか、アレルギー関連物質のひとつである生体中ヒスタミンを測定することにより、化学物質の影響を検討した。

## B.研究方法

### 1. ホルムアルデヒド 6 時間/日 x7 日間暴露:

マウス(C57BL/6 12 週齢 雄)を対象としたホルムアルデヒド吸入暴露を実施した。初期設定値として6時間/日の7日間反復暴露実施し、それぞれの日について暴露直後及び18時間後(暴露開始後6時間及び24時間)に肝臓、肺及び血液を遺伝子解析用(肝臓、肺)及びヒスタミン測定用(血液)に採取した。暴露用量は対照群を含み4濃度(対照群, 低濃度群:30 ppb, 中濃度群:80 ppb, 高濃度群:400 ppb)を設定した(計:8群構成、各群3匹)。使用するチャンバーは、全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械株式会社)を用いた。図1に仕様を示す。高濃度及び中濃度群発生法はホルマリン(ホルムアルデヒド約37%、和光純薬工業)50倍希釈液をばっ気することにより発生させた。また、低濃度群は、市販20 ppmホルムアルデヒドボンベ(高千穂商事株式会社)を用いた。発生概略図は図2及び3に示す。

ホルムアルデヒド濃度測定:チャンバー内等の気中ホルムアルデヒド濃度測定は、

市販DNPHカートリッジ(Sep-Pak XPoSure Aldehyde Sampler, Waters)を用いて捕集・誘導体化を行い、アセトニトリルで溶出定容後、DNPH誘導体化ホルムアルデヒドをHPLCで分離、定量した。捕集量22.5 L(1.5 L×15分)とした。

### 2. ホルムアルデヒド 22 時間/日 x7 日間暴露:

マウス(C57BL/6 解剖時12週齢 雄)を対象としたホルムアルデヒド22時間/日、7日間吸入暴露を実施した。暴露時間は、室内環境での暴露形態(24時間)から、動物の飼育作業に要する時間(2時間)を差し引いて、1日22時間(午後0時から翌日午前10時)とした。すなわち、発生開始から終了までの22時間連続暴露した。試験デザインを図6に示す。

暴露用量は空気対照群を含み4濃度(空気対照群, 低濃度群:0.03 ppm, 中濃度群:0.1 ppm,

高濃度群:0.3 ppm)を設定した(遺伝子解析用:16群、ヒスタミン測定用:8群構成、各群3匹)。使用するチャンバーは、全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械株式会社)を用いた。図8に仕様を示す。発生法はホルマリン(ホルムアルデヒド約37%、和光純薬工業)50倍希釈液をばっ気することにより発生させた。発生概略図は図9に示す。また、餌及び水については暴露中も自由摂取とした。

遺伝子解析用の肝臓、肺の採取は、1日間暴露直後、3日間暴露直後、7日間暴露直後及び7日間暴露終了後24時間後の4ポイント行った。ヒスタミン測定用の採血は1日間暴露直後、及び7日間暴露直後の2ポイント採取した。

暴露期間中Day1、3及び7において、発生開始後1、21時間後にチャンバー内の気中ホルムアルデヒド濃度を測定した。また、実験前環境(吸入実験室及び使用する暴露チャンバー)も濃度測定を行った。方法は、市販DNPHカートリッジ(Sep-Pak XPoSure Aldehyde Sampler, Waters)を用いて捕集・誘導体化を行い、アセトニトリルで溶出定容後、DNPH誘導体化ホルムアルデヒドをHPLCで分離、定量するものである。捕集量22.5 L(1.5 L×15分)とした。

暴露期間中は、一般状態観察及び解剖時の体重測定を行った。

ヒスタミン濃度測定は、マウス血漿において酵素免疫測定(ELISA)により行った。

### 3. アセトアルデヒド 6 時間/日 x7 日間暴露:

マウス(C57BL/6 解剖時12週齢 雄)を対象としたアセトアルデヒド6時間/日、7日間吸入暴露を実施した。暴露時間は、1日6時間(午後0時から午後6時)とした。すなわち、被験物質発生開始から終了までの6時間連続暴露した。試験デザインを図7に示す。

暴露用量は空気対照群を含み4濃度(空気対照群, 低濃度群:0.03 ppm, 中濃度群:0.1 ppm, 高

濃度群:0.3 ppm)を設定した(遺伝子解析用:16群、ヒスタミン測定用:16群構成、各群3匹)。使用するチャンバーは、全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械株式会社)を用いた。被験物質の発生は、長時間の安定発生面から、アセトアルデヒド標準ガスを封入したボンベを用いた。ボンベからアセトアルデヒド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、プレ及びHEPAフィルターを通した実験室内空気と混合・希釈することにより、設定濃度のアセトアルデヒドを吸入チャンバーに発生させた。アセトアルデヒド標準ガス(100及び1,000 ppm)のラインミキサーへの供給量は、吸入チャンバー内のアセトアルデヒド濃度を測定し、その濃度データをもとに設定濃度になるように流量計を用いて調節した。発生概略図を図10に示す。

遺伝子解析用の肝臓、肺の採取は、1日間暴露終了直後(午後6時)及び翌日(午前10時)、3日間暴露終了翌日(午前10時)、7日間暴露終了翌日(午前10時)の4ポイント行った。ヒスタミン測定用の採血は1日間暴露終了直後(午後6時)及び翌日(午前10時)、7日間暴露終了直後(午後6時)及び翌日(午前10時)の4ポイント採取した。

チャンバー内等の気中アセトアルデヒド濃度測定は、ホルムアルデヒドと同様に市販DNPHカートリッジ(Sep-Pak XPoSure Aldehyde Sampler、Waters)を用いて捕集・誘導体化を行いHPLCで分離、定量した。測定ポイントは、暴露期間中Day1、3及び7において、発生開始後1、3及び5時間後とした。

ヒスタミン濃度測定は、マウス血漿において酵素免疫測定(ELISA)により行った。

#### 4. アセトアルデヒド 22時間/日x7日間暴露:

マウス(C57BL/6 解剖時12週齢雄)を対象としたホルムアルデヒド22時間/日、7日間吸入暴露を実施した。暴露時間は、室内環境での暴露

形態(24時間)から、動物の飼育作業に要する時間(2時間)を差し引いて、1日22時間(午後0時から翌日午前10時)とした。すなわち、発生開始から終了までの22時間連続暴露した。

暴露用量は空気対照群を含み4濃度(空気対照群、低濃度群:0.03 ppm、中濃度群:0.1 ppm、高濃度群:0.3 ppm)を設定した(遺伝子解析用:16群、ヒスタミン測定用:8群構成、各群3匹)。使用するチャンバーは、全身暴露型チャンバー(トキワ科学器械株式会社)を用いた。被験物質の発生は6時間暴露と同様に、アセトアルデヒド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、プレ及びHEPAフィルターを通した実験室内空気と混合・希釈することにより、設定濃度のアセトアルデヒドを吸入チャンバーに発生させた。

遺伝子解析用の肝臓、肺の採取は、1日間暴露直後、3日間暴露直後、7日間暴露直後及び7日間暴露終了後24時間後の4ポイント行った。ヒスタミン測定用の採血は1日間暴露直後、及び7日間暴露直後の2ポイント採取した。

チャンバー内等の気中アセトアルデヒド濃度測定は、先のホルムアルデヒド22時間/日、7日間暴露と同様に定量した。

ヒスタミン濃度測定も、先の試験と同様に行った。

#### 5. ヒスタミン濃度測定:

マウス血漿に於いて酵素免疫測定(ELISA)により、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)の単回強制経口投与でのヒスタミン濃度を測定した。使用動物は、マウス(C57BL/6 12-13週齢雄)を対象とし、投与量は、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドについては、3、30、150 or 300 mg/kg、トルエン及びキシレンにおいては10、100、1000 mg/kgとした。採血は、投与後2時間とし、腹部大静脈から行った。

(倫理面への配慮)

動物愛護を考慮し、試験実施においても倫理面を配慮した実験動物の取り扱いを行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 低濃度吸入暴露法の確立

#### 1.1 分析手法の確立及び実験環境下のホルムアルデヒド濃度確認

発生法検討に先立ち、気中ホルムアルデヒド分析手法の確立及び実験環境下の潜在的に存在するホルムアルデヒド濃度の確認を行った。

その結果、気中ホルムアルデヒド分析手法が確立された。分析条件を表 1 に示す。また、操作ブランク(n=3)から算出した定量限界値は、0.941 ppb (22.5 L サンプルング)であった。本研究においては 1 ppb を定量限界値と設定した。

次に、実験環境下における潜在的ホルムアルデヒド濃度の測定を行った。その結果を表 2 に示す。吸入実験室内、アイソレーションラック内(動物無・マウス飼育)及び屋外濃度は、それぞれ、1.61 ppb、1.89 ppb、1.95 ppb 及び 2.00 ppb であり室内においても屋外と同程度のホルムアルデヒド濃度であった。

また、換気流量を変化させた時の全身暴露チャンバー内濃度は、換気流量が増えるに従い、減少傾向が見られ、換気流量 300 L/分 15 分換気が最低濃度を示した。本条件(換気流量 300 L/分 15 分)で処理後の各全身暴露チャンバー内ホルムアルデヒド濃度を見てみると、4.95~9.08 ppb であった。

次に、室内吸気 HEPA フィルター前に市販活性炭フィルターを設置し、その効果を確認した。この処理によるチャンバー内ホルムアルデヒド濃度に大きな変動はみられなかった。

#### 1.2 発生法検討

室内濃度指針値である 80 ppb 及び日本化学会誌防災指針、厚生省「住宅建建材ガイドライン」

(表 3)を参考に発生目標濃度を中濃度群:80 ppb、高濃度群: 400 ppb とし、発生条件の検討を図 2 に示した装置を用い行った。発生条件は、3 L/分及び 0.7 L/分の発生流量でばっ気、換気流量 300L/分、ウォーターバス温度及び冷却管温度をそれぞれ約 30°C 及び 20°C に制御した。発生後 0.5、1 時間の濃度測定を行った。中濃度及び高濃度それぞれ平均 75.4 ppb 及び 437 ppb の発生が可能であった。一方、低濃度群に於いては実験環境濃度を参考に目標濃度をチャンバー内バックグラウンド濃度の約 3 倍の 30 ppb とした。低濃度の発生には 20 ppm に濃度制御されたホルムアルデヒドポンペを用いた(図 3)。暴露チャンバーへの流量を 0.4 L/分に制御した。換気流量は 300 L/分で行った。発生後 0.5 時間、1 及び 3 時間の濃度は、それぞれ 20.8 ppb、30.2 ppb 及び 22.7 ppb(平均 24.6 ppb)であった。

次に同じ発生条件下で、高濃度群及び低濃度群について、マウス 12 匹/群、6 時間の単回暴露を行い、発生後 1、3、6 時間に於ける発生濃度の確認を行った。図 4 にサンプルング位置を示す。高濃度群における平均濃度は 464 ppm であった。一方、低濃度群では、平均濃度 34.7 ppm であった。それぞれのデータは、表 4 に示した。

#### 1.3 ホルムアルデヒド 7 日間反復吸入暴露

1.2 で設定した条件で、7 日間の反復暴露を行った。試験デザインを図 5 に示す。又、発生濃度については、Day 1、3 及び 7 に於いて、発生開始後 1、3 及び 5 時間後にサンプルングを行い、実測定を行った。濃度監視に於いては、検知管を用いた。その結果、各濃度群における実測濃度の平均値は、低濃度群:27.5±0.681 ppb(設定値 30 ppb)、中濃度群:96.8±38.1 ppb(設定値 80 ppb)及び高濃度群:450±31.4 ppb(400 ppb)であった。これらの結果から、6 時間/日、7 日間の安定な発生が可能となった。