

図 3 吸入装置のシステム

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

経気道曝露モデルに対応した化学物質のヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響

研究分担者 慶長直人

国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部 部長

研究協力者 松下育美 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部
土方美奈子 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部

研究要旨

ヒトの肺は常に、外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、このような状況に、吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が惹起される可能性がある。そこで、ヒト気道上皮細胞株を用いて、細菌性リポ多糖ないし poly IC の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を検討した。その結果、定量 RT-PCR の系で、ホルムアルデヒドによる炎症性サイトカインの遺伝子発現増強効果が認められた。

A. 研究目的

ヒトの肺は常に、外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、このような状況に、吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が誘発される可能性がある。これまで、文献上、揮発性有毒物質であるホルムアルデヒドの曝露により、気道上皮細胞系の炎症応答が増強される可能性が知られている。そこで、ヒト気道上皮細胞株を用いて、細菌性リポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) ないし poly IC の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホ

ルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を定量 RT-PCR の系で検討した。また、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン類を、ELISA にて測定した。

B. 研究方法

「刺激物質」
外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、作用機作がよく検討されており、構造の単純な、LPS 及び Poly I:C を選択した。

「細胞」

ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 及びヒト肺がん様癌化細胞株 A549 を用い、培養、予備実験を行った。

「培養および刺激」

細胞株を 25cm² フラスコで培養し (5 × 10⁵ cells/flask)、90% confluent で LPS (10 ng/ml, 100 ng/ml), Poly I:C (1 μg/ml, 10 μg/ml) の刺激を加え、24 時間後に formaldehyde (100 μM, 200 μM) を添加、さらに 3 時間後に細胞を回収、RNA を抽出し、定量的 RT/PCR を実施した。

予備実験として、マーカーとなる発現遺伝子として、IL-8 を選択した。また適宜、CCL5, TNF, TLR4 遺伝子についても選択して、実験を行った。

タンパク発現については、ELISA 系により (Multi-Analyte ELISArray Kit : SABiosciences)、培養上清中の 12 種類のサイトカイン (IL8, MCP-1, RANTES, MIP-1a, MIP-1b, IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin, TARK, MDC, GROa) を同時測定した。

(倫理面への配慮)

現時点で個人に由来するヒト検体を用いおらず、公に入手される細胞株のみを用いている。

C. 研究結果

「モデルとなる細胞株の選択」

ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 及び A549 を用

い、LPS, Poly I:C の刺激下で培養、予備実験を行った結果、A549 に比べ、BEAS2B 細胞では、著しい刺激応答性が観察された。また、シックハウス症候群の主要症状のひとつに、喘息の誘発があるところから、気道系の上皮細胞のモデルである、BEAS2B 細胞を以下の実験で用いた。

「ホルムアルデヒドの濃度の検討」

各種刺激 24 時間後に Formaldehyde (1 μM, 10 μM, 100 μM) を添加、3 時間後に細胞を回収、IL-8 の RT/PCR を実施し、ホルムアルデヒドの濃度依存性を検討したところ、図 1 のごとく、Poly I:C (10 μg/ml) 存在下で、ホルムアルデヒド 10 μM 以上で、再現性よく (3 回)、IL-8 mRNA の発現亢進が観察された (図 1)。

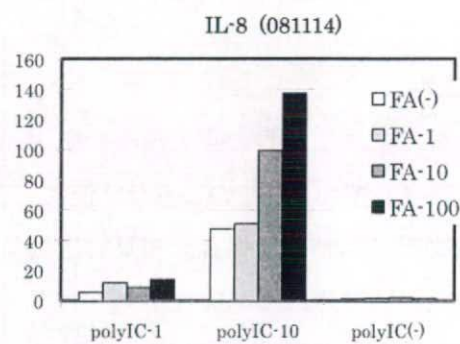


図 1 Poly I:C (1, 10 μg/ml) 存在下、ホルムアルデヒド (1 μM, 10 μM, 100 μM) 添加後、3 時間の IL-8 mRNA の定量的 RT-PCR による測定。

「上清中のサイトカインの測定」

IL-8 mRNA の増強が認められた培養細胞上清を ELISA にて検討した。BEAS-2B 細胞では、Poly I:C 刺激後 IL-8, RANTES, MIP-1a, IP-10, GROa の顕著な発現亢進が認められたが、このホルムアルデヒド短時間刺激条件下では、さらなる顕著なサイトカインの濃度差は生じなかった。

「長期低濃度曝露」

低濃度で長期曝露した場合、短期高濃度曝露と比較して、より生理的な条件に近いものと思われるため、別の系として検討した。同様な条件の細胞に Poly I:C の刺激を加え、24 時間後に、低濃度 formaldehyde (1 μ M, 10 μ M) を添加した培地 70 ml でフラスコ内を満たし培養を続け、8, 24 時間後に細胞を回収、RT/PCR による検討を行った。しかしながら、この条件下では、IL-8, TLR-4 の二つの遺伝子とも、ホルムアルデヒド 10 μ M 以下で、明らかな遺伝子発現の変化は認められなかった。

D. 考察

経気道曝露モデルに対応した化学物質によるヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響について、

1. 培養ヒト気道上皮細胞に対する毒性化学物質の曝露系を確立する。
2. 毒性化学物質によるヒト気道上皮細胞を用いた遺伝子発現応答様式を解析して、吸入曝露モデルにより得られた遺伝子発

現様式と比較検討する。

3. 遺伝子発現応答様式の対比から、ヒト気道上皮を用いた化学物質の最適な毒性評価系を明らかにする。
- を目標に掲げている。

今回、1. の研究の端緒として、ホルムアルデヒドのヒト気道上皮細胞への影響を、初めて、株化細胞である BEAS-2B 株により、確認し、特に poly I:C の低濃度曝露で、特に好中球や TH-1 系リンパ球の遊走に関わるケモカイン、IL-8, GRO, IP-10 等が顕著に誘導されること、特に IL-8 mRNA 発現をホルマリンが誘導することを確認した。しかしながら、この 10 μ M の濃度は、比較的高い濃度であるため、さらに低濃度長期曝露、ないし、ホルムアルデヒド低濃度刺激下での、poly I:C によるサイトカインの誘導を検出するなどの工夫が必要であると思われる。

当施設では、呼吸器外科との共同研究により、連結不可能匿名化された、ヒト初代継代気管支上皮細胞の凍結保存品を 200 サンプル以上、保有しており (図 2)、最適な系が確立したら、株化細胞のみならず、これらの正常細胞でも同様の現象が見られるか否かを検討する予定である。

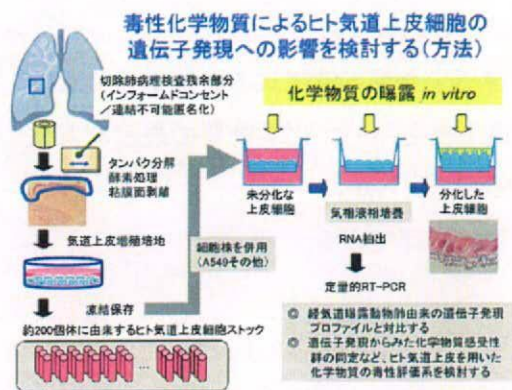


図2 ヒト初代気道上皮細胞のストック

E. 結論

細菌性リポ多糖ないし poly IC の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を検討した。ヒト気道上皮細胞株では、ホルムアルデヒドによるケモカインの遺伝子発現増強効果が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey BC, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects. *Blood*. 12;113(11):2547-56, 2009

Vollstedt S, Yuliwulandari R, Okamoto K, Lien LT, Keicho N, Rochani JT, Wikaningrum R, Tokunaga K. No evidence

for association between the interferon regulatory factor 1 (IRF1) gene and clinical tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 89(1):71-6, 2009

Mahasirimongkol S, Yanai H, Nishida N, Ridruechai C, Matsushita I, Ohashi J, Summanapan S, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Chaiprasert A, Manosuthi W, Kantipong P, Kanitwittaya S, Sura T, Khusmith S, Tokunaga K, Sawanpanyalert P, Keicho N., Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. *Genes Immun* 10(1):77-83, 2009

Nishiyama A, Wakasugi N, Kirikae T, Quy T, Ha le D, Ban VV, Long HT, Keicho N, Sasazuki T, Kuratsuji T., Risk factors for SARS infection within hospitals in Hanoi, Vietnam. *Jpn J Infect Dis*. 61(5):388-90, 2008

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

吸入暴露影響の網羅的遺伝子発現解析、経口暴露との対比による
評価・優先順位付けの網羅性の向上

研究分担者 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・部長

研究要旨

本研究は、昇華性化学物質の極低濃度経気道暴露による肺と肝に於ける遺伝子発現変化を解析し、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ている。本年度は昇華性化学物質パラジクロロベンゼン（指針値0.04ppm、暴露目標値0.04、0.12、0.40ppm）とテトラデカン（指針値0.04ppm、暴露目標値0.04、0.12、0.40ppm）の経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）を行い、両物質につき、2時間単回暴露（2、4、8、24時間後）、6時間/日×7日間暴露（6、22、70、166時間後）と22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）を検討し、マウス肺、肝の網羅的遺伝子発現データを解析した。その結果、両物質共に極低濃度暴露によっても、肺及び肝、双方に於いてシグナル伝達に関わる比較的多数の遺伝子発現変動が認められ、また肺と肝では遺伝子発現プロファイルが異なること、加えて、パラジクロロベンゼンでは、肺ではグルタチオンペルオキシダーゼ等の酸化ストレス応答遺伝子の発現誘導が、肝ではミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現誘導が、6時間暴露よりも22時間暴露時の方が強いなど、同じ化学物質でも暴露時間が異なると遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなった。このように、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、網羅的遺伝子発現解析手法により昇華性化学物質の低濃度経気道暴露によって生じる生体反応変化を予測することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究は、化学物質リスク評価法の基盤整備として、日常生活に於いて使用あるいは受動的に暴露される様々な化学物質の安全性確保の為に毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速、定量的、且つ、高精度な吸入毒性評価システムを構築することを目

的とする。特に、シックハウス症候群の様に、人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極低濃度吸入毒性への理論的及び現実的な対応を包含することを目指すものである。

先行3年間研究（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))に於いて、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる13物質の内、ホルマリン、トルエンなど6種の気化性物質について同検討会・室内指針値付近の極低濃度に於ける暴露実験を実施し、肺及び肝の網羅的遺伝子発現変動解析によるデータの蓄積及び、インフォマティクス解析により低濃度吸入毒性の特性を示唆する生物学的に興味深い所見が得られている。本研究では、先行研究の成果を踏まえ、上記13物質の内、昇華性化学物質の極低濃度吸入暴露実験の実施と、肺を主体とした遺伝子発現変動解析及びデータベース構築を推進する。今年度は、パラジクロロベンゼンとテトラデカンにつき検討した。

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で一晩浸漬し、RNase を不活化する。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 の不活化を促した後、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 μ 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 μ g を取り、Affymetrix 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

本年度はパラジクロロベンゼンとテトラデカンについてデータ解析を進めた。C57BL/6CrSlc マウスに経気道暴露 (4 用量にて、2 時間単回暴露 (2、4、8、24 時間後)、6 時間/日×7 日間暴露 (6、22、70、166 時間後)、22 時間/日×7 日間暴露 (22、70、166、190 時間後)させた際の肺と肝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。パラジクロロベンゼン:0.04ppm に対し 0.04、

0.12、0.40ppm、テトラデカン：0.04ppm に対し、0.04、0.12、0.40ppm。得られた肺、肝について、我々が開発した 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。遺伝子発現変動を、我々が開発した「Rsort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフに於いて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。また、シグナルパスウェイの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

C-1: パラジクロロベンゼン極低濃度経気道暴露時の遺伝子発現変動解析:

以下に、2 時間単回暴露、6 時間/日×7 日間暴露と 22 時間/日×7 日間暴露、それぞれについて、肺と肝に於ける解析結果を示す。

C-1-1: パラジクロロベンゼン [2 時間単回暴露]の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

サンプリングは終了しており、今後、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

C-1-2: パラジクロロベンゼン [2 時間単回暴露]の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

サンプリングは終了しており、今後、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

C-1-3: パラジクロロベンゼン [6 時間/日×7 日間暴露]の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が、有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 534 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 32 ps が見いだされた。IPA による検討の結果、生体機能のカテゴリーとして、Organismal injury and abnormalities 及び Respiratory disease 等が抽出されてきたが、これに関与するシグナル分子を検討した結果、両者ともに炎症に関与し得る F13a1 (coagulation factor XIII, A1 subunit), (70h 後) Hmox1 (heme oxygenase (decycling) 1) (6h 後), Ahr (Aryl hydrocarbon receptor) (166h 後) が見いだされた。またシグナルパスウェイとしては、Wnt/ β -catenin signaling 及び NRF2-mediated oxidative stress response 等が抽出されてきたが、これに関与するシグナル分子を検討した結果、前者では Sox11 (166h 後) と Axin2 (166h 後) が、後者では Hmox1 (6h 後) が見いだされた。

したがって、F13a1, Hmox1, Ahr が関与する、血液凝固系への影響など肺の炎症が誘発されている可能性が示唆された。他方、Sox11 の機能は不明であり本実験に於ける発現上昇の意味付けは困難であるが、Sox 遺伝子ファミリーは発生に関与しており、この点、興味深い。なお Ahr に関しては、下流の Cyp1a1 遺伝子の発現変動が認められないことから、ダイオキシン受容体を介

したシグナルカスケードが活性化している可能性は低いものと考えられた。

C-1-4: パラジクロロベンゼン [6 時間/日×7 日間暴露]の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 670 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 28 ps が見いだされた。

このうち「肺」での解析時と共通して変動した遺伝子は認められなかった。「肝」では、Wnt シグナルに関与する Wnt7a (6h 後) 及び受容体と考えられる Fzd6 (22h 後)、Fzd5 (166h 後)の発現増加が認められた。したがって、肝では Wnt シグナルが影響される可能性が示唆された。この肝での障害や病態との関連は現時点で不明であり、検索中である。

C-1-5: パラジクロロベンゼン[22 時間/日×7 日間暴露]の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が、有意(t 検定での P 値<0.05)に発現が増加するものとして 228 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 33 ps が見いだされた。IPA による検討の結果、生体機能のカテゴリーとして、Cancer 及び Immunological disease 等が抽出されてきたが、これに関与するシグナル分子を検討した結果、Gpx2 (glutathione peroxidase 2) (22, 70, 166, 190h 後), Clqbp(complement component 1, q subcomponent binding protein)(166h 後), Apoe (166, 190h 後), Fus (fusion, derived

from t(12;16) malignant liposarcoma) (22h 後)が見いだされた。またシグナルパスウェイとしては、Glutathione metabolism 及び NRF2-mediated oxidative stress response 等が抽出されてきたが、これに関与するシグナル分子を検討した結果、Gpx2 (22, 70, 166, 190h 後), Gsta2 (glutathione S-transferase alpha 2) (22h 後), Gsta4 (166h 後), Gstm1 (166h 後)が、また後者ではこれに加えて Aox1 (aldehyde oxidase 1) (22, 70, 166h 後)が見いだされた。これらの遺伝子の発現増加は、用量依存的であった。

このうち代表例として Gpx2 遺伝子について、その発現変化を示す(図 1)。図は、下記のように濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。

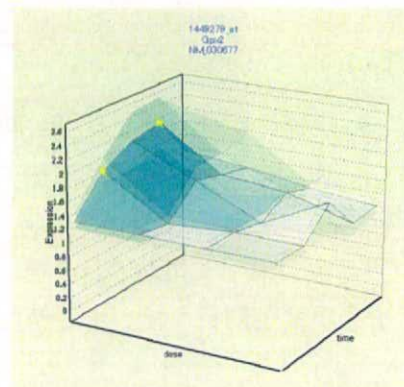


図 1 Gpx2 (glutathione peroxidase 2) の遺伝子発現変動

以上のことから、肺に於いて、多くのグルタチオン関連分子が変動しているため、この分子種が関与する酸化ストレス応答が用量依存的に引き起されていることが示唆された。パラジクロロベンゼンの指針値は0.04ppmであり、暴露目標値は0.04、0.12、0.40ppmであることから、指針値レベルより用量依存的に発現変動していることとなる。

C-1-6: パラジクロロベンゼン[22時間/日×7日間暴露]の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が、有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして1,081 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして165 psが見いだされた。

IPAによる検討の結果、シグナルパスウェイとして、Mitochondrial dysfunction、Oxidative phosphorylation 等が抽出されてきたが、これに関与するシグナル分子を検討した結果、Cox8a(cytochrome c oxidase, subunit VIIIa)(70h後)、Ndufa(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subunit 4)(70h後)、Sdhb(succinate dehydrogenase complex, subunit B, integral membrane protein)(70h後)などであった。その他、発現誘導が顕著な遺伝子として、Sox4(70, 166, 190h後)、Sox18(70, 166h後)、Atf4(190h後)、Slc25a25(190h後)などの遺伝子が見いだされたが、いずれも肝障害性との関連は現時点では不明であった。

このうち代表例として Sdhb 遺伝子及び Slc25a25 遺伝子について、その発現変化を示す(図2, 3)。

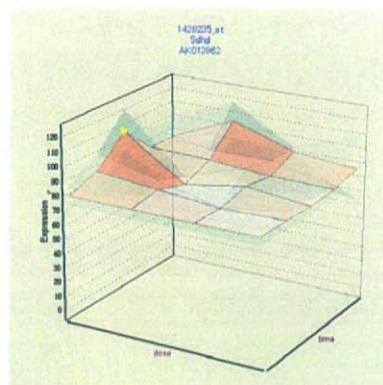


図2 Sdhb (succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein)の遺伝子発現変動

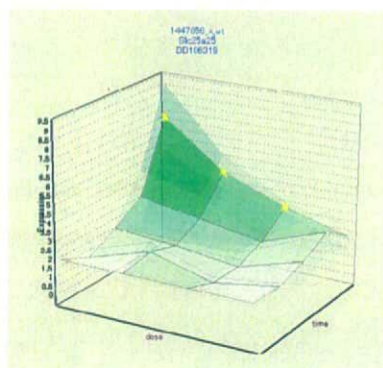


図3 Slc25a25 (solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25)の遺伝子発現変動

以上のパラジクロロベンゼン極低濃度経気道暴露時の解析結果から、22時間/日での暴露時に、肺に於いて発現が変動する遺伝子は、6時間/日暴露時のものとは異なること、肺ではグルタチオンペルオキシダーゼ等の酸化ストレス応答遺伝子の発現誘導が、肝ではミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現誘導が、6時間暴露よりも22時間暴露の方が強いなど、同じ化学物質でも暴露時間が異なると遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなった。

ミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現誘導は、脱共役作用の結果、細胞内 ATP の減少や酸化ストレスが引き起される可能性が示唆された。

C-2: テトラデカン極低濃度経気道暴露時の遺伝子発現変動解析:

以下に、2 時間単回暴露、6 時間/日×7 日間暴露と 22 時間/日×7 日間暴露、それぞれについて、肺と肝に於ける解析結果を示す。

C-2-1: テトラデカン [2 時間単回暴露] の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

有意(t 検定での P 値<0.05)に発現が増加するものとして 407 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 29 ps が見いだされた。IPA による検討ではシグナルパスウェイは見いだせなかった。また、肺の障害、病態に直接関与することが示唆される遺伝子は現時点で見いだされなかった。

C-2-2: テトラデカン [2 時間単回暴露] の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

有意(t 検定での P 値<0.05)に発現が増加するものとして 529 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 69 ps が見いだされた。このうち「肺」での解析時と共通して変動した遺伝子は認められなかった。IPA による検討ではシグナルパスウェイは見いだせなかった。また、肺の障害、病態に直接関与することが示唆される遺伝子は現時点で見

だされなかった。

C-2-3: テトラデカン [6 時間/日×7 日間暴露] の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

有意(t 検定での P 値<0.05)に発現が増加するものとして 209 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 62 ps が見いだされた。IPA による検討の結果、生体機能のカテゴリーとして、Nervous system development and function 及び Cellular movement 等が抽出されてきたが、これに関与するシグナル分子を検討した結果、両者共に、Bdnf (70, 166, 190 後), Hlx (190h 後)が見いだされた。しかし、肺組織に於けるこれらの分子の機能は現時点で不明である。またシグナルパスウェイとしては、Neutrophin/TRK signaling 等が抽出されたが、関与するシグナル分子を検討した結果、Bdnf であった。この他、Sox11 の増加(190h 後)が認められた。

したがって、肺の障害、病態に直接関与することが示唆される遺伝子は現時点で見いだされなかった。

C-2-4: テトラデカン [6 時間/日×7 日間暴露] の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 1,339 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 208 ps が見いだされた。肺と肝で共通して変動する遺伝子は見いだせなかった。IPA によるシグナルパスウェイ解析の結果、IGF-1 signaling に関与する

遺伝子が主として抽出されてきたが、肝の障害、病態の観点から現在解析中である。

C-2-5: テトラデカン [22時間/日×7日間暴露]の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

有意(t検定でのP値<0.05)に発現が増加するものとして517 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして23 psが見いだされた。例えば、Aldh1a2(70h後)の増加が認められたが、障害、病態に関連することが示唆される遺伝子はIPAによる検索でも見いだせなかった。

C-2-6: テトラデカン [22時間/日×7日間暴露]の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして406 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして57 psが見いだされた。

肺と肝で共通して変動する遺伝子は見いだせなかった。アポトーシスやp53 signalingに参与するGadd45a(22h後)が見いだせたが、それ以外に、障害、病態に関連することが示唆される遺伝子は見いだせなかった。

以上のテトラデカンの極低濃度経気道暴露時の解析結果から、各暴露時間につき、肺と肝で共通して変動する遺伝子は見いだせなかった。障害、病態に関連することが示唆される遺伝子の顕著な発現変動は現時点では見いだせず、引き続き検索中である。また肝では、反復暴露により発現誘導が減

弱する遺伝子(Adk:adenosine kinase, Arf6: ADP-ribosylation factor 6)が認められた。

D. 結論

本年度は昇華性化学物質パラジクロロベンゼン(指針値0.04ppm、暴露目標値0.04、0.12、0.40ppm)とテトラデカン(指針値0.04ppm、暴露目標値0.04、0.12、0.40ppm)の経気道暴露(4用量、16群構成、各群3匹)を行い、両物質につき、2時間単回暴露(2、4、8、24時間後)、6時間/日×7日間暴露(6、22、70、166時間後)と22時間/日×7日間暴露(22、70、166、190時間後)を検討し、マウス肺、肝の網羅的遺伝子発現データを解析した。

その結果、両物質共に極低濃度暴露によっても、肺及び肝、双方に於いてシグナル伝達に関わる比較的多数の遺伝子発現変動が認められ、また肺と肝では遺伝子発現プロファイルが異なること、加えて、パラジクロロベンゼンでは、肺ではグルタチオンペルオキシダーゼ等の酸化的ストレス応答遺伝子の発現誘導が、肝ではミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現誘導が、6時間暴露よりも22時間暴露時の方が強いなど、同じ化学物質でも暴露時間が異なると遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなった。ミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現誘導は、脱共役作用の結果、細胞内ATPの減少や酸化的ストレスが引き起される可能性が示唆された。一般的にフェノールのハロゲン化物にはミトコンドリアでの酸化的リン酸化の脱共役作用が認められるが、パラジクロロベンゼンの電子伝達系への影響に関する報告は見いだせず、

毒性学的に興味深い。テトラデカンでは、反復暴露により発現が減弱する遺伝子が肝でみとめられた。

22 時間暴露時の肺での酸化的ストレス応答は、パラジクロロベンゼン指針値レベルより用量依存的に増加していることが明らかとなった。

このように、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、網羅的遺伝子発現解析手法により昇華性化学物質の低濃度経気道暴露によって生じる生体反応変化を予測することが可能であることが示唆された。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、今後も、昇華性物質につき、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ものと考えられた。

E. 研究発表

1. 書籍等

菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、種村健太郎、小川幸男、児玉幸夫、関田清司、Percellome Project、遺伝子医学 MOOK10、DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実際、油谷浩幸編集、株式会社メディカルドウ、p363-371、2008 年 6 月 30 日

菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司、トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析、非臨床試験ーガイドラインへの対応と新しい試みー 野村護、堀井郁夫、吉田武美編集、株式会社エル・アイ・シー、p561-568、2008 年 9 月 30 日

2. 学会発表

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 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26 日、東京、口演

北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京、口演

五十嵐勝秀、小川幸男、笠井辰也、長野嘉介、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純、シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化の Percellome 解析、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 28 日、東京、ポスター

菅野 純、Percellome 遺伝子発現解析標準化及び解析手法、第 11 回癌治療増感研究シンポジウム、2009 年 2 月 14 日、奈良

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

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

研究分担者 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
	佐々木俊明	日本バイオアッセイ研究センター・吸入試験室
	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、パラジクロロベンゼンとテトラデカンを対象として室内濃度指針値（ともに40 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、パラジクロロベンゼンは固体を加熱・昇華させる方法、テトラデカンは加熱バブリング法により気化させる方法により40、120及び400 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。

これまでの研究で、生活環境中に存在し、人が経気道的に暴露される可能性が

ある化学物質であるトルエン、スチレン及びキシレン（混合キシレン）を対象として、極低濃度レベルで動物（マウス）に吸入暴露できる吸入暴露方法の開発を行ってきた。その結果、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である70、200及び700 ppbの吸入暴露を行うことができた。また、スチレンについても、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

露濃度である50、150及び500 ppbの吸入暴露を行うことができた。キシレン（混合キシレン）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する方法を試み、室内濃度指針値である200ppbを考慮した目標暴露濃度である200、700及び2000 ppbの吸入暴露を行うことができた。

本研究では、防虫剤や消臭剤として使用されているパラジクロロベンゼン、及び溶剤や洗浄剤として使用されて、また、灯油に含まれているテトラデカンを対象として、極低濃度レベルでの吸入暴露方法の開発を試みた。すなわち、パラジクロロベンゼン、テトラデカンスチレンとも、室内濃度指針値である40ppbを考慮し、40、120及び400 ppbを目標暴露濃度として吸入暴露方法の開発を行った。

B. 研究方法

B-1 パラジクロロベンゼン

パラジクロロベンゼンを40、120及び400 ppbの濃度で動物に吸入暴露する方法を開発するために、下記の方法により検討を行った。

1 パラジクロロベンゼンの吸入暴露システム

1) パラジクロロベンゼ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に示した。吸入暴露装置は、①パラジクロロベンゼン蒸気の発生装置（図1のA）、②パラジクロロベンゼン蒸気を希釈するための

一次希釈装置（図1のD）、③希釈したパラジクロロベンゼン蒸気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1のG）、④パラジクロロベンゼン蒸気を新鮮空気と混合し二次希釈するためのラインミキサー（図1のH）、⑤動物をパラジクロロベンゼン蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー、⑥濃度測定のためサンプリング装置（図1のI）によって構成した。

2) 吸入チャンバー（図9）

吸入チャンバーは全身暴露型であり、上部と下部が角錐状になった角型のチャンバーで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。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、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、及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 パラジクロロベンゼンの発生方法の検討

パラジクロロベンゼンは融点が53℃であり、常温では固体である。また、常温で固体から気体に昇華する性質がある。従って、パラジクロロベンゼン蒸気の発生方法は、①固体の状態のパラジクロロ

ベンゼンから昇華する蒸気を利用する方法、②融点である53℃以上に加熱し液体状にしたパラジクロロベンゼンから発生する蒸気を利用する方法が考えられた。本研究では、加熱によるパラジクロロベンゼンの変性の可能性を考慮し、また、家庭環境ではパラジクロロベンゼンが昇華により気中に拡散することから、①による発生法を選択した。

発生方法に関して下記の検討を行った。

1) 使用したパラジクロロベンゼンの特性

パラジクロロベンゼン (CAS No. 106-46-7、示性式 $C_6H_4Cl_2$) は、和光純薬工業(株)より購入した。グレードは試薬(和光特級、ロット番号PER3847)であり、純度は98.0%以上(和光純薬工業(株)測定値)であった。このパラジクロロベンゼンの特性をGC/MS (Agilent Technologies社 5973N)を用いて調べた。

2) 発生方法の検討

固体の状態のパラジクロロベンゼンから昇華する蒸気を利用する方法について、発生装置を試作し検討した。

3) パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法の検討

上記2)で発生したパラジクロロベンゼン蒸気を新鮮空気と混合し、目標吸入暴露濃度である40、120及び400 ppbにする方法について、希釈混合装置を試作し検討した。

3 吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼンの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度40、120及び400 ppbで、6時間及び22時間の暴露を行い、下記の方法により吸入チャンバー内のパラジ

クロロベンゼンの濃度を測定した。

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、図10)を用い、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管(ORBO™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。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、各濃度とも3本とした。

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、かつ色バイアルビン(日電理化硝子製)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。120 ppb群及び400 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(Agilent Technologies社製 5890A)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-1 (0.25 mmf × 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℃→(15℃/min)→200℃(3.33min)、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。

B-2 テトラデカン

テトラデカンを40、120及び400 ppbの濃度で動物に吸入暴露する方法を開発するために、下記の方法により検討を行っ

た。

1 テトラデカンの吸入暴露システム

1) テトラデカンの吸入暴露装置の概要

吸入暴露装置のシステムを図2に示した。吸入暴露装置は、①テトラデカン蒸気の発生装置 (図2のA)、②テトラデカン蒸気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2のG)、③テトラデカン蒸気を新鮮空気と混合・希釈するためのラインミキサー (図2のH)、④動物をテトラデカン蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー、⑤濃度測定のためサンプリング装置 (図2のI) によって構成した。

2) 吸入チャンバー

吸入チャンバーは前述したパラジクロロベンゼンと同様のものを使用した。

2 テトラデカンの発生方法の検討

テトラデカンは融点が5.9℃、沸点が253.7℃であり、常温では液体である。蒸気圧は1.33 hPa (76.4℃) であり、比較的蒸発しづらいが、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テトラデカンを気化させ一定濃度のテトラデカン蒸気を得る方法を選択した。

発生方法に関して下記の検討を行った。

1) 使用したテトラデカンの特性

テトラデカン (n-Tetradecane、CAS No. 629-59-4、示性式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$) は、和光純薬工業(株)より購入した。グレードは試薬(和光特級、ロット番号TSF0821)であり、純度は99.0%以上(和光純薬工業(株)測定値)であった。このテトラデカンの特性をGC/MS (Agilent Technologies社 5973N)を用いて調べた。

2) 発生方法の検討

テトラデカンに空気をバブリングして蒸気を発生させる方法について、発生装置を試作し検討した。

3) テトラデカン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法の検討

上記2)で発生したテトラデカン蒸気を新鮮空気と混合し、目標吸入暴露濃度である40、120及び400 ppbにするための設定条件を検討した。

3 吸入チャンバー内のテトラデカンの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度40、120及び400 ppbで、6時間及び22時間の暴露を行い、下記の方法により吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼンの濃度を測定した。

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、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管(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。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、各濃度とも3本とした。

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、かつ色バイアルビン(日電理化硝子製)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。40 ppb群、120 ppb群及び400 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 (Agilent Technologies 社製 5890A) 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-1 (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 → (20°C/min) → 220°C (5min)、注入口温度は200°C、検出器温度は200°C、試料注入量は1μLとした。

C. 研究結果

C-1 パラジクロロベンゼン

1 パラジクロロベンゼンの発生方法

1) 使用したパラジクロロベンゼンの特性

使用したパラジクロロベンゼンの特性をGC/MS (Agilent Technologies社 5973N) を用いて調べた結果、パラジクロロベンゼ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 (McLafferty 1994) を確認した。

2) パラジクロロベンゼンの発生方法

発生容器 (図1のA) 内の固体のパラジクロロベンゼンの表面に清浄空気 (発生空気、図1のB) を流しパラジクロロベンゼンを気化させた。試作機 (図2、改良前) で暴露したところ、パラジクロロベンゼン蒸気が口金部 (図2のA) で再結晶することが分かった。そこで、再結晶化を防ぐために、口金内にキャリアー空気を流すタイプの改良機 (図3) を製作し運転した結果、再結晶化が防止できることが分かった。また、パラジクロロベンゼンの昇華速度を安定させるため発生容器を恒温槽 (27°C) に収納した (図4)。

3 パラジクロロベンゼン蒸気の空気との

混合及び濃度制御の方法

発生容器内でパラジクロロベンゼン蒸気とキャリアー空気 (図1のC) を混合した。このパラジクロロベンゼン蒸気を循環式恒温槽で 27°Cに温度維持した一次希釈装置 (柴田科学 (株) 特注、図1のD、図5) のフラスコ内に導入し、一次希釈空気 (図1のE) で希釈混合した。流量計 (図1のG) を用いてこのパラジクロロベンゼン蒸気の一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、ラインミキサー上で二次希釈空気 (図1のH) と混合し、設定濃度としたパラジクロロベンゼンを吸入チャンバーに送り込んだ。

設定条件を修正しながら試運転を行い、下記の結果を得た。

設定条件 1: 恒温槽と一次希釈装置の温度を 25°C、発生機室の室温を 23°C、発生空気流量を 0.1 L/分、一次希釈空気流量を 25 L/分、二次希釈空気流量を 212 L/分とした。また、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、1.26、3.8 及び 12.6 L/分に設定し、6時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ、10±1 ppb (目標濃度に対し 25%)、30±0 ppb (25%) 及び 104±3 ppb (26%) であり、目標濃度に比べ低い値であった。

設定条件 2: 濃度をあげるため、恒温槽と一次希釈装置の温度及び発生機室の室温を 27°C、発生空気流量を 0.2 L/分とした。また、パラジクロロベンゼンの発生容器内での再結晶化を防ぐため、5 L/分のキャリアー空気を発生容器内に流し、一次希釈空気流量はキャリアー空気の量を引き 20 L/分とした。この条件で 6 時間の試運転を行

った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ、 27 ± 2 ppb (目標濃度に対し 68%)、 83 ± 1 ppb (69%) 及び 283 ± 3 ppb (71%) であり、設定条件 1 に比較して目標濃度に近くなったが、まだ目標濃度に比べ低い値であった。

設定条件3: さらに濃度をあげるため、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、1.86、5.5 及び 17.8 L/分に設定し、6時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ、 40 ± 2 ppb (目標濃度に対し 99%)、 111 ± 3 ppb (92%) 及び 404 ± 7 ppb (101%) であり、目標濃度との差は各濃度とも 10%以内となった。

設定条件4: 22時間暴露での暴露精度を確認するために、設定条件4とほぼ同じ設定条件で22時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ、 38 ± 1 ppb (目標濃度に対し 96%)、 124 ± 4 ppb (103%) 及び 413 ± 20 ppb (103%) であり、目標濃度との差は各濃度とも 10%以内であった。

4 吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼンの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb で、6時間及び 22時間の暴露を行い、被験物質の捕集方法及び捕集管の前処理及び分析条件を検討した。なお、捕集管への採気時間は、暴露全時間にわたる 6時間及び 22時間とした。その結果、各濃度とも 6時間及び 22時間採気の両方で活性炭第 2 層へのパラジクロロベンゼンの移行はなく、破過はなかった。また、同時に採気した 3本の捕集管の測定値は、各濃度とも

10%以内であり、安定した結果が得られた。

C-2 テトラデカン

1 テトラデカンの発生方法

1) 使用したテトラデカンの特性

使用したテトラデカンの特性を GC/MS (Agilent Technologies社 5973N) を用いて調べた結果、テトラデカ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 (McLafferty 1994) を確認した。

2) テトラデカンの発生方法

被験物質供給装置 (柴田科学(株)特注) の発生容器内 (図6のA) のテトラデカンを循環式恒温槽で加熱 (24°C) しながら、清浄空気 (図6のB) のパプリングにより蒸発させた (図7)。この蒸気を清浄空気 (キャリア空気、図6のC) と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却 (18°C、図6のD)、再加熱し (25°C、図6のE) した。なお、テトラデカンは引火温度が 100°C であるため、加熱温度は室温に近い 24°C とした。

3 テトラデカン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法

上記 2 により発生したテトラデカン蒸気は、流量計 (図6のG) を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。ラインミキサー上で新鮮空気 (図6のH) と混合し、設定濃度としたテトラデカンを吸入チャンバーに送り込んだ。

設定条件を修正しながら試運転を行い、下記の結果を得た。

設定条件 1: 発生容器の温度を 24°C、冷却温度を 18°C、再加熱の温度を 25°C、発

生空気流量 (図 6 の B) とキャリアー空気流量 (図 6 の C) の比を 3 : 1、希釈空気流量 (図 6 の H) を 212 L/分とした。また、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、2.7、8.1 及び 27 L/分に設定し、6 時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ 51 ± 2 ppb (目標濃度に対し 128%)、 167 ± 11 ppb (139%) 及び 459 ± 8 ppb (115%) であり、目標濃度より高い値になった。

設定条件 2 : 濃度を下げるため、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ 2.12、5.6 及び 23.5 L/分に下げて設定し、6 時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ 46 ± 2 ppb (目標濃度に対し 115%)、 127 ± 5 ppb (106%) 及び 380 ± 15 ppb (95%) となり、目標濃度に近い値となった。

設定条件 3 : 濃度をさらに調整し、また、22 時間暴露での精度を調べるために、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ 1.83、5.3 及び 24.7 L/分に設定し、22 時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ 50 ± 2 ppb (目標濃度に対し 124%)、 125 ± 5 ppb (104%) 及び 440 ± 9 ppb (110%) であり、目標濃度 40 ppb の実測値が予想より高い濃度になった。

設定条件 4 : 目標濃度 40 ppb の濃度を下げるため、目標吸入暴露濃度 40 ppb のフローメータの流量を 1.6 L/分に下げて設定し、22 時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400

ppb の実測濃度は、それぞれ 46 ± 2 ppb (目標濃度に対し 115%)、 106 ± 4 ppb (88%) 及び 330 ± 10 ppb (83%) であり、目標濃度 120 と 400 ppb はフローメータの流量設定が設定条件 3 と同じであるにもかかわらず、実測値が設定条件 3 より低い濃度になった。

設定条件 5 : 設定条件 4 の再現性を確認するため、設定条件 4 と同条件で 22 時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ 37 ± 1 ppb (目標濃度に対し 92%)、 92 ± 18 ppb (77%) 及び 343 ± 23 ppb (86%) であり、目標濃度 120 と 400 ppb はフローメータの流量設定が設定条件 4 に近い値となり、再現性があると考えた。

設定条件 6 : 設定条件 5 の値に基づいて、フローメータの流量を再調整した。すなわち、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ 1.75、6.2 及び 29.1 L/分に設定し、22 時間の試運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の実測濃度は、それぞれ 42 ± 2 ppb (目標濃度に対し 104%)、 111 ± 3 ppb (93%) 及び 390 ± 23 ppb (98%) であり、目標濃度との差は各濃度とも 10% 以内となった。

4 吸入チャンバー内のテトラデカンの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb で、6 時間及び 22 時間の暴露を行い、被験物質の捕集方法及び捕集管の前処理及び分析条件を検討した。なお、捕集管への採気時間は、暴露全時間にわたる 6 時間及び 22 時間とした。その結果、各濃度とも 6 時間及び 22 時間採気の両者で活性炭第 2