

安彦行人、高橋祐次、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純

Percellome プロジェクト・オンライン解析システム[第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会]2011 年 7 月

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み [第 34 回日本高血圧学会総会]2011 年 10 月

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡

パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、第 34 回日本高血圧学会総会 SHR 学会合同シンポジウム(2011.10.22) (宇都宮)、口演

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics Project and its application to the studies on anticancer agents., 47th Congress of the European Societies of Toxicology, (2011.8.30) (Paris, France), poster

菅野 純

Percellome 解析：時間軸と用量軸の融合と絶対値による解析精度の向上、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.12) (横浜)、口演

菅野 純

Percellome Toxicogenomics Project の進捗と Chemical Biology としての毒性学、JSBi

応用システムバイオロジー研究会第 3 回  
応用システムバイオロジー研究会  
(2011.6.27) (福岡)、口演

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its application to studies on anticancer agents., the 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. (2011.3.8) (Washington D.C., USA), poster

Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Keicho N. Enhanced inflammatory response to formaldehyde in human bronchial epithelial cells. In: European Respiratory Society Annual Congress 2011, September 24 - 28, Amsterdam, Netherlands, 2011.

田中崇裕、櫻田紳策、加納圭子、鍋木康志、小林信之、慶長直人

結核患者における血漿ペプチドーム解析によるバイオマーカー探索. 第 34 回日本分子生物学会年会, 12 月 13-16 日, 横浜, 2011.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

菅野 純 (研究分担者) :

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

## Ⅱ. 分担研究報告書

平成23年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H23-化学-一般-001）  
化学物質の経気道暴露による毒性評価の迅速化、定量化、高精度化に関する研究  
—シックハウス症候群を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、及び  
中枢神経影響を包含する新評価体系の開発—  
分担研究報告書

分担研究課題：「シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露実験の実施」

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者 小川幸男 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部  
高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

### 研究要旨

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群の指針濃度ををはるかに超える高濃度であることから、動物試験からの毒性情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。この点に対し先行研究では、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質について指針値レベルでの吸入毒性試験（1～7日間）を実施し、遺伝子発現変動を肺及び肝について網羅的に観測し、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響が高感度に捕捉された。この成果を踏まえ本研究の目的は、第一に、極低濃度下での比較的長期暴露（7～28日間）後の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データの予見性を確認することにある。第二に、シックハウス症候群等において通常の検査からは病因が特定されない「不定愁訴」の分子実態を把握することにある。本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、形態観察のための長期暴露実験、すなわち22時間/日 x 28日間反復暴露のプロトコールにより実施し、加えて第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である6時間/日 x 7日間反復暴露及び22時間/日 x 7日間反復暴露の2種類のプロトコールにより実施する。

平成23年度（今年度）は、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）について極低濃度下（0、0.1、0.3及び1.0 ppm）での6時間/日 x 7日間反復、22時間/日 x 7日間反復、及び22時間/日 x 28日間反復吸入暴露をマウスに対して実施した。その結果、0.1、0.3および1.0 ppmの目標暴露濃度に対して、前二者の場合は、5℃の冷却下でバブリングにより気化させる方法（冷却バブリング法）により、それぞれ平均0.10、0.31、1.10 ppm及び0.10、0.30、1.03 ppm及び、後者のプロトコールでは、35℃に加熱することにより気化させる方法（加熱バブリング法）により、0.09、0.29、0.99 ppmと、目標暴露濃度に近似した値にて、ホルムアルデヒドをマウスに安定して吸入暴露することができた。

## A. 研究目的

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群の指針濃度をはるかに超える高濃度であることから、動物試験からの毒性情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。この点に対し先行研究では、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質について指針値レベルでの吸入毒性試験（1～7日間）を実施し、遺伝子発現変動を肺及び肝について網羅的に観測し、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響が高感度に捕捉された。この成果を踏まえ本研究の目的は、第一に、極低濃度下での比較的長期暴露（7～28日間）後の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データの予見性を確認することにある。第二に、シックハウス症候群等において通常の検査からは病因が特定されない「不定愁訴」の分子実態を把握することにある。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、形態観察のための長期暴露実験、すなわち22時間/日 x 28日間反復暴露のプロトコールにより実施し、加えて第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である6時間/日 x 7日間反復暴露及び22時間/日 x 7日間反復暴露の2種類のプロトコールにより実施する。今年度は、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）について室内濃度指針値を考慮し、0.1、0.3及び1.0 ppmを目標暴露濃度として極低濃度吸入暴露を実施した。

## B. 研究方法

### B-1：被験物質

ホルムアルデヒド（formaldehyde；分子量：30.03、CAS No.：50-00-0、別名：メタナル、オキシメタン、酸化メチレン）は、下記の試薬

を使用した。

製造元：和光純薬工業株式会社

試薬名：ホルムアルデヒド液

カタログ番号：064-00406

ロット番号：DCR2374

ホルムアルデヒド濃度：37%（メタノールを7.4%含有、ギ酸含量0.04%以下）

沸点：-19.2℃

蒸気圧：1.33 kPa（-88℃）

比重：0.815

使用したホルムアルデヒドの特性をGC/MS（日立製作所 M-80B）を用いて調べた結果、ホルムアルデヒド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。

### B-2：ホルムアルデヒドの吸入暴露システム

B-2-1：6時間/日 x 7日間反復及び、22時間/日 x 7日間反復実験の場合：

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

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ホルムアルデヒド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1のA）、②ホルムアルデヒド蒸気の発生装置（図1のB）、③ホルムアルデヒド蒸気を一次希釈装置に送気するための配管（図1のC）、④ホルムアルデヒド蒸気を新鮮空気と混合・希釈するための一次希釈装置（図1のD）、⑤一次希釈したホルムアルデヒド蒸気の高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1のE）⑥一次希釈したホルムアルデヒド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1のF）、⑦動物をホルムアルデヒド蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー（図1のG）、⑧濃度測定のためのサンプリング装置（図1の

H) を作製した。

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1,060 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(0.1 ppm暴露群、0.3 ppm暴露群、1.0 ppm暴露群および対照群)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。

B-2-2: 22時間/日 x 28日間反復実験の場合:

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

ホルムアルデヒドガスの発生法には、1) パラホルムアルデヒドを加熱する、2) 希釈液を加熱した空気と共に加熱したチャンバー内へスプレーする、3) ホルムアルデヒド希釈液内に空気を送り込みバブリングさせて蒸気を発生させる、4) 市販の標準ガスボンベを用いるなどの方法がある。ここでは先行研究での検討の結果、もっとも安定して発生する事ができる、3) ホルムアルデヒド希釈液内に空気を送り込みバブリングさせて蒸気を発生させる方法、を選択した。具体的には、所有するバブリングによる発生装置(柴田科学、Photo 1)を用いてガスを発生する方法を採用した。35℃に加温した発生装置内タンクへホルムアルデヒド液(37%、和光

純薬)を希釈して入れ、これに発生空気を送りバブリングによりガスを発生させ、このガスを希釈空気により希釈を加え、横層流型チャンバー(柴田科学、Photo 1)内へ空調(温度:25±2℃、湿度:55±5%)され活性炭を通した清浄な換気空気によりさらに希釈し目的濃度まで低下させ、ステンレス製網ケージ(柴田科学、Photo 3)内に収容したマウスに1日あたり22時間(午後12時より午前10時まで)、28日間吸入暴露した。本研究で以後使用するチャンバーは、横層流型(容積3 m<sup>3</sup>、Photo 1)とし、チャンバー内にサーキュレーター(Photo 3)を設置し強力に空気を攪拌した状態で動物への暴露を行うこととした。

B-3: ホルムアルデヒドの発生方法

B-3-1: 6時間/日 x 7日間反復及び22時間/日 x 7日間反復実験の場合:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

ホルムアルデヒドの発生装置については、ホルムアルデヒドの特性、すなわち、常温でホルムアルデヒド水溶液(ホルマリン)として液体に溶解しており、このため、ホルムアルデヒド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。

吸入チャンバーの換気流量は20 L/minに設定し、発生空気の流量は0.6 L/min、キャリアー空気流量は0.6 L/minで再希釈用の被験物質供給装置に導入した。その装置内でさらに20 L/minの清浄空気を用いて再希釈し、吸入チャンバーに設定流量(1.7 L/min)で供給した。

被験物質の発生に関しては、少量の被験物質を発生可能な小型発生器を用いた(図2)。

微量のホルムアルデヒド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は、ゴアテックスチューブ（ジャパングアテックス株式会社、GORETMチューブTB005、内径5.00±0.30mm、肉厚0.60±0.05mm、最大孔径3.5mm、穿孔率70±5%）を使用した（図3）。

発生容器を入れる恒温槽の温度については、ホルムアルデヒド安定的に発生する温度である5℃に設定した。

B-3-2：22時間/日 x 28日間反復実験の場合：

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

発生方法については、先行研究での検討の結果、ホルムアルデヒドガスの低濃度を安定的に得られるバブリング方式が最適であったため、この手法を選択した。ホルムアルデヒドガスは、10倍希釈液をバブリングすることで目標濃度を達成することが可能であった。先行研究にて、マウス被毛へのガス吸着が濃度低下を引き起こし、小型チャンバーの発生機（柴田科学、Photo 2）では吸着量を上回るホルムアルデヒドガスの発生は計算上不能であったため、横槽流チャンバーとその発生機（柴田科学、Photo 1）を用いることとした。さらに、横槽流チャンバー内にサーキュレーター（ボルネード、Photo 3）を設置し、内部空気を強力に攪拌することで、マウス被毛へのガス吸着による濃度の不均一を解消する工夫をした。発生流量を4.0L/分とし、供給流量はチャンバー内のホルムアルデヒド濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度1.0ppmに対して2.92～4.50L/分、0.3ppmには0.82～1.18L/分、0.1ppmには0.29～0.40L/分とし、一次希釈流量40L/分及びチャンバー換気流量650L/分で希釈し暴露した。

B-4：ホルムアルデヒドの吸入チャンバー内の濃度測定の方法

B-4-1：6時間/日 x 7日間反復及び22時間/日 x 7日間反復実験の場合：

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

B-4-1-A：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2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管LpDNPH H30（カタログ番号：505323 スペルコ社）を吸入チャンバー内に挿入し、6時間、吸入チャンバー内のホルムアルデヒドを捕集した。

B-4-1-B：捕集管の前処理及び分析条件

捕集管で捕集したホルムアルデヒドは、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、ホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集管内に生成させた（図4, 5）。反応・生成したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル（HPLC分析用 和光純薬工業株式会社）20mLによりメスフラスコに抽出し、濃度に応じて希釈調製し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）（LC-10 島津製作所）により分析を実施した（図6）。

HPLCの分析条件は、移動相組成はアセトニトリル：蒸留水=60：40、流量は1mL/min、カラムはL-column ODS（4.5mm φ × 150mm、粒径：5 μm（財）化学物質評価研究機構）、検出波長はUV260nm、試料注入量は10 μLとした。また、検量線はホルムアルデヒドの量を換算したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの標準品ホルムアルデヒド-DNPH（カタログ番号：4M7177 スペルコ社）を用い、0.1～10 μg/mLの範囲で検量線を作成した。

B-4-2：22時間/日 x 28日間反復実験の場合：

被験物質の捕集の部分は、国立医薬品食品衛

生研究所・毒性部において実施し、捕集管の前処理及び分析は、日本バイオアッセイ研究センターに依頼した。

ホルムアルデヒドガスの濃度検知は、チャンバー内濃度について、定流量ポンプ(MPΣ-30(柴田科学)、Photo 4)により捕集管LpDNPH S10L(カタログ番号: 505361-U、スペルコ社)へチャンバー内空気を通し、捕集管内に充填されているDNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine をコーティングした球状シリカゲルビーズ)にアルデヒドを吸着させ、溶媒(アセトニトリル)で抽出し、液体クロマトグラフを用いてその濃度を測定する、「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する方法によりおこなった。捕集管流量は、対照群及び0.1ppm暴露群では500mL/分[660L]、0.3ppm暴露群では100mL/分[132L]、1.0ppm暴露群では60mL/分[66.0L]とした。22時間/日×28日間暴露に際し、暴露期間中毎日、マウスへの22時間暴露中のチャンバー内空気を捕集した捕集管を、冷蔵下で測定機関(日本バイオアッセイ研究センター)に送付し、分析を依頼した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、所属する研究機関の指針を遵守した。

### C. 研究結果及び考察

C-1: 6時間/日 x 7日間反復及び22時間/日 x 7日間反復実験の場合

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

試作したホルムアルデヒドの吸入暴露装置を図2、3及び7に示した。

C-1-A: ホルムアルデヒドの濃度制御の方法の

#### 検討

目標吸入暴露濃度である 0.1、0.3 および 1.0 ppm に濃度制御する方法について、ホルムアルデヒド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ー空気の流量、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、一次希釈したホルムアルデヒド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、0.1 ppm 暴露群が 1.7 L/分、0.3 ppm 暴露群が 5.2 L/分、1.0 ppm 暴露群が 17 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 15-17 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1)。

検討 1: 発生空気の流量を 0.50 L/分、キャリアー空気の流量を 0.50 L/分、恒温槽の温度を 5℃、ホルムアルデヒド蒸気の再加熱温度を 25℃とし、動物をチャンバー内に挿入(マウス Crlj:CD1(ICR) 日本チャールス・リバー(株) 厚木飼育センター 6週齢 各群それぞれ12匹)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 0.1、0.3 および 1.0 ppm の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.086ppm (目標濃度に対し 86%)、0.27ppm (目標濃度に対し 90%) および 0.94ppm (目標濃度に対し 94%) であった。0.1ppm 群は目標濃度よりやや低値、0.3 ppm 群と 1.0ppm 群は目標濃度に近い値であった。

検討 2: 22 時間暴露での有効性を確認するために、検討 2 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 0.1、0.3 および 1.0 ppm の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.09ppm (目標濃度に対し 90%)、0.28ppm (目標濃度に対し 93%) および 1.08ppm (目標濃度に対し 108%) であり、22 時間暴露では、

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。

#### C-1-B: 吸入チャンバー内のホルムアルデヒドの濃度測定

目標吸入暴露濃度0.1、0.3および1.0 ppm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時間採気の両方で捕集管2本目へのホルムアルデヒド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15%以内であり、安定した結果が得られた。

具体的には、6時間の暴露運転で目標吸入暴露濃度0.1、0.3及び1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値（以下、平均値±標準偏差）がそれぞれ0.102±0.005 (0.098～0.112 ppm)（目標濃度に対し102%）、0.308±0.024 (0.266～0.344 ppm)（目標濃度に対し103%）および1.060±0.061 (1.007～1.173 ppm)（目標濃度に対し106%）、22時間の運転でも目標吸入暴露濃度0.1、0.3および1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値がそれぞれ0.101±0.003 (0.096～0.104 ppm)（目標濃度に対し101%）、0.301±0.021 (0.278～0.330 ppm)（目標濃度に対し100%）および1.028±0.050 (0.973～1.120 ppm)（目標濃度に対し103%）になり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた（図8A, B）。従って、冷却バブリング法によって、ホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08 ppmを考慮した0.1、0.3および1.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた。

#### C-2: 22時間/日 x 28日間反復実験の場合

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒

性部において実施した。

先行研究での検討結果を踏まえて、横槽流チャンバー内にサーキュレーター（ボルネード、Photo 3）を設置し、内部空気を強力に攪拌することにより、マウス被毛へのガス吸着による濃度の不均一を解消した。

発生流量を4.0L/分とし、供給流量はチャンバー内のホルムアルデヒド濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度1.0ppmに対して2.92～4.50L/分、0.3ppmには0.82～1.18L/分、0.1ppmには0.29～0.40L/分とし、一次希釈流量40L/分及びチャンバー換気流量650L/分で希釈し暴露した。目標吸入暴露濃度0.1、0.3及び1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値（以下、平均値±標準偏差）はそれぞれ、0.094±0.021 ppm (0.048～0.126 ppm)、0.290±0.074 (0.139～0.361 ppm)、0.987±0.242 (0.503～1.302 ppm)と、目標濃度に対しそれぞれ94%、97%、99%となり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた。従って、加熱バブリング法によって、ホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08 ppmを考慮した0.1、0.3および1.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた（図8C）。

また対照群チャンバー内濃度は0.0020±0.0006 ppm (1.99±0.81 μg/m<sup>3</sup> [25℃下でホルムアルデヒドは1 ppm = 1225.64 μg/m<sup>3</sup>])と低濃度群の0.987 ppmと比し極めて低い濃度であり、一般環境大気濃度0.26～10 μg/m<sup>3</sup>（平均値3.4 μg/m<sup>3</sup>）（環境省、2003）と動物室内はほぼ等しく、一般家庭の室内空気中で検出される濃度16～211ppb（平均値50ppb）（国土交通省、2003）を遙かに下回り、実験に影響はないものと考えられた。

・（環境省、2003）

環境省環境保健部環境安全課「平成14年度地方公共団体等における有害大気汚染物質のモニ



タリング調査結果（表7）」（2003）  
[http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/mo  
n\\_h14/hyo\\_07.html](http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/mo<br/>n_h14/hyo_07.html)

・（国土交通省、2003）

国土交通省住宅局住宅生産課「平成14年度室内  
空気中の化学物質の実態調査の結果について  
（2003）

[http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha03/07/0712  
19\\_.html](http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha03/07/0712<br/>19_.html)

#### D. 結論

平成23年度（今年度）は、ホルムアルデヒド  
（指針値：0.08 ppm）について極低濃度下（0、  
0.1、0.3及び1.0 ppm）での6時間/日 x 7日間反  
復、22時間/日 x 7日間反復、及び22時間/日 x 28  
日間反復吸入暴露をマウスに対して実施したそ  
の結果、その結果、0.1、0.3および1.0ppmの目  
標暴露濃度に対して、前二者の場合は、5℃の  
冷却下でバブリングにより気化させる方法（冷  
却バブリング法）により、それぞれ0.102±0.005、  
0.308±0.024、1.060±0.061及び、0.101±0.003、  
0.301±0.021、1.028±0.050、後者のプロトコ  
ールでは、35℃に加熱することにより気化させ  
る方法（加熱バブリング法）により、0.094±  
0.021、0.290±0.074、0.987±0.242（平均値  
±標準偏差）と、目標暴露濃度に近似した値に  
て、ホルムアルデヒドをマウスに安定して吸入  
暴露することができた。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1-1) 書籍

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi,  
Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Kiyoshi Sekita,

Atsuya Takagi and Satoshi Kitajima  
Chapter11 Application of Percellome  
Toxicogenomics to Food Safety Hormone-  
Disruptive Chemical Contaminants in Food, 2011,  
184-198. Editor(s): Ingemar Pongratz, Linda  
Bergander, Royal Society of Chemistry. ISBN:  
978-1-84973-297-0,  
DOI:10.1039/9781849732970-00184

###### 1-2) 学術雑誌

Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-  
ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Yuhji  
Taquahashi, Noriko Moriyama, Eriko Ikeno, Nae  
Matsuda, Yumiko Saga, Bruce Blumberg, and Jun  
Kanno  
Development of Humanized Steroid and  
Xenobiotic Receptor Mouse by homologous  
knock-in of the human Steroid and Xenobiotic  
Receptor Ligand Binding Domain sequence. J  
Toxicol Sci **37**: 373-380, 2012.

##### 2. 学会発表

北嶋 聡, 小川幸男, 長野嘉介, 相崎健一, 五十嵐勝  
秀, 高橋祐次, 安彦行人, 山本雅也, 菅野 純  
Percellome 法によるシックハウス症候群レベル  
の極低濃度暴露下での吸入トキシコゲノミクス  
[第38回日本トキシコロジー学会学術年会]2011  
年7月

種村健太郎, 五十嵐 勝秀, 松上稔子, 相崎 健  
一, 北嶋 聡, 菅野 純  
ヒト型リガンド結合ドメインノックイン PXR マ  
ウスの遺伝子発現応答特性 [第29回内分泌代謝  
学サマーセミナー] 2011年7月

種村 健太郎, 五十嵐 勝秀, 相崎 健一, 北嶋 聡,  
菅野 純  
中枢神経系の発生-発達期における神経活動かく  
乱による遅発性中枢影響解析  
-幼若期雄マウスへのアセフェートによる成熟後  
の脳高次機能障害について- [第38回日本トキ  
シコロジー学会学術年会]2011年7月

五十嵐 勝秀, 北嶋 聡, 相崎 健一, 菅野 純  
ヒト型 PXR 生理的発現マウス系の全身臓器トラ  
ンスクリプトーム解析 [第38回日本トキシコロ  
ジー学会学術年会]2011年7月

相崎 健一, 五十嵐 勝秀, 種村 健太郎, 安彦行

人、高橋祐次、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純  
Percellome プロジェクト・オンライン解析システム[第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会]2011 年 7 月

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡  
パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み [第 34 回日本高血圧学会総会]2011 年 10 月

#### G. 知的財産所有権の出願・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

表1 吸入暴露装置の設定条件とチャンバー内のホルムアルデヒドの濃度

	検討1	検討2
恒温槽の温度	5℃	5℃
発生空気の流量	0.6 L/分	0.6 L/分
キャリア空気の流量	0.6 L/分	0.6 L/分
一次希釈空気の流量	20 L/分	20 L/分
再加熱温度	23℃	23℃
目標濃度 0.1 ppm		
一次希釈ガスの供給量	1.7L/分	1.7 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.086 (86%)	0.09 (90%)
目標濃度 0.3 ppm		
一次希釈ガスの供給量	5.2 L/分	5.2 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.27 (90%)	0.28 (93%)
目標濃度 1.0 ppm		
一次希釈ガスの供給量	17 L/分	17 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.94 (94%)	1.08 (108%)
暴露時間	6時間	22時間
チャンバー内に導入した試験動物	マウス Crlj:CD1(ICR) 日本チャールス・リバー(株) 厚木飼育センター	マウス Crlj:CD1(ICR) 日本チャールス・リバー(株) 厚木飼育センター
週齢	6週齢	6週齢
使用した動物数	各群それぞれ12匹	各群それぞれ12匹

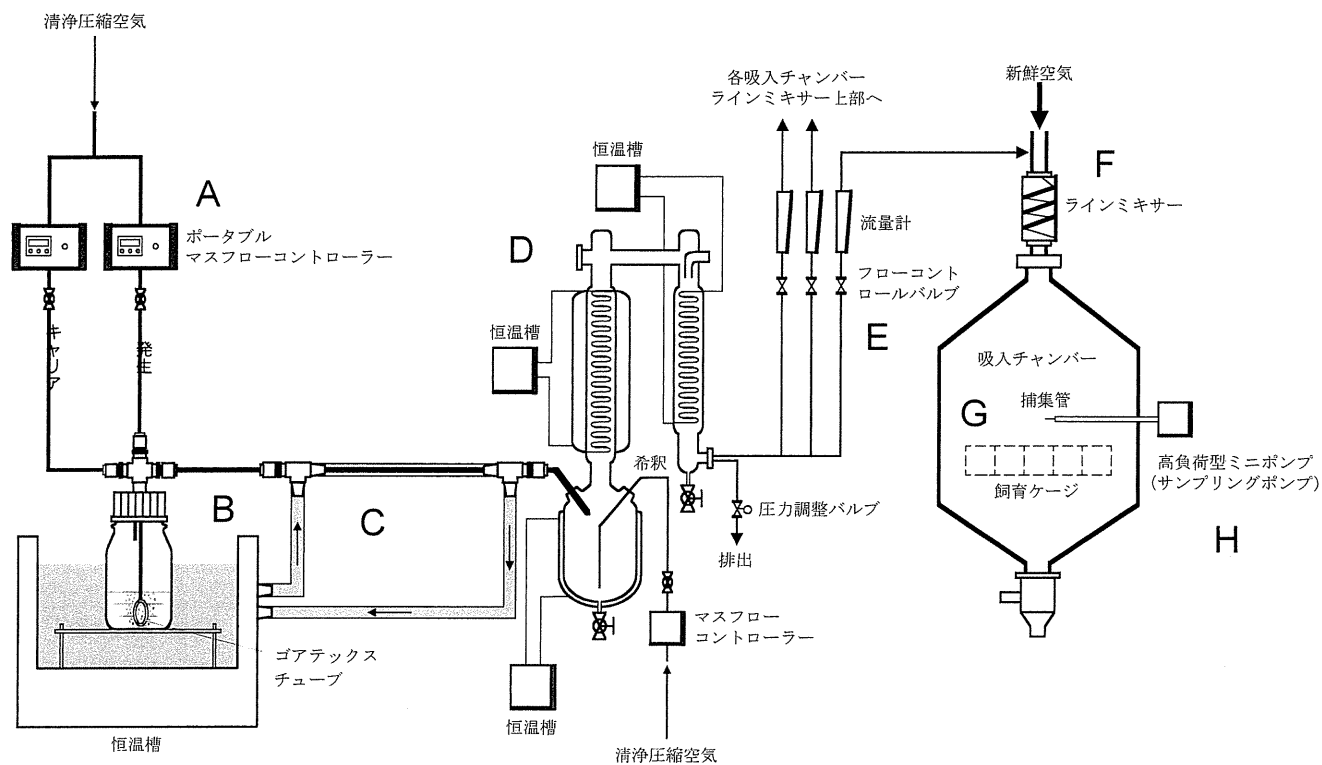


図1 吸入暴露装置のシステム (ホルムアルデヒド)

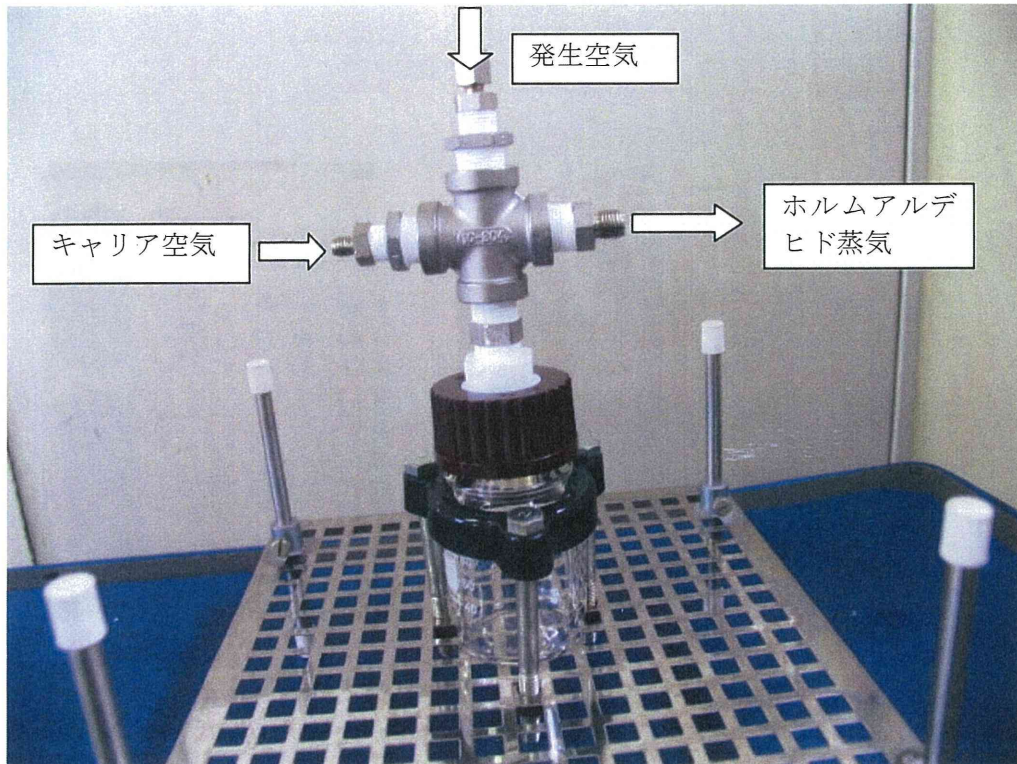


図2 ホルムアルデヒドの発生容器

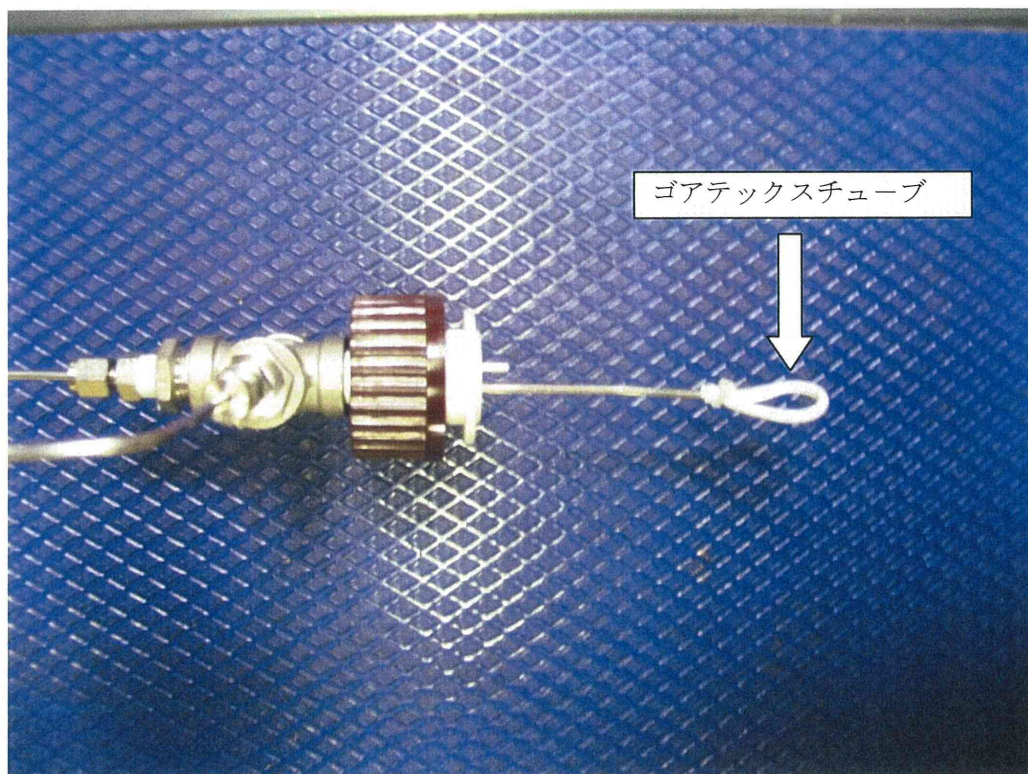


図3 ゴアテックスチューブ（矢印）を装着したバブリング部分





Photo 1 3m<sup>3</sup> 横層流大型チャンバー及びその発生装置 (柴田科学)



Photo 2 600L 縦層流大型 及び 30L 小型チャンバー (柴田科学)

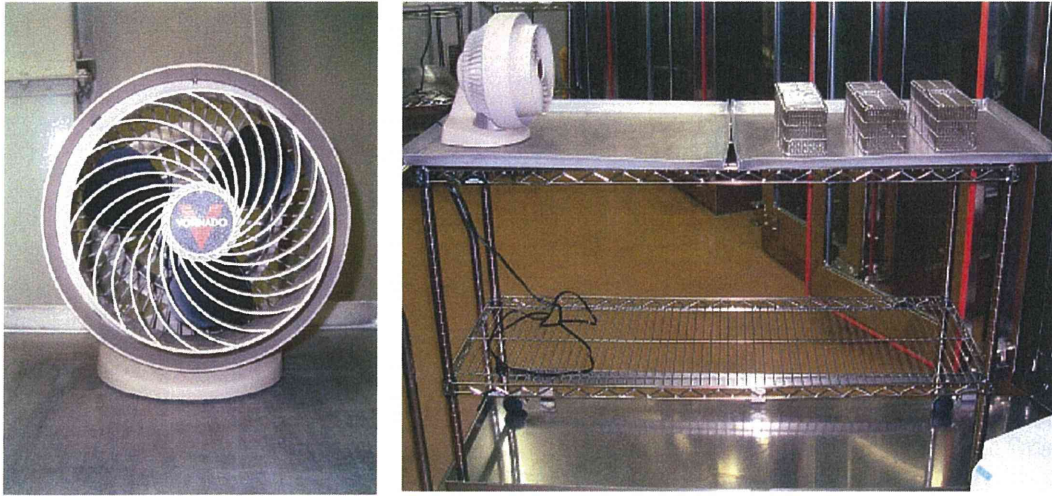


Photo 3 チャンバー内空気攪拌用サーキュレーター(ボルネード)、  
及び暴露ケージ(柴田科学)を載せた架台



Photo 4 捕集管採気用ポンプ MP  $\Sigma$ -30、(柴田科学)



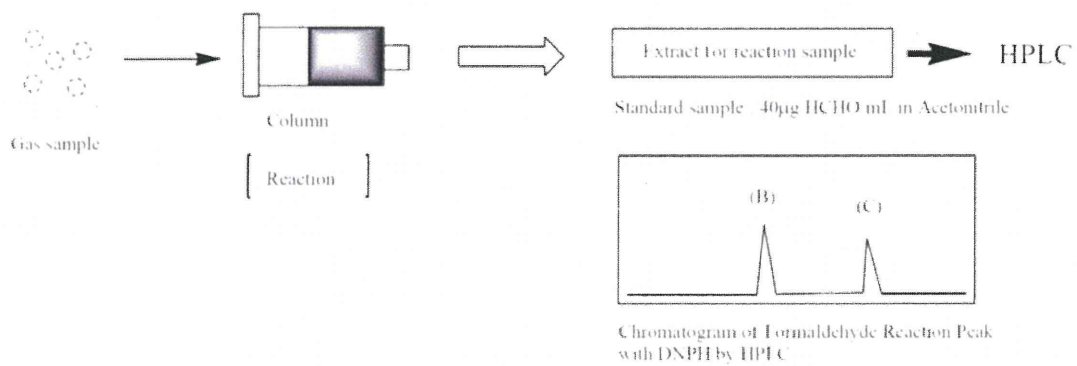
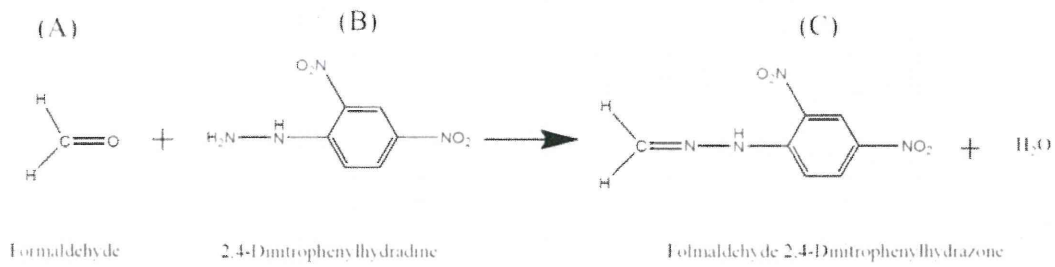


図 4. 捕集管内の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、捕集管内に生成したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの反応スキーム



図 5. ホルムアルデヒドを暴露し、捕集管に捕集され、反応した 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン



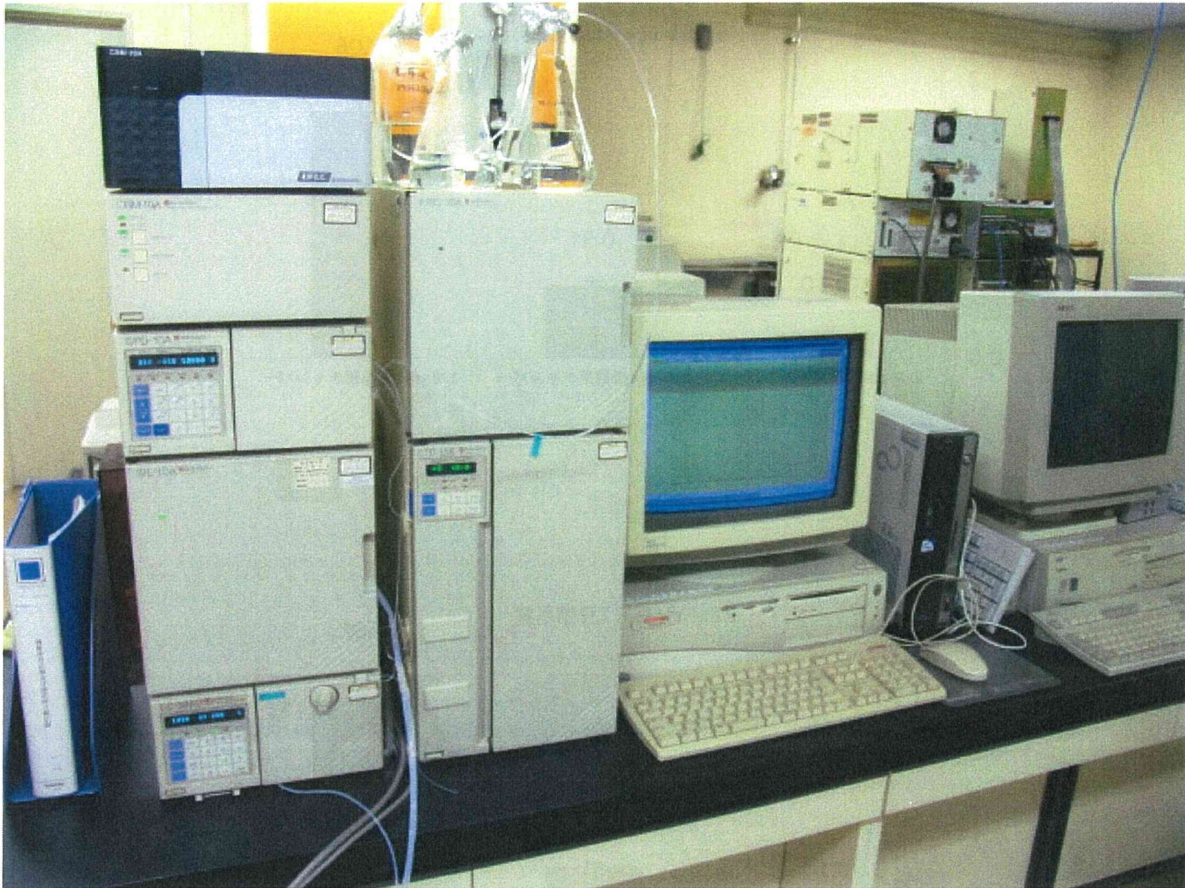


図 6. ホルムアルデヒドの分析に用いた高速液体クロマトグラフ

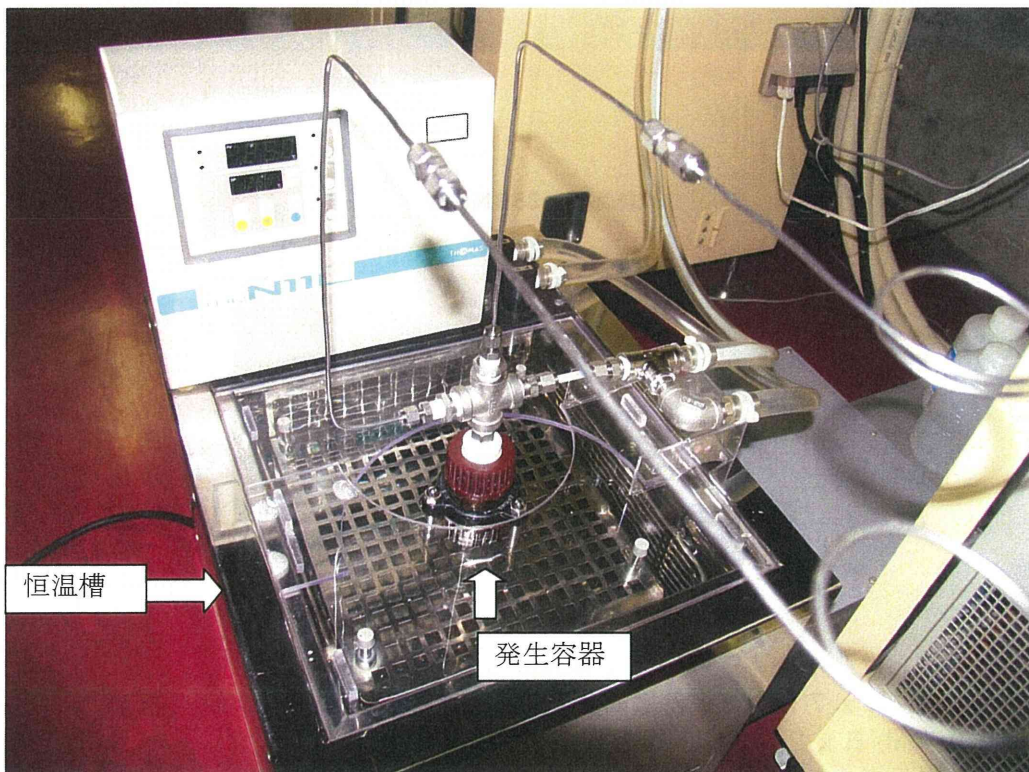


図 7. 恒温槽内に設置したホルムアルデヒドの発生

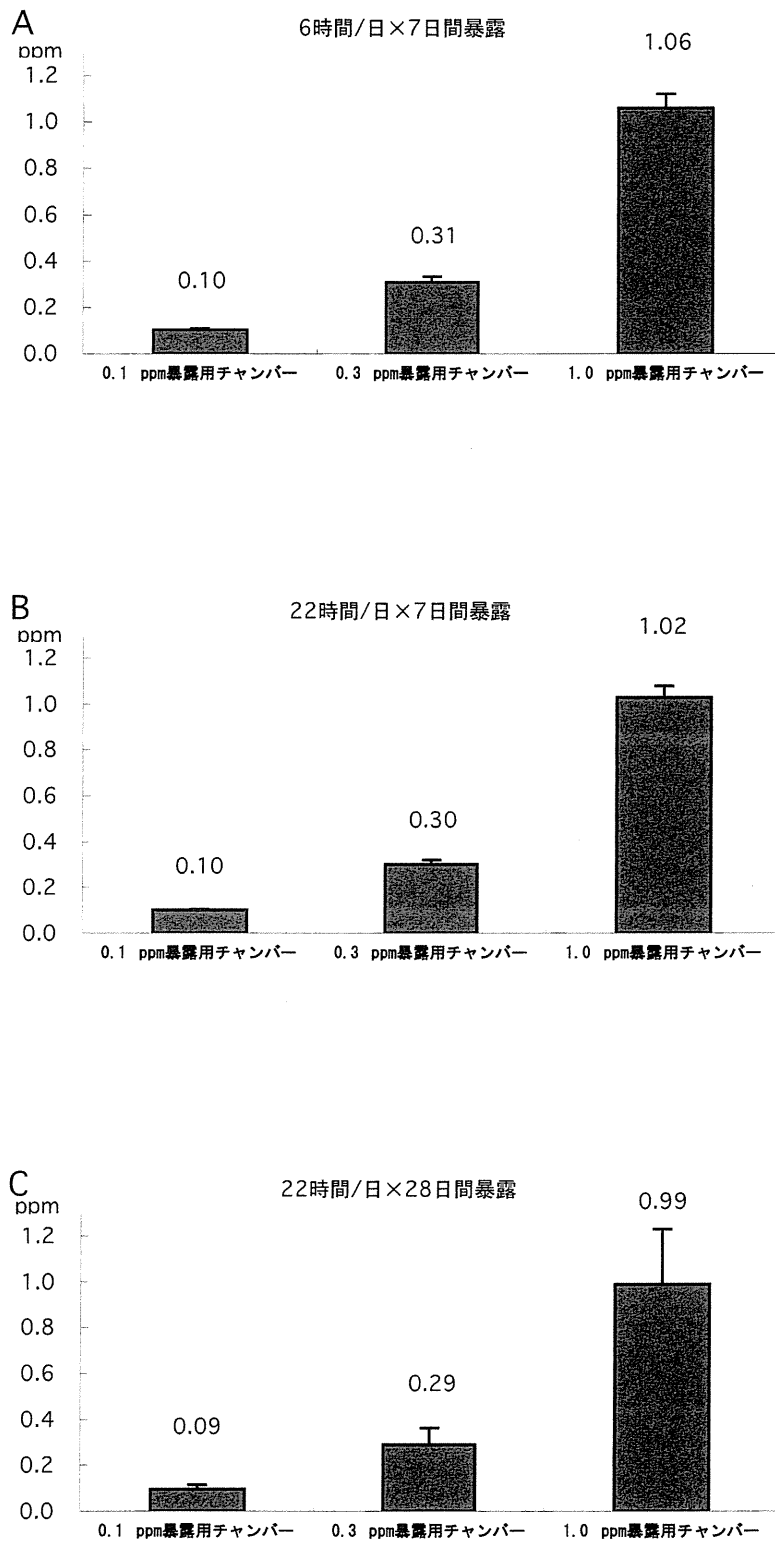


図8 本実験におけるホルムアルデヒド暴露濃度の測定結果  
 A: 6時間/日 x 7日間反復暴露の場合、B: 22時間/日 x 7日間反復暴露の場合、  
 C: 22時間/日 x 28日間反復暴露の場合 (平均値±標準偏差)。  
 平均値をグラフ中に記載した

## 委託研究報告書

I) ホルムアルデヒドのマウスを用いた極低濃度暴露試験

報告書

(6時間/日、7日間暴露)

試験番号 : 0778

CAS No. 50-00-0

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

## 要約

化学物質の極低濃度暴露による生体影響検出の技術開発を目的として、生活環境中の濃度に即した極低濃度のホルムアルデヒドを C57BL/6J 雄マウスに 6 時間/日、7 日間全身暴露（経気道投与）し、遺伝子発現解析用の肝、肺及び脳の組織を採取した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群 12 匹、合計 48 匹のマウスを用いた。暴露濃度は、0.1、0.3 及び 1 ppm とした。対照群は清浄空気による換気のみとした。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着－溶媒抽出法により測定した。1 回目暴露終了時、並びに暴露開始後 1 日目、3 日目及び 7 日目に各群 3 匹の動物を解剖し、肝、肺及び脳から遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルを採取するとともに、病理組織学的検査用サンプルを採取した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標暴露濃度 0.1、0.3 及び 1 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ  $0.102 \pm 0.005$  ppm (0.098 ppm～0.112 ppm)、 $0.308 \pm 0.024$  ppm (0.266 ppm～0.344 ppm) 及び  $1.060 \pm 0.061$  ppm (1.007 ppm～1.173 ppm)であった。

剖検と病理組織学的検査では、全動物とも肝、肺及び脳に特記すべき所見を認めなかった。

遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルは試験委託者に送付した。