

析、薬学会第 129 年会、2009 年 3 月

菅野 純、相_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

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

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

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

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

(1) 特許第 3995099 号、2007 年 8 月 10 日登録、高次元データを塊に分割する装置

(2) 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

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を目的として、パラジクロロベンゼン、テトラデカン、クロルピリホス、ダイアジノンを対象とし、室内濃度指針値（パラジクロロベンゼンとテトラデカンは40 ppb、クロルピリホスは0.07 ppb、ダイアジノンは0.02 ppb）を考慮した濃度でマウスに吸入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・昇華させる方式（加熱・昇華法）、テトラデカンは加熱バブリングにより気化させる方式（加熱・バブリング法）により、両者とも40、120および400 ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。また、クロルピリホスは、微細な気泡でバブリングしクロルピリホスを安定して気化させる方式を考案し、0.07、0.21および0.7 ppbの目標濃度で吸入暴露する方法（改良加熱・バブリング法）を開発した。ダイアジノンについては、低温下でバブリングし少量のダイアジノンを安定して気化させる方式（冷却・バブリング法）により、0.02、0.07および0.2 ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。

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）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。

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、溶剤や洗浄剤として使用され、また、灯油に含まれているテトラデカン、農薬として使用されているクロルピリホスとダイアジノンを対象として、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とテトラデカンは、室内濃度指針値である40ppbを考慮し40、120および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。クロルピリホスは、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。ダイアジノンは、室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮し0.02、0.07および0.2 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および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パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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濃度測定のためのサンプリング装置(図 パラジクロロベンゼン-1のI)によって構成した。

2) 吸入チャンバー (図 共通-1)

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、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 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およ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および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および400 ppbで、6時間および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 (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 (日電理化学硝子製) 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 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℃→(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1μLとした。

B-2 テトラデカン

テトラデカンを40、120および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テトラデカン-1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 テトラデカン-1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 テトラデカン-1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 テトラデカン-1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 テトラデカン-1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およ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および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および400 ppbで、6時間および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ボ

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(日電理化学硝子製)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℃→(20℃/min)→220℃(5min)、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-3 クロルピリホス

クロルピリホスを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 クロルピリホスの吸入暴露システム

1) クロルピリホスの吸入暴露装置の概要

吸入暴露装置のシステムを図クロルピリホス-1に示した。吸入暴露装置は、①クロルピリホス蒸気の発生装置へ送る発生空気、キャリアー空気の流量制御装置(図クロルピリホス-1のA)、

②クロルピリホス蒸気の発生装置（図クロルピリホス-1のB）、③クロルピリホス蒸気をラインミキサーに送気するための加熱配管（図クロルピリホス1のC）、④クロルピリホ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（図クロルピリホス1のD）、⑤動物をクロルピリホス蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー（図クロルピリホス-1のE）、⑥濃度測定のためのサンプリング装置（図クロルピリホス-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、吸入曝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 被験物質

クロルピリホス（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ホスの特性をGC/MS (Agilent Technologies社 5973N) を用いて調べた結果、クロルピリホ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 クロルピリホスの発生方法の検討

クロルピリホスは融点が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

ピリホ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、クロルピリホスは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ホ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、ジャパンゴアテックス株式会社、GORE™チューブTB005（内径5.00±0.30mm、肉厚0.60±0.05mm、最大孔径3.5μm、穿孔率70±5%）を使用した。

また、発生したクロルピリホ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に、配管に加温装置を設けその効果を検討した。

2) クロルピリホ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、クロルピリホ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ホ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ホ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層及び2層)を取り出し、各々、かっ色バイアルビン(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 mmφ × 60m)、キャリアーガスはヘリウム、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。

B-4 ダイアジノン

ダイアジノンを0.02、0.07および0.2 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 ダイアジノンの吸入暴露システム

1) ダイアジノンの吸入暴露装置の概要

吸入暴露装置のシステムを図ダイアジノン-1に示した。吸入暴露装置は、①ダイアジノン蒸気の発生装置へ送る発生空気、キャリアー空気の流量制御装置(図ダイアジノン-1のA)、②ダイアジノン蒸気の発生装置(図ダイアジノン-1のB)、③ダイアジノン蒸気を一次希釈装置に

送気するための配管(図ダイアジノン-1のC)、④ダイアジノン蒸気を新鮮空気と混合・希釈するための一次希釈装置(図ダイアジノン-1のD)、⑤一次希釈したダイアジノン蒸気の各濃度の吸入チャンバーへの供給量を調整するフローコントロールバルブと流量計(図ダイアジノン-1のE) ⑥一次希釈したダイアジノン蒸気をさらに新鮮空気と混合・希釈するためのラインミキサー(図ダイアジノン-1のF)、⑦動物をダイアジノン蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー(図ダイアジノン-1のG)、⑧濃度測定のためのサンプリング装置(図ダイアジノン-1のH)を作製した。

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 被験物質

ダイアジノン(CAS No.: 333-41-5、別名: チオりん酸*O,O*-ジエチル-*O*-(2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジル))は、下記の試薬を使用した。

製造元: Sigma-Aldrich Corporation

ロット番号: 8170X、SZE8170X

純度: 98.3% (製造元FID分析値)

性状: 特徴的な臭気のある淡黄色の油状液体

沸点: 83~84℃

蒸気圧: 9.0×10^{-5} mmHg (25℃)

0.012 Pa (25℃)

比重: 1.1

保存条件: 冷蔵保存(120℃以上の温度では分解する)。

使用したダイアジノンの特性をGC/MS(Agilent Technologies社 5973N)を用いて調べた結果、ダイアジノ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。

3 ダイアジノンの発生方法の検討

1) ダイアジノンの発生方法の検討

ダイアジノンは常温で液体である。また、蒸気圧は0.012 Pa (25℃) であり、揮発しにくいですが、少量は気化する。このため、ダイアジノンを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。

発生容器内でダイアジノン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(図 ダイアジノン-2)。

バブリング部分の素材については、平成21年度に微小な泡を安定して発生させることができることがわかったゴアテックスチューブ(ジャパンゴアテックス株式会社、GORE™チューブTB005、内径 $5.00 \pm 0.30\text{mm}$ 、肉厚 $0.60 \pm 0.05\text{mm}$ 、最大孔径 $3.5\mu\text{m}$ 、穿孔率 $70 \pm 5\%$)を使用した(図 ダイアジノン-3)。

発生容器を入れる恒温槽の温度については、ダイアジノンは 120°C 以上で分解するため、できるだけ低い温度でバブリングする必要があるため、室温に近い 25°C に設定した。しかし、発生濃度が安定しないため、恒温槽の温度条件について検討した。

発生空気は、新鮮空気を使用したため、分解の可能性を検討するため、窒素ガスを発生空気とすることを検討した。

その他、バブリングにより発生させたダイアジノン蒸気中の変性、分解産物の存在の可能性について検討した。

2) ダイアジノンの濃度制御の方法の検討

目標吸入暴露濃度である0.02、0.07および0.2 ppbに濃度制御する方法について、ダイアジノン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。

4 吸入チャンバー内のダイアジノンの濃度測定の方法の検討

目標吸入暴露濃度0.02、0.07および0.2 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ダイアジノ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(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層及び2層)を取り出し、各々、かつ色バイアルビン(日電理硝子製)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。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7890A)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-5($0.25\text{mm}\phi \times 50\text{m}$)、キャリアーガスはヘリウムを用い、カラム温度は $80^\circ\text{C}(2\text{min}) \rightarrow (20^\circ\text{C}/\text{min}) \rightarrow 270^\circ\text{C}(1\text{min})$ 、注入口温度は 250°C 、検出器温度は 250°C 、検出器はFPD、試料注入量は $1\mu\text{L}$ 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 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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℃) に収納した (図 パラジクロロベンゼン-4)。

3 パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合および濃度制御の方法

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 パラジクロロベンゼン-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℃に温度維持した一次希釈装置 (柴田科学 (株) 特注、図 パラジクロロベンゼン-1のD、図 パラジクロロベンゼン-5) のフラスコ内に導入し、一次希釈空気 (図 パラジクロロベンゼン-1のE) で希釈混合した。流量計 (図 パラジクロロベンゼン-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 パラジクロロベンゼン-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 (表 パラジクロロベンゼン-1)。

設定条件 1: 恒温槽と一次希釈装置の温度を 25℃、発生機室の室温を 23℃、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 および 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、1.26、3.8 および 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 および 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%) および 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および発生機室の室温を 27℃、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た。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 および 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%) および 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および400 ppbのフローメータの流量を、それぞれ、1.86、5.5および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および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%) および 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および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%) および 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および400 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時間及び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 テトラデカン・1のA) のテトラデカンを循環式恒温槽で加熱 (24℃) しながら、清浄空気 (図 テトラデカン・1のB) のバブリングにより蒸発させた (図 テトラデカン・2)。この蒸気を清浄空気 (キャリア空気、図 テトラデカン・1のC) と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却 (18℃、図 テトラデカン・1

のD)、再加熱し (25℃、図 テトラデカン・1のE) した。なお、テトラデカンは引火温度が100℃であるため、加熱温度は室温に近い24℃とした。

3 テトラデカン蒸気の空気との混合および濃度制御の方法

上記2により発生したテトラデカン蒸気は、流量計 (図 テトラデカン・1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 テトラデカン・1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 (表 テトラデカン-1)。

設定条件1: 発生容器の温度を24℃、冷却温度を18℃、再加熱の温度を25℃、発生空気流量 (図 テトラデカン・1のB) とキャリアー空気流量 (図 テトラデカン・1のC) の比を3:1、希釈空気流量 (図 テトラデカン・1のH) を212 L/分とした。また、目標吸入暴露濃度40、120および400 ppbのフローメータの流量を、それぞれ、2.7、8.1および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および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%) および 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および400 ppbのフローメータの流量を、それぞれ2.12、5.6および23.5 L/分に下げ設定し、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および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%) および 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および400 ppbのフローメータの流量

を、それぞれ 1.83、5.3 よび 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 および 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%) および 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 の濃度を下げたため、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 および 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%) および 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の設定が設定条件 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 および 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%) および 343 ± 23 ppb (86%) であり、目標濃度 120 と 400 ppb は設定条件 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 および 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ 1.75、6.2 および 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 および 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%) および 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 および 400 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 時間及び 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 層へのテトラデカンの移行はなく、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-3 クロルピリホス

試作したクロルピリホスの吸入暴露装置を図ク
ロルピリホス-1 から 7 に示した。

1 クロルピリホスの発生方法

50°C に加温した恒温槽内に設置した発生容器 (図 クロルピリホス-3) で溶解させたクロルピリホスに、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、クロルピリホス蒸気を発生させた。

発生容器内でクロルピリホ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ホスの再凝集は認められず、この発生容器がクロルピリホ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ホ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°C の温水で加熱する装置を設けた (図 クロルピリホス-4、5)。その結果、配管内での再凝固は認められなかった。

微量のクロルピリホ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 μ m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 クロルピリホス-8)。各素材により発生する気泡の状態を図クロルピリホス-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 クロルピリホ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、クロルピリホ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 $^{\circ}$ Cとした。また、希釈空気流量は吸入チャンバーの換気回数を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 クロルピリホス-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するため、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/分とした。この条件で 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/分とした。この条件で 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/分の条件で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±0.011（目標濃度に対し251%）、0.246±0.014（目標濃度に対し117%）および0.883±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の濃度を下げるため、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ホ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層へのクロルピリホ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。

C-4 ダイアジノン

試作したダイアジノンの吸入暴露装置を図ダイアジノン-1から5に示した。

1 ダイアジノンの発生方法

恒温槽内に設置した発生容器（図ダイアジノン-2）にダイアジノンを入れ、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、ダイアジノン蒸気を発生させた。

発生容器内でダイアジノン蒸気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を用いた結果、発生容器内でダイアジノンの再凝集は認められず、この発生容器がダイアジノン蒸気の発生にも利用できることが確認できた。

微量のダイアジノン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としてゴアテックスチューブを用いた（図ダイアジノン-3）。その結果、ゴアテックスチューブの採用により微小な泡が安定して発生することが確認できた（図ダイアジノン-4）。

2 ダイアジノンの濃度制御の方法

目標吸入暴露濃度である0.02、0.07および0.2 ppbに濃度制御する方法について、ダイアジノン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、恒温槽の温度の設定条件を決定するために、設定条件を修正しながら試運転を行った。

なお、一次希釈空気の流量は20 L/分とした。また、一次希釈したダイアジノン蒸気の各濃度の吸入チャンバーへの供給量は、目標濃度の比に合わせ、0.02 ppb暴露群が1 L/分、0.07 ppb暴露群が3.5 L/分、0.2 ppb暴露群が10 L/分とした。吸入チャンバーへの新鮮空気の供給量は、換気回数が12回/時を確保できるように各吸入チャンバーとも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 ダイアジノン-1)。

設定条件 1：発生空気の流量を 0.50 L/分、キャリア空気の流量を 0.50 L/分、恒温槽 (図 ダイアジノン-5) の温度を 25℃、ダイアジノン蒸気の再加熱温度を 25℃とし、6時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.003 ± 0.001 (目標濃度に対し 16%)、 0.053 ± 0.003 (目標濃度に対し 75%) および 0.235 ± 0.011 (目標濃度に対し 117%) であった。0.02 と 0.07 ppb 群は目標濃度より低値、0.2 ppb 群は目標濃度に近い値であり、各濃度群の目標濃度との比に整合性がなかった。

設定条件 2：再現性を調べるため設定条件 1 と同条件で 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.010 ± 0.002 (目標濃度に対し 48%)、 0.072 ± 0.005 (目標濃度に対し 103%) および 0.312 ± 0.007 (目標濃度に対し 156%) であった。設定条件 1 と同条件での運転であったが、各濃度群とも前回より高い濃度になり、再現性が得られなかった。

再現性が得られなかった原因として、ダイアジノン蒸気が配管や吸入チャンバー内面に吸着した可能性があるため、下記の検討を行った。

- ① 暴露終了の翌日に、換気のみ行いながら発生装置の出口、配管の末端部、吸入チャンバー内の空気を捕集し、ダイアジノン濃度をガスクロマトグラフで分析した。
- ② ①の測定の後、吸入チャンバーの内面をアルコール噴霧し、高圧洗浄機で洗浄。その後換気のみ行いながら吸入チャンバー内の空気を捕集し、ダイアジノン濃度をガスクロマトグラフで分析した。

①、②とも、ダイアジノンは検出されなかった。従って、ダイアジノン蒸気が配管や吸入チャンバー内面に吸着した可能性は少ないと考えられた。

設定条件 3：空気のバブリングによって、ダイアジノンが変性あるいは分解した蒸気が発生した可能性を考え、発生空気とキャリア空気を新鮮空気から窒素ガスに変更し、設定条件 1 と同条件で 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.021 ± 0.000 (目標濃度に対し 103%)、 0.192 ± 0.009 (目標濃度に対し 275%) および 0.535 ± 0.031 (目標濃度に対し 268%) であり、前回および前々回よりもさらに高い値になった。

設定条件 4：発生空気とキャリア空気を窒素ガスから新鮮空気に戻し、設定条件 1 と同条件で再度 6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.030 ± 0.002 (目標濃度に対し 151%)、 0.348 ± 0.012 (目標濃度に対し 497%) および 1.199 ± 0.013 (目標濃度に対し 599%) であり、さらに高い値になった。

以上のように、設定条件 1 から設定条件 4 では安定したダイアジノン蒸気が発生を行うことができなかった。そこで、発生容器を入れた恒温槽 (図 ダイアジノン-5) の温度条件 (設定条件 1 から設定条件 4 では 25℃) について、検討した。通常のバブリングによる発生法では、蒸気発生を安定させるために恒温槽の温度を室温より高い条件で行ってきた (加温バブリング法)。しかし、ダイアジノンの保存条件は、冷蔵保存であることから、加温バブリング法を採用せず、室温より低い温度でバブリングする方法について検討した。

設定条件 5：恒温槽の温度を 20℃とし、発生空気の流量とキャリア空気の流量をこれまでの設定条件と同じ 0.50 L/分とし 3 時間の暴露運転を行った。なお、ダイアジノン蒸気の再加熱温度は 23℃とした。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.019 ± 0.000 (目標濃度に対し 96%)、

0.183±0.013（目標濃度に対し 258%）および 0.640±0.011（目標濃度に対し 320%）であり、前回より目標濃度に近い値になった。

設定条件 6: 恒温槽の温度をさらに下げ 15℃とした。また、発生空気の流量を 0.20 L/分、キャリア空気の流量を 0.40 L/分に下げ、14 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.040±0.002（目標濃度に対し 198%）、0.117±0.013（目標濃度に対し 167%）および 0.321±0.005（目標濃度に対し 160%）であり、前回より目標濃度に近い値になり、また、各設定濃度における目標濃度と実測値の比が近くなった。

設定条件 7: 恒温槽の温度をさらに下げ 10℃とした。また、発生空気とキャリア空気の流量を 0.26 L/分とし、6 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.021±0.002（目標濃度に対し 103%）、0.069±0.002（目標濃度に対し 99%）および 0.198±0.004（目標濃度に対し 99%）であり、各濃度群とも、目標濃度に近似した条件が得られた。

設定条件 8: 22 時間暴露での有効性を確認するために、設定条件 7 と同条件で 22 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 ppb の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.018±0.000（目標濃度に対し 92%）、0.066±0.001（目標濃度に対し 95%）および 0.211±0.003（目標濃度に対し 106%）であり、22 時間暴露でも、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られることを確認した。

3 吸入チャンバー内のダイアジノンの濃度測定の方法

目標吸入暴露濃度 0.02、0.07 および 0.2 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 層へのダイアジノン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 20% 以内であり、安定した結果が得られた。

D. 考察

D-1 パラジクロロベンゼン

本研究のために、①パラジクロロベンゼン蒸気の発生装置、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、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、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、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によって構成される吸入暴露システムを試作した。この吸入暴露システムを使用して、①パラジクロロベンゼン蒸気の発生方法、②パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合および濃度制御の方法、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について検討した。

1) パラジクロロベンゼン蒸気の発生方法

パラジクロロベンゼン蒸気の発生方法は、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、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を選択し、発生装置を作製し検討した。すなわち、恒温槽（27℃）に収納した発生容器内に固体のパラジクロロベンゼンを入れ、清浄空気を供給しパラジクロロベン

ゼンを気化させると共に、キャリアー空気を流す装置を作製し、試運転した。その結果、パラジクロロベンゼン蒸気を再結晶せずに発生させることが出来ることがわかった。

2) パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合および濃度制御の方法

上記 1) で作製した発生装置を用いて、吸入暴露装置を構築し、パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合および濃度制御の方法について検討した。すなわち、発生装置により作ったパラジクロロベンゼン蒸気を循環式恒温槽で一次希釈空気を用いて希釈混合、流量計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と混合、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む吸入装置を作製した。この装置を使用して、目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb で 6 時間および 22 時間吸入暴露するための設定条件について検討した。その結果、恒温槽と一次希釈装置の温度および発生機室の室温を 27℃、発生空気流量を 0.2 L/分、キャリアー空気流量を 5 L/分、一次希釈空気流量を 20 L/分、二次希釈空気流量を 212 L/分、目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、1.87、5.9 および 17.7 L/分に設定すると、実測値と目標濃度との差が各濃度とも 10%以内となった。従って、この設定条件で目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb の暴露試験が可能であると考えられた。

この条件を用いて、目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb で、6 時間/日、7 日間および 22 時間/日、7 日間のパラジクロロベンゼン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 40、120 及び 400 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) は、それぞれ 39±2 ppb (36 ppb～42 ppb)、119±10 ppb (108 ppb～137 ppb)

及び 387±32 ppb (351 ppb～443 ppb) であった。また、22 時間/日、7 日間試験では、目標暴露濃度 40、120 及び 400 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) は、それぞれ 40±5 ppb (34 ppb～47 ppb)、120±13 ppb (107 ppb～141 ppb) 及び 404±50 ppb (342 ppb～465 ppb) であった。

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

吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼン濃度は固相吸着-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、捕集剤からパラジクロロベンゼンを溶媒抽出し分析した。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管の間の測定値のばらつきは10%以内であり、安定した測定結果が得られることが分かった。吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼン濃度は、最低濃度である 40 ppb 群でも ppb 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パラジクロロベンゼン濃度の把握に有効であった。

以上のように、パラジクロロベンゼンを被験物質とし、室内濃度指針値である 40 ppb を考慮した 40、120 および 400 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、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が極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

D-2 テトラデカン

1) テトラデカン蒸気の発生方法

被験物質供給装置の発生容器内のテトラデカンを循環式恒温槽で加熱 (24℃) しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させ、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（18℃）に冷却後、循環式恒温槽で一定温度に再加熱（25℃）する方法により、テトラデカン蒸気を得ることができた。

2) テトラデカン蒸気の空気との混合および濃度制御の方法

上記 1) で作製した発生装置を用いて、吸入暴露システムを構築し、テトラデカン蒸気の空気との混合および濃度制御の方法について検討した。すなわち、発生装置により作ったテトラデカン蒸気を流量計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、新鮮空気と混合し設定濃度とした後、吸入チャンバーに送り込む吸入装置を作製した。この装置を使用して、目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb で 6 時間および 22 時間吸入暴露するための設定条件について検討した。その結果、発生容器の温度を 24℃、冷却温度を 18℃、再加熱の温度を 25℃、発生空気流量とキャリアー空気流量の比 3:1、希釈空気流量を 212 L/分、目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、1.75、6.2 および 29.1 L/分に設定すると、実測値と目標濃度との差が各濃度とも 10%以内となった。従って、この設定条件で目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb の暴露試験が可能であると考えられた。

この条件を用いて、目標吸入暴露濃度 40、120 および 400 ppb で、6 時間/日、7 日間および 22 時間/日、7 日間のテトラデカン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 40、120 及び 400 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）は、それぞれ 39 ± 3 ppb（36 ppb～44 ppb）、 123 ± 13 ppb（107 ppb～144 ppb）及び 422 ± 46 ppb（386 ppb～497 ppb）であった。また、22 時間/日、7 日間試験では、目標暴露濃度 40、120 及び 400 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）は、それぞれ 46 ± 8 ppb（35 ppb～53 ppb）、 128 ± 15 ppb（107 ppb～152 ppb）及び 383 ± 38 ppb（332 ppb～427 ppb）であった。

3) 吸入チャンバー内のテトラデカンの濃度測定の方法

吸入チャンバー内のテトラデカン濃度を固相吸着-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、捕集剤からテトラデカンを溶媒抽出し分析した。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管の間の測定値のばらつきは多くが 10%以内であり、ほぼ安定した測定結果が得られることが分かった。吸入チャンバー内のテトラデカン濃度は、最低濃度である 40 ppb 群でも ppb 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テトラデカン濃度の把握に有効であると考えられた。

以上のように、テトラデカンを被験物質とし、室内濃度指針値である 40ppb を考慮した 40、120 および 400 ppb を目標暴露濃度とした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、加熱バブリング法（24℃）がテトラデカンの極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

D-3 クロルピリホス

クロルピリホ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。

クロルピリホスの発生装置については、クロルピリホスの特性、すなわち、常温では固体であり（融点が 41～42℃）、固体の状態では気化しづらい（25℃での蒸気圧は 0.0024Pa）ことか

ら、融点である42℃以上に加熱し液体状にしたクロルピリホスを空気中でバブリングし、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行った結果、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ホ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ホスの吸入暴露実験を行うために十分な量のクロルピリホ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、微量のクロルピリホ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検討した。すなわち、従来の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、微量のクロルピリホ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ホ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ホ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。

クロルピリホスの濃度制御の方法として、クロルピリホ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ホ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、クロルピリホ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ることで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、クロルピリホスは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ホ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日間のクロルピリホ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、吸入チャンパ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。

吸入チャンパー内のクロルピリホス濃度は固相吸着-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）に吸入チャンパー内の空気を吸引し、捕集剤からクロルピリホ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管の間の測定値のばらつきは10%以内であり、安定した測定結果が得られることが分かった。吸入チャンパー内のクロルピリホス濃度は、最低濃度である0.07 ppbでも測定が可能であり、今回の方法はクロルピリホスの極低濃度暴露実験で吸入チャンパー内の濃度の把握に有効であった。

以上のように、クロルピリホスを被験物質とし、室内濃度指針値である0.07 ppbを考慮した0.07、0.21および0.7 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、加熱・バブリング法により気化させる方法がクロルピリホスの極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

D-4 ダイアジノン

ダイアジノンを室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮し、0.02、0.07および0.2 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。

ダイアジノンの発生装置については、ダイアジノンの特性、すなわち、常温で液体であり、

蒸気圧は0.012 Pa（25℃）であり、揮発しにくい少量は気化するため、ダイアジノンを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。

このバブリング法による吸入暴露装置の試運転をした結果、発生容器を入れた恒温槽の温度を室温に近い25℃に設定した場合には、チャンパー内のダイアジノン濃度を安定させることができなかった。この理由として、配管や吸入チャンパー内面へのダイアジノンの吸着の可能性が考えられた。しかし、換気のみ行いながら、発生装置の出口、配管の末端部、吸入チャンパー内の空気を捕集し、ダイアジノン濃度をガスクロマトグラフで分析したが、ダイアジノンは検出されなかった。また、吸入チャンパー内の洗浄を行った後、再度運転したがダイアジノン濃度は安定しなかった。これらのことから、配管や吸入チャンパー内面へのダイアジノンの吸着が濃度の不安定性の原因とは考えられなかった。また、空気のバブリングによって、ダイアジノンが変性あるいは分解した蒸気が発生した可能性について検討するため、キャリア空気を新鮮空気から窒素ガスに変えて暴露運転を行ったが、不安定性の改善はみられなかった。このため、発生容器を入れた恒温槽の温度条件について検討した。これまでの極低濃度暴露の研究では、キシレン、テトラデカン、クロロピリホスについて、発生容器を入れる恒温槽の温度を室温または室温以上の温度にしてバブリングする方法である加温バブリング法を採用し、目的の暴露濃度を得ることができていた。ダイアジノンの保存条件は、冷蔵保存であることから、加温バブリング法を採用せず、室温より低い温度でバブリングする方法（冷却バブリング法）の可否について検討した。その結果、恒温槽の温度を10℃に冷却してバブリングする条件下で、6時間の暴露運転で目標吸入暴露濃度0.02、

0.07および0.2 ppbの吸入チャンバーの実測値がそれぞれ 0.021 ± 0.002 （目標濃度に対し103%）、 0.069 ± 0.002 （目標濃度に対し99%）および 0.198 ± 0.004 （目標濃度に対し99%）、22時間の暴露運転でも目標吸入暴露濃度0.02、0.07および0.2 ppbの吸入チャンバーの実測値がそれぞれ 0.018 ± 0.000 （目標濃度に対し92%）、 0.066 ± 0.001 （目標濃度に対し95%）および 0.211 ± 0.003 （目標濃度に対し106%）になり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた。従って、冷却バブリング法によって、ダイアジノンの室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮した0.02、0.07および0.2 ppbを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できることがわかった。

なお、発生容器内でダイアジノン蒸気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が有効であることが確認できた。また、微量のダイアジノンを安定して気化させるために、バブリング部分の素材として、ゴアテックスチューブが有効であることが確認できた。

吸入チャンバー内のダイアジノン濃度は固相吸着-溶媒抽出法により測定した。すなわち、捕集管（XAD-2 OVS Tube, SKC, Inc）に吸入チャンバー内の空気を吸引し、捕集剤からダイアジノン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管の間の測定値のばらつきは20%以内であり、安定した測定結果が得られることが分かった。吸入チャンバー内のダイアジノン濃度は、最低濃度である0.02 ppbでも測定が可能であり、今回の方法はダイアジノンの極低濃度暴露実験で吸入チャンバー内の濃度の把握に有効であった。

以上のように、ダイアジノンを被験物質とし、室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮した0.02、0.07および0.2 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、冷却・バブリング法により気化させる方法がダイアジノンの極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

E. 結論

パラジクロロベンゼンは固体を加熱・昇華させる方式（加熱・昇華法）、テトラデカンに加熱バブリングにより気化させる方式（加熱・バブリング法）により、両者とも40、120および400 ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。また、クロルピリホスは、微細な気泡でバブリングしクロルピリホスを安定して気化させる方式を考案し、0.07、0.21および0.7 ppbの目標濃度で吸入暴露する方法（改良加熱・バブリング法）を開発した。ダイアジノンについては、低温下でバブリングし少量のダイアジノンを安定して気化させる方式（冷却・バブリング法）により、0.02、0.07および0.2 ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。

参考文献

- NIOSH. 1994. Manual of analytical methods, 4th ed
- McLafferty FW. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. New York:John Wiley and Sons

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats. Inhalation Toxicology. 20: 961-971