

Fig.5 溶融バブリング式で発生させたCPFガスの5回目の濃度試験

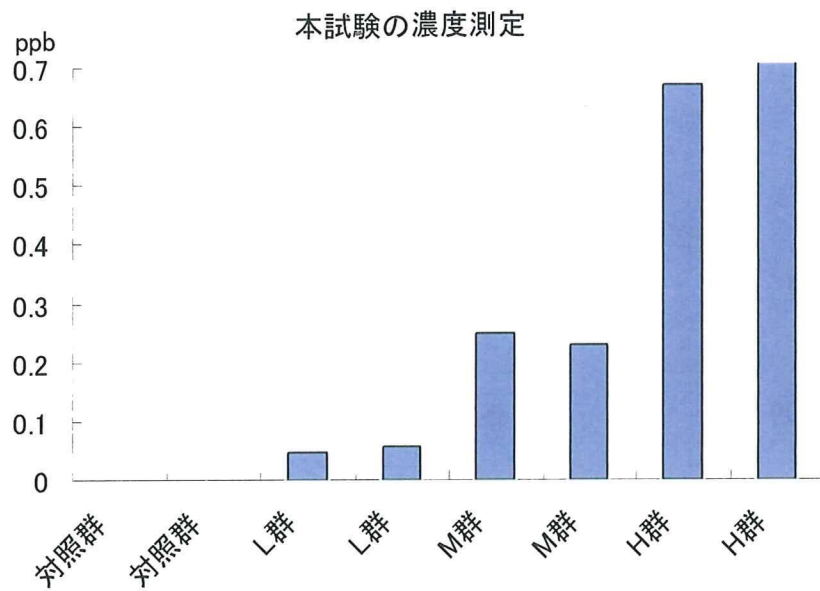


Fig.6 溶融バブリング式で発生させたCPFガスの本試験の濃度試験

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

化学物質の吸入曝露は、人体に有害な影響を与えることが知られており、そのモデル系を確立することは、その対策に重要と考えられる。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。初年度は、ヒト気道上皮細胞株を用いて、細菌性リポ多糖ないし poly I:C 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、poly I:C (10 µg/ml) で 24 時間刺激後、ホルムアルデヒド (10 µM) 3 時間添加することにより、IL-8 mRNA 発現量が有意に増強することを報告した、本年度、逆に、化学物質の慢性的な吸入曝露の状況下で、外界の吸入粉塵や微生物の刺激を受けて生じる応答が修飾される場合を想定して、ホルムアルデヒドを添加してから、poly I:C を加える系について種々の条件検討を行った結果、ホルムアルデヒド (1-10 µM) 添加 3 時間、その後 poly I:C (10 µg/ml) 12 時間刺激の系で相乗効果が認められた。培養上清中の IL-8 濃度も上昇する傾向にあった。しかしながら、poly I:C⇒ホルムアルデヒドに比べると、ホルムアルデヒド⇒poly I:C の系では、必ずしも再現性よく IL-8 の遺伝子発現増強効果が認められず、今後も更なる条件検討が必要と思われた。本年度は mRNA 発現量、培養上清中のサイトカイン量に加え、シグナル伝達に関連するタンパクのリン酸化についても予備的な検討を加えた。

#### 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、初年度は、ヒト気道上皮細胞株を用いて、ウイルス曝露を念頭に置いた poly I:C 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。本年度は、逆に、化学物質の慢性的な吸入曝露の状況下で、外界の吸入粉塵や微生物の刺激を受けて生じる応答が修飾される場合を想定して、ホルムアルデヒドを添加してから、poly I:C 刺激を加える系についてさまざまな条件検討を行った

## B. 研究方法

### 「刺激物質」

前年度の検討から、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、Poly I:C を選択した。

### 「細胞」

前年度の検討から、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用い、培養、予備実験を行った。

### 「培養および刺激」

細胞株を 25cm<sup>2</sup> フラスコで培養し (5×10<sup>5</sup> cells /flask)、90% confluent で、ホルムアルデヒド (1, 10 μM) を添加 3-24 時間後、Poly I:C (1, 10 μg/ml) の刺激を加え、さらに 12 時間後に細胞を回収、RNA を抽出し、定量的 RT/PCR を実施した。

前年度の検討から、炎症マーカーとなる発現遺伝子として、IL-8 を選択した。また、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 (IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin, TARK, MDC, GROα) 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ておらず、公に入手される細胞株のみを用いている。

## C. 研究結果

### 「細胞株」

ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用い、Poly I:C の刺激下で培養、予備実験を行った結果、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、喘息の誘発など気道炎症を疑わせることから、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」

昨年度は、Poly I:C (10 μg/ml) 存在下、24 時間後にホルムアルデヒド (1, 10, 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、ホルムアルデヒド 10 μM 以上で、再現性よく、IL-8 mRNA の発現亢進が観察されたが、今回は、ホルムアルデヒド (1, 10 μM) 添加 3 時間後、ホルムアルデヒド曝露を継続し、Poly I:C (10 μg/ml) の存在下、12 時間後の IL-8 mRNA 発現亢進が認められた。しかしながら poly I:C⇒ホルムアルデヒドに比べると、ホルムアルデヒド⇒poly I:C の系は、再現性が必ずしも良好でなかった。

ホルムアルデヒド (1, 10  $\mu$ M) 添加3時間後、ホルムアルデヒドの曝露を継続し、poly I:C 10  $\mu$ g/ml で刺激して12時間後のIL-8 mRNA量(A, B)。poly I:C 単独(C)に比べて、増強効果が認められた。他の条件では、明らかな効果が認められなかった。

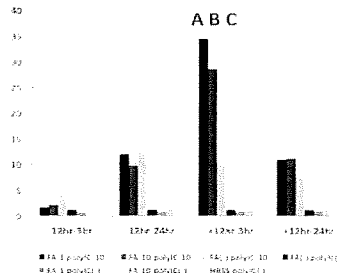


図1 ホルムアルデヒド⇒Poly I:C による、IL-8 mRNA 発現の増強

「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。

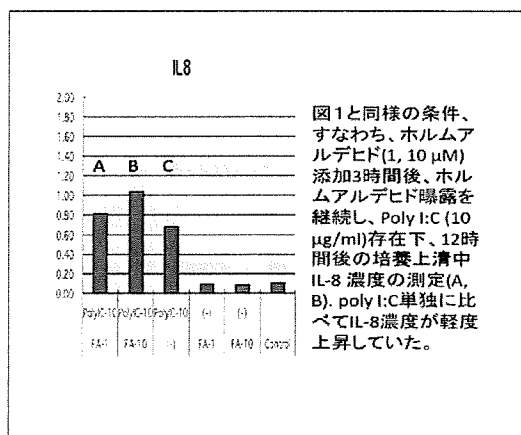


図2 ホルムアルデヒド⇒Poly I:C による、上清中 IL-8 濃度の増強

それ以外のサイトカイン、ケモカインについては、必ずしも傾向が一定しなかった。

「シグナル伝達分子のリン酸化」

予備実験として、IL-8 の遺伝子発現へ至細胞内シグナル伝達分子への影響を見る目的で、p38MAPK, ERK1/2, JNK のリン酸化を 0, 15, 30, 60, 120 分まで観察して、poly

I:C 刺激による各タンパクリン酸化の誘導を確認した。

#### D. 考察

初年度、ホルムアルデヒドのヒト気道上皮細胞への影響を株化細胞である BEAS-2B 株により、確認したが、特に poly I:C の低濃度刺激後に、ホルムアルデヒドの曝露があると、IL-8 mRNA 発現が誘導されることを確認した。今年度、逆に、ホルムアルデヒド曝露中に、poly I:C 刺激を与えることにより、poly I:C 単独に比べて、炎症応答が増強されるかを検討し、実験を繰り返したが、おそらくホルムアルデヒドによる炎症応答増強効果と、細胞障害による直接の非特異的抑制効果の強弱により、ばらつきのある結果が得られるものと思われた。

動物吸入曝露モデルとの対応を考えると、poly I:C⇒ホルムアルデヒドより、ホルムアルデヒド⇒poly I:C の方がより、生理的な系と思われるが、この系の再現性の困難さより、最終的な、*in vitro* 実験系の確定には、十分な検討が必要と思われた。

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、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。

#### E. 結論

ホルムアルデヒド曝露に、poly I:C を刺激したことによる、ヒト気道上皮細胞における炎症応答の相乗効果を、種々の条件下で検討した。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が、ホルムアルデヒド⇒polyI:C の系では、非特異的遺伝子発現抑制効果と poly I:C⇒ホルムアルデヒドで見られた遺伝子発現増強効果が複合しており、結果を複雑にしているものと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hang NTL, Ishizuka N, Keicho N, Hong LT, Tam DB, Thu VTX, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Sakurada S, Lien LT. Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting. *BMC Infect Dis* 9: 66, 2009.

Keicho N, Itoyama S, Kashiwase K, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Hoa BK, Hang NT, Hijikata M, Sakurada S, Satake M, Tokunaga K, Sasazuki T, Quy T. Association of HLA-class II alleles with SARS in the Vietnamese population. *Hum Immunol* 70: 527-531, 2009.

Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey B, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibodies and Myeloid Cell Immune Functions in Healthy Individuals. *Blood* 113 (11): 2547-56, 2009.

Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani

M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection. *J Infect Dis* 199 (11): 1707-1715, 2009.

Lien LT, Hang NTL, Kobayashi N, Yanai H, Toyota E, Sakurada S, Thuong PH, Cuong VC, Nanri A, Mizoue T, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Tuan LA, Keicho N. Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam. *PLoS One* 4 (8): e6798, 2009.

### 2. 学会発表

本研究に関連するものはなし

## 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クロルピリフォス（指針値：0.07 ppb、暴露目標値：0.07、0.20、0.70 ppb）の経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）をおこない、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、6時間暴露よりも22時間暴露時の方が発現変動を示す遺伝子数が少なかったが、この理由として、特定の遺伝子が発現増加し、代償的にクロルピリフォス暴露影響を軽減する可能性が考えられ、その候補分子を見いだすことができた。このことは、当該分子が変異、欠損あるいは二次的に発現低下することなどにより機能不全を来した場合、呼吸毒性が経時的に増悪する可能性を示唆しており、健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。2時間単回暴露（2、4、8、24時間後）についてはサンプリングが終了しており今後解析する予定である。このように、シックハウスレベルの極低濃度暴露に於いても、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、人にお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（厚労科研・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お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、有機リン系殺虫剤クロルピリフォスにつき検討した。

## 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 で一晚浸漬し、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 µL 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 µg 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

本年度はクロルピリフォス (Chlorpyrifos; Cas No. : 2921-88-2) (Catalogue No. : C425300, Tronto Research Chemicals Inc.) についてデータ解析を進めた。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に経気道的に 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) (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) を検討し、得られたマウス肺及び肝の mRNA サンプルにつき網羅的遺伝子発現解析を行った。クロルピリフ



オスの指針値は、0.07 ppb、暴露目標値は、0.07、0.20、0.70 ppb である。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 次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意と推定される順に並び替えるソフトである。また、シグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

#### C-1: クロルピリフォス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、肺と肝における解析結果を示す。

##### C-1-1: クロルピリフォス [2 時間単回暴露]の「肺」にお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: クロルピリフォス [2 時間単回暴露]の「肝」にお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: クロルピリフォス [6 時間/日×7 日間暴露]の「肺」にお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 235 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 60 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかったが、炎症に関与すると考えられる、Cxcr4 (22 時間後、高用量; 70 時間後、中・高用量) および IL1 $\beta$  (70 時間後、中・高用量; 166 時間後、高用量) 遺伝子の有意な発現増加が認められた。したがって、肺において炎症に関係するシグナルが活性化されている可能性が示唆された。

また、肺における機能が不明であるが発現増加が顕著に認められた遺伝子として、Sox4 および Sox11 (両者共に、22、70、166 時間後、高用量) および Hoxa5 (22 時間後、高用量; 70 時間後、中・高用量; 166 時間後、高用量) 遺伝子が認められた。Hoxa5 遺伝子は p53 分子の発現を調節することが知られており、発がんに関与することが報告されている。しかし p53 遺伝子の発現変動は顕著ではないことから、本実験における発現上昇の意味付けは困難である。Sox4 および Sox11 の本実験にお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。

##### C-1-4: クロルピリフォス [6 時間/日×7 日間暴露]の「肝」にお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 661 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 307 ps が見いだされた。

IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかったが、酸化ストレスに関与すると考えられる Srxn1 (22・70 時間後、高用量)、Prdx (22 時間後、高用量) 遺伝子の有意な発現増加が認められた。したがって、肝において酸化ストレスが誘発されている可能性が示唆された。

また、発現増加が顕著に認められた遺伝子として、精巣および軟骨形成に関与する Sox9 (22 時間後、高用量；70 時間後、低・中・高用量；166 時間後、高用量)、リンパ節形成に関与する Id2 (22 時間後、中・高用量；70・166 時間後、高用量)、血管形成に関与すると考えられる Cyr61 (22 時間後、高用量；70 時間後、中・高用量；166 時間後、中用量) 遺伝子が認められた。しかし、これらの遺伝子の肝における機能が现阶段では不明であるため、本実験における発現上昇の意味付けは困難である。

C-1-5: クロルピリフォス [22 時間/日×7 日間暴露] の「肺」にお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 45 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 20 ps が見いだされた。したがって、[6 時間/日×7 日間暴露] の肺の場合と比較し、増加 ps 数が約 1/3 だけ少ないこととなる。IPA による検索では特定のシ

グナルネットワークは抽出されてこなかった。また、生物学的な発現変動が示唆されたほとんどの遺伝子の発現増加は顕著ではなかったが、Cyr61 遺伝子のみ顕著な発現変動が認められた (22 時間後、低・中・高用量；70 時間後、中・高用量；166 時間後、低・中用量)。この遺伝子は、[6 時間/日×7 日間暴露] の「肝」においても発現増加が認められている (上述)。この Cyr61 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。



### Cyr61

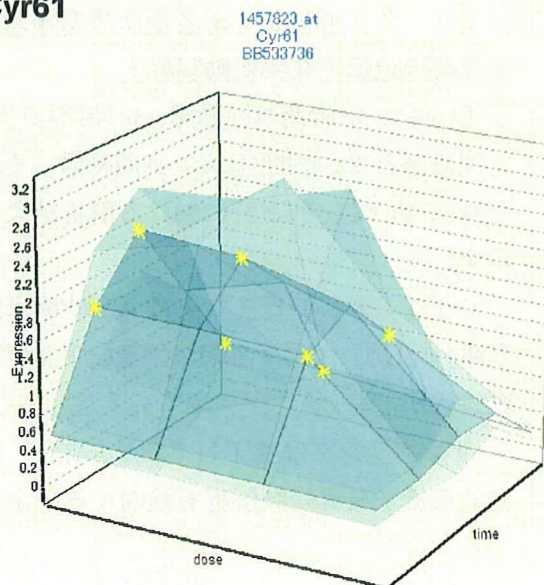


図 1 Cyr61 (cysteine rich protein 61) の遺伝子発現変動

上述したように肺では、6 時間暴露より

も 22 時間暴露時の方が発現変動を示す遺伝子数が少なかったが、この理由として、22 時間暴露により特定の遺伝子が発現増加し、代償的にクロルピリフォス暴露影響を軽減する可能性が考えられた。Cyr61 遺伝子がこの候補分子として考えられた。この Cyr61 遺伝子の欠失マウスは報告されており (Mo FE et al., *Molec Cell Biol* 22: 8709-8720, 2002)、ホモ型は、胎盤における血管形成障害により胎生致死を示す。したがって、肺における Cyr61 遺伝子の機能解析のためには、肺特異的 Cyr61 欠失マウスが有用であると考えられる。

C-1-6: クロルピリフォス [22 時間/日×7 日間暴露] の「肝」にお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 604 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 134 ps が見いだされた。したがって、[6 時間/日×7 日間暴露] の肝の場合と比較し、生物学的な変化が示唆された増加 ps 数は、約 1/2 だけ少ないこととなる。

IPA による検討の結果、シグナルネットワークとして、Mitochondrial dysfunction、Oxidative phosphorylation が抽出されてきた。これに関与するシグナル分子は、Ndufb2 (22 時間後、高用量)、Cox6c (22 時間後、低・高用量; 70 時間後、低用量; 166 時間後、低・中・高用量) などであった。したがって、ミトコンドリア電子伝達系が活性化されている可能性が示唆された。過度の活性化は酸化ストレスを誘発する可能性が示唆されるが、酸化ストレスに関与する遺伝子の顕著な発現変動が認められな

かった。

その他、発現増加が顕著な遺伝子として、オートファジー (自食作用) に関係する Atg3 (22 時間後、高用量; 70 時間後、高用量)、リンパ節形成に関与する Id2 (70 時間後、高用量; 166 時間後、中・高用量; 190 時間後、低・中用量) 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。

#### D. 結論

本年度は昇華性化学物質クロルピリフォス (指針値: 0.07 ppb、暴露目標値: 0.07、0.20、0.70 ppb) の経気道暴露 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) をおこない、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 (6、24、150、168 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。2 時間単回暴露については、サンプリングは終了しており、近々解析する予定である。

その結果、クロルピリフォスの 0.07 ppb 以上という極低濃度暴露によって、肺及び肝、双方に於いてシグナル伝達に関わる多くの遺伝子発現変動が認められ、有害性を示唆するシグナルとして、クロルピリフォス [6 時間/日×7 日間暴露] の「肺」では「炎症に関係するシグナル」が、「肝」では「酸化ストレス」が誘発されている可能性が示唆されたが、[22 時間/日×7 日間暴露] の「肺」および「肝」では見いだすことが出来なかった。

[22 時間/日×7 日間暴露] においては、肺、肝共に発現変動を示す遺伝子数が 6 時間暴露よりも 22 時間暴露時の方が少なか

った。解析を進めた結果、22 時間暴露時の方が発現変動を示す遺伝子数が少ない理由として、特定の遺伝子の発現が増加し、代償的にクロルピリフォス暴露影響を軽減するメカニズムが存在する可能性が考えられた。肺において、その候補分子 Cyr61 が見いだされた。このことは、当該分子が変異、欠損あるいは、二次的に発現低下することなどにより機能不全を来した場合、呼吸毒性が経時的に増悪する可能性を示唆しており、健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。Cyr61 遺伝子欠失マウスのホモ型は、胎盤における血管形成障害により胎生致死を示すため、肺における Cyr61 遺伝子の機能解析のために、肺特異的 Cyr61 欠失マウスの作製・解析が有用であると考えられる。

クロルピリフォスの指針値は 0.07 ppb であることから、本実験では、暴露目標値として 0.07 (高用量)、0.20 (中用量)、0.70 ppb (低用量) にて検討した。発現増加が認められた遺伝子の多くは中用量、高用量において用量依存的な発現増加を示し、遺伝子によっては低用量より用量依存的な発現増加が認められたことから、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。

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。平成 22 年度も引き続き、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 物質のうち、ダイアジノン、フェノブカルブについて同様な検討を行う予定である。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Kanno J., Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects". J Toxicol Sci. 2009;34 Suppl 2:SP199-200.

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J., Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. J Toxicol Sci. 2009;34 Suppl 2:SP279-86. Review.

Matsunaga N, Kanno J., Hamada C,

Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. Environmetrics 2009; 20:1-13.

## 2. 学会発表

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

菅野 純、RISK MANAGEMENT FOR FOOD SAFETY AND INTRODUCTION TO THE SCIENCE AND TECHNOLOGY、Risk Management Seminar 2009、2009 年 3 月

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝秀、種村健太郎、小川幸男、関田清司、肝障害性薬剤による初期遺伝子発現応答の Percellome 解析、薬学会第 129 年会、2009 年 3 月

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、小縣昭夫、北嶋聡、多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月

菅野 純、相崎健一、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトの進捗-インフォマティクス構築へ-、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、2009 年 7 月

広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、菅野 純、ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年

会、2009 年 7 月

Kanno J, Takagi A, Nishimura T, Hirose A., Long-term animal testing of nanoparticles for detection of chronic toxicity, 4th International Conference on Nanotechnology -Occupational and Environmental Health (NanOE2009), 2009. 8. 28, Helsinki, Finland

Kanno J, Takagi A, Nishimura T, Hirose A, Tetsuji Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi, N and Kitajima S., Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX V), 2009. 9. 12, Taipei

菅野 純、ナノマテリアルの毒性-発がん性を中心に、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月

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

特許第 4415079 号、2009 年 12 月 4 日登録、遺伝子の絶対発現量測定方法

### 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

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

研究協力者	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	吸入試験室長補佐
	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	分析室長
	武 信	日本バイオアッセイ研究センター	分析室長補佐

研究要旨

化学物質を極低濃度で実験動物に経気道暴露するための技術開発を目的として、クロルピリフォスを対象として室内濃度指針値（0.07 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、加熱・バブリングにより気化させる方法により0.07、0.21および0.7 ppbの目標暴露濃度でクロルピリフォスを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ヒト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、キシレン（混合キシレン）、パラジクロロ

ベンゼンおよびテトラデカンを対象として、極低濃度レベルで動物（マウス）に吸入暴露できる吸入ばく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および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および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させる方法を試み、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および2000 ppbの吸入暴露を行うことができた。パラジクロロベンゼンについては、固体を加熱・昇華させる方法により、室内濃度指針値である40ppbを考慮した目標暴露濃度である40、120および400 ppbの吸入暴露を行うことができた。また、テトラデカンについては、加熱・バブリングにより気化させる方法により、室内濃度指針値である40ppbを考慮した目標暴露濃度である40、120および400 ppbの吸入暴露を行うことができた。

本研究では、農薬として使用されているクロルピリフォスを対象として、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、クロルピリフォスの室内濃度指針値である0.07ppbを考慮し、0.07、0.21および0.7 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

クロルピリフォスを0.07、0.21および0.7 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 クロルピリフォスの吸入暴露システム

#### 1) クロルピリフォス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クロルピリフォス蒸気の発生装置へ送る発生空気、キャ

リア空気の流量制御装置（図1のA）、②クロルピリフォス蒸気の発生装置（図1のB）、③クロルピリフォス蒸気をラインミキサーに送気するための加熱配管（図1のC）、④クロルピリフォス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1のD）、⑤動物をクロルピリフォス蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー（図1のE）、⑥濃度測定のためのサンプリング装置（図1のF）を組み立てて作製した。この吸入曝露装置を各暴露濃度群（0.07、0.21および0.7 ppb暴露群）につき1台、計3台作製し、吸入暴露の性能を検討した。

#### 2) 吸入チャンバー

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。吸入チャンバーは、各群（3暴露群と1対照群）につき1台、計4台を用いた。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、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 被験物質

クロルピリフォス (chlorpyrifos, CAS No. : 2921-88-2、示性式  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ ) は、下記の試薬を使用した。

製造元：TRC(株)

ロット番号：3-ABY-19-1

純度：98.0% (TRC(株)測定値)

使用したクロルピリフォスの特性をGC/MS (Agilent Technologies社 5973N) を用いて調べた結果、クロルピリフォス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

## 3 クロルピリフォスの発生方法の検討

クロルピリフォスは融点が41～42℃であり、常温では固体である。また、固体での蒸気圧は0.0024Pa (25℃) であり、パラジクロロベンゼン (20℃で170Pa) に比較して低いため、常温で固体の状態では気化しにくい。従って、融点である42℃以上に加熱し液体状にしたクロルピリフォスに空気でバブリングし、発生する蒸気を利用する方法を選択した。なお、クロルピリフォスは160℃以上で分解するため、できるだけ低い温度で加熱する必要があるため、加熱温度は50℃の条件を選択した。

発生方法に関して下記の検討を行った。

### 1) 発生方法の検討

加熱し液体状にしたクロルピリフォスに空気でバブリングする方法について、発生装置を試作し検討した。

バブリング部分の素材については、ガラス管、テフロン管およびゴアテックスチューブについて比較検討した。ゴアテ

ックスチューブは、ジャパングアテックス株式会社、GORE™チューブTB005 (内径  $5.00 \pm 0.30$ mm、肉厚  $0.60 \pm 0.05$ mm、最大孔径  $3.5 \mu\text{m}$ 、穿孔率  $70 \pm 5\%$ ) を使用した。

また、発生したクロルピリフォス蒸気の再凝固を防止しラインミキサーまで送気するための配管に加温装置を設け、その効果を検討した。

### 2) クロルピリフォスの濃度制御の方法の検討

目標吸入暴露濃度である0.07、0.21および0.7 ppbに濃度制御する方法について、クロルピリフォス蒸気の発生装置へ送る発生空気、キャリア空気の流量を制御する装置を試作し、各流量の設定のための検討を行った。

## 3 吸入チャンバー内のクロルピリフォスの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度0.07、0.21および0.7 ppbで、6時間と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クロルピリフォスの濃度を測定した。

### 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 (XAD-2 OVS Tube, SKC, Inc) 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1 L/分 (6時間暴露) および0.3 L/分 (22時間暴露) とした (NIOSH 1994)。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) 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、アセトン（和光純薬工業製、特級）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。0.7 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。

GC/MSの分析条件は、カラムはDB-1（0.25 mm・× 60m）、キャリアガスはヘリウム、カラム温度は100℃→（10℃/min）→250℃（15min）、注入口温度は200℃、イオン源温度は230℃、フラグメントピークは 197m/z、試料注入量は1 μLとした。

## C. 研究結果

試作したクロルピリフォスの吸入暴露装置を図2から7に示した。

### 1 クロルピリフォスの発生方法

50℃に加温した恒温槽内に設置した発生容器（図3）で溶解させたクロルピリフォスに、発生空気（HEPAフィルターで濾過した空気）を流しバブリングすることにより、クロルピリフォス蒸気を発生させた。

発生容器内でクロルピリフォス蒸気が再凝集することを防ぐために、平成20年度にパラジクロロベンゼンの発生装置のために開発した口金内にキャリア空気を流すタイプの発生容器を用いた。その結果、発生容器内でクロルピリフォスの再凝集は認められず、この発生容器がクロルピリフォス蒸気の発生に利用できることを確

認できた。また、発生したクロルピリフォス蒸気をラインミキサーまで送気するための配管内で再凝固することを防止するために、配管周囲を50℃の温水で加熱する装置を設けた（図4、5）。その結果、配管内での再凝固は認められなかった。

微量のクロルピリフォスを安定して気化させるためには、微小な気泡によりバブリングすることが必要である。この目的のために、バブリング部分の素材について、ガラス管、テフロン管およびゴアテックスチューブについて比較検討した。ゴアテックスチューブは3.5 μm以下の穴を有する素材であり、チューブの管壁から空気を透過させることができるため、先端部を閉じて使用した（図8）。各素材により発生する気泡の状態を図9に示した。ガラス管とテフロン管では大きな泡が断続的に発生するのに対し、ゴアテックスチューブでは微小な泡が安定して発生することが確認できた。

### 2 クロルピリフォスの濃度制御の方法

目標吸入暴露濃度である 0.07、0.21 および 0.7 ppb に濃度制御する方法について、クロルピリフォス蒸気の発生装置へ送るバブリングのための発生空気とキャリア空気の流量の設定条件を決定するために、設定条件を修正しながら6時間と22時間の試運転を行った。なお、発生容器を入れた恒温槽と加熱配管の温度は 50℃とした。また、希釈空気流量は吸入チャンバーの喚起回数を12回/時間とするため212 L/分とした。

各設定条件の試運転により、下記の結果を得た（表1）。

設定条件 1：目標吸入暴露濃度 0.07 ppb

の吸入装置は発生空気の流量を 0.60 L/分、キャリア空気の流量を 0.30 L/分、目標吸入暴露濃度 0.21 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 1.7 L/分、キャリア空気の流量を 0.80 L/分、目標吸入暴露濃度 0.7 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 6.00 L/分、キャリア空気の流量を 3.00 L/分で、6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.07、0.21 および 0.7 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ  $0.308 \pm 0.007$  (目標濃度に対し 441%)、 $1.061 \pm 0.009$  (目標濃度に対し 505%) および  $4.068 \pm 0.116$  (目標濃度に対し 581%) であり、各濃度群とも目標濃度に比べ高い値であった。

設定条件 2：吸入チャンバーの濃度を下げるため、各暴露装置とも発生空気とキャリア空気の流量を下げた。すなわち、目標吸入暴露濃度 0.07 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.16 L/分、キャリア空気の流量を 0.08 L/分、目標吸入暴露濃度 0.21 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.34 L/分、キャリア空気の流量を 0.17 L/分、目標吸入暴露濃度 0.7 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 1.20 L/分、キャリア空気の流量を 0.60 L/分で 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.07、0.21 および 0.7 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ  $0.066 \pm 0.027$  (目標の度に対し 94%)、 $0.189 \pm 0.007$  (目標濃度に対し 90%) および  $1.075 \pm 0.008$  (目標濃度に対し 154%) であり、目標吸入暴露濃度 0.07 と 0.21 ppb の吸入チャンバー濃度は目標値に近い値となった。しかし、目標吸入暴露濃度 0.7 ppb の吸入チャンバーの濃度はまだ高い値であった。

設定条件 3：目標吸入暴露濃度 0.7 ppb の濃度を下げるため、この濃度の暴露装置の発生空気とキャリア空気の流量を下げた。他の暴露装置は微調整のみを行った。すなわち、目標吸入暴露濃度 0.07 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.22 L/分、キャリア空気の流量を 0.11 L/分、目標吸入暴露濃度 0.21 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.38 L/分、キャリア空気の流量を 0.19 L/分、目標吸入暴露濃度 0.7 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.80 L/分、キャリア空気の流量を 0.40 L/分で 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.07、0.21 および 0.7 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ  $0.056 \pm 0.003$  (目標の度に対し 80%)、 $0.207 \pm 0.006$  (目標濃度に対し 99%) および  $0.611 \pm 0.023$  (目標濃度に対し 87%) であり、各濃度群とも目標濃度に近い値となった。

設定条件 4：各濃度群とも目標濃度に近い値が得られたため、各暴露装置の発生空気とキャリア空気の流量は微調整のみとし、22 時間の暴露運転を行った。すなわち、目標吸入暴露濃度 0.07 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.28 L/分、キャリア空気の流量を 0.14 L/分、目標吸入暴露濃度 0.21 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.39 L/分、キャリア空気の流量を 0.195 L/分、目標吸入暴露濃度 0.7 ppb の吸入装置は発生空気の流量を 0.92 L/分、キャリア空気の流量を 0.46 L/分で 22 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.07、0.21 および 0.7 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ  $0.175 \pm 0.011$  (目標の度に対し 251%)、 $0.246 \pm 0.014$  (目標濃度に対し 117%) および  $0.883 \pm 0.016$  (目標

濃度に対し 126%) であり、目標吸入暴露濃度 0.07ppb と 0.7 ppb の吸入チャンバー濃度が目標値より高い値になった。

設定条件 5：目標吸入暴露濃度 0.07 ppb と 0.7ppb の濃度を下げると、すべての濃度の暴露装置の発生空気とキャリア空気の流量を設定条件 3 にの流量に戻して 22 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.07、0.21 および 0.7 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.129 ± 0.001 (目標の度に対し 184%)、0.272 ± 0.013 (目標濃度に対し 129%) および 0.751 ± 0.006 (目標濃度に対し 107%) となった。

#### 4 吸入チャンバー内のクロルピリフォスの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度 0.07、0.21 および 0.7 ppb で、6 時間および 22 時間の暴露を行い、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 時間または 22 時間とした。その結果、各濃度とも 6 時間および 22 時間採気の両方で活性炭第 2 層へのクロルピリフォスの移行は認められず、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。

#### D. 考察

クロルピリフォスを室内濃度指針値である 0.07 ppb を考慮し、0.07、0.21 および 0.7 ppb を目標暴露濃度として吸入暴露方法の開発を行った結果について、以下に考察する。

クロルピリフォスの発生装置について

は、クロルピリフォスの特性、すなわち、常温では固体であり (融点が 41~42°C)、固体の状態では気化しづらい (25°C での蒸気圧は 0.0024Pa) ことから、融点である 42°C 以上に加熱し液体状にしたクロルピリフォスに空気でバブリングし、発生する蒸気を利用する方法 (加熱・バブリング法) を選択した。この加熱・バブリング法による吸入暴露装置の試運転をした結果、今回の目標暴露濃度の最高濃度である 0.7 ppb 以上の濃度でクロルピリフォスを暴露できることが確認できた。加熱・バブリング法は今回の目標暴露濃度でクロルピリフォスの吸入暴露実験を行うために十分な量のクロルピリフォスを気化することができることがわかった。

加熱・バブリング法で極低濃度の吸入暴露を行うためには、微量のクロルピリフォスを安定して気化させることが必要である。このために、微小な気泡によりバブリングする方法について、従来バブリングに使っていたガラス管とテフロン管の代わりにゴアテックスチューブを用いる方法の可否を検討した。ゴアテックスチューブは 3.5µm 以下の穴を有する素材であり、チューブの管壁から空気を透過させることができる。このゴアテックスチューブの先端部を閉じたものをバブリングに使用し、ガラス管やテフロン管と比較した。その結果、ガラス管とテフロン管では大きな泡が断続的に発生するのに対し、ゴアテックスチューブでは微小な泡が安定して発生することが確認できた。従って、ゴアテックスチューブは、微量のクロルピリフォスを安定して気化させるための素材として有用であると推

察された。

また、気化したクロルピリフォスが再凝集することを防ぐために、口金内にキャリア空気を流すタイプの発生容器およびクロルピリフォス蒸気をラインミキサーに送気するための加熱配管を試作機に用いて暴露運転をした。その結果、発生容器内および配管内に再凝集は観察されず、これらの装置が再凝集の防止に有効であることが確認できた。

クロルピリフォスの濃度制御の方法として、クロルピリフォス蒸気の発生装置へ送るバブリングのための発生空気とキャリア空気の流量を調整することによりクロルピリフォス蒸気の発生量を制御する方法を採用した。この制御装置、発生装置、クロルピリフォス蒸気をラインミキサーに送気するための加熱配管、ラインミキサー、全身暴露型の吸入チャンバー、濃度測定のためのサンプリング装置を組み合わせ、吸入暴露システムを構築した。この暴露システムを用いてクロルピリフォスの6時間と22時間の試運転を繰り返し、バブリングのための発生空気とキャリア空気の流量の設定条件を検討した。なお、発生容器の加熱温度と加熱配管の温度は、クロルピリフォスは160℃以上で分解することを考慮して、融点(42℃)以上のでできるだけ低い温度50℃を選択した。その結果、目標吸入暴露濃度0.07 ppbの吸入装置は発生空気の流量を0.15 L/分、キャリア空気の流量を0.075 L/分、目標吸入暴露濃度0.21 ppbの吸入装置は発生空気の流量を0.34 L/分、キャリア空気の流量を0.17 L/分、目標吸入暴露濃度0.7 ppbの吸入装置は発生空気

の流量を0.80 L/分、キャリア空気の流量を0.40 L/分に設定することによって、目標濃度に近いクロルピリフォスの吸入暴露実験ができると推測した

この設定条件を用いて、目標吸入暴露濃度0.07、0.21および0.7 ppbで、6時間/日、7日間および22時間/日、7日間のクロルピリフォスの吸入暴露試験を行った。その結果、6時間/日、7日間試験では、目標暴露濃度0.07、0.21および0.7 ppbに対し、吸入チャンバー内の測定値の平均±標準偏差(最低～最高値、目標濃度に対する%)は、それぞれ0.069±0.006 ppb(0.051 ppb～0.082 ppb、98%)、0.237±0.008 ppb(0.214 ppb～0.273 ppb、113%)および0.649±0.015 ppb(0.623 ppb～0.706 ppb、93%)であった。また、22時間/日、7日間試験では、目標暴露濃度0.07、0.21および0.7 ppbに対し、吸入チャンバー内の測定値の平均±標準偏差(最低～最高値、目標濃度に対する%)は、それぞれ0.070±0.006 ppb(0.057 ppb～0.102 ppb、100%)、0.247±0.004 ppb(0.202 ppb～0.312 ppb、118%)および0.750±0.014 ppb(0.696 ppb～0.845 ppb、107%)であった。

吸入チャンバー内のクロルピリフォス濃度は固相吸着-溶媒抽出法により測定した。すなわち、捕集管(XAD-2 OVS Tube, SKC, Inc)に吸入チャンバー内の空気を吸引し、捕集剤からクロルピリフォスを溶媒抽出しガスクロマトグラフを用いて分析した。捕集時間は、6時間、22時間捕集とも破過が起きないことから暴露開始から終了までの全時間とするのが適切と考えられた。また、同時に測定した捕集