

201329001A

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—

(H23-化学-一般-001)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 26(2014)年 3 月

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—

(H23-化学-一般-001)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 26(2014)年 3 月

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—
(H23-化学-一般-001)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 26(2014)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

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
ー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ー
北嶋 聡 1

II. 分担研究報告書 (別添 4)

1. 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
北嶋 聡 11

2. 人への外挿にかかわる臨床的解析、及びヒト気道上皮細胞系による毒性応答メ
カニズムの研究 ー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ー
慶長 直人 89

3. 吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、
インフォマティクス解析
菅野 純 93

4. 化学物質の極低濃度下での長期曝露による毒性確認に関する研究
大西 誠 105

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) 125

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (別添 6) 127

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）

平成25年度総括研究報告書

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-（H23-化学-一般-001）

研究代表者 北嶋 聡

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・室長

研究要旨

日常生活で暴露される様々な化学物質の毒性評価は、概ね実験動物における毒性所見を人に外挿することで実施されている。しかし、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と実験動物で検出可能な器質変化濃度の乖離が甚だしく、現行の実験動物の吸入毒性指標（器質的障害）を人へ外挿することは困難である。この問題に対し、先行研究「シックハウス症候群レベルの暴露を考慮した吸入毒性評価系に関する研究」（厚労科研費・化学物質リスク研究事業）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、器質的变化が誘発される以前の段階（時間的及び濃度的）での遺伝子発現変動を網羅的に評価可能な Percellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。

この成果を踏まえ、本研究は、第一に極低濃度下での比較的長期暴露時（28日間）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、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、を目的とする。先行研究にてシックハウス問題に関する検討会が掲げるホルマリンを含む13物質を対象に確立した極低濃度下の吸入暴露条件、及び肺と肝における遺伝子発現経時データベースを基に、本研究では28日間の吸入暴露後の電子顕微鏡による高精度な形態観察を行うとともに、肺・肝に加えて脳を対象臓器として、網羅的遺伝子発現プロファイルを取得し、多臓器連関の解析及びデータベース化を行う。加えて、ヒト気道上皮細胞系を用いた *in vitro* 解析系の構築を実施し、ヒトへの外挿性の向上を計る。

本研究の平成25年度の成果として、パラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について目標通りに極低濃度（0、0.04、0.12、0.4 ppm）での6時間/日×7日間、22時間/日×7日間、及び22時間/日×28日間マウス反復吸入暴露実験を実施し（北嶋）、経時的に採取した海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を網羅的に解析した（菅野）。その結果、22時間×7日間反復暴露の海馬において、初年度（平成23年度）のホルムアルデヒド及び昨年度（平成24

年度) のキシレン暴露と同様に、暴露期間中、神経活動の指標となる前初期遺伝子 (Immediate early gene: IEG) (Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Egr2、Cyr61、Ier2 及び Klf2 遺伝子等) の顕著な発現抑制が低用量群から、すなわち指針値レベルの濃度から認められ、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。また暴露休止後遅くとも 24 時間後には、逆に神経活動の活性化を示唆するリバウンド現象が認められた。6 時間×7 日間反復暴露の場合は、これらの遺伝子の発現抑制は 6 時間暴露直後に確認され、その後の観測点である暴露終了 16 時間目では毎日のリバウンド現象を示唆する所見を得た。肺或いは肝からの二次的シグナルが共通因子として海馬に作用する可能性を検討するため、3 物質の関連性を解析した結果、6 時間/日×7 日間反復暴露時の肺及び肝におけるインターロイキン 1 β 遺伝子の発現増加が 3 物質に共通して認められ、この分子が共通因子の候補と考えられた。3) 22 時間/日×28 日間反復暴露時の肺の透過型電子顕微鏡による形態解析を検討した結果、昨年度 (平成 24 年度) 実施したキシレン暴露時の肺の気道終末部の上皮細胞にクララ細胞の分泌顆粒の増加を示唆する所見を認めた。パラジクロロベンゼンにつき解析を進めており、今年度中に終了する (大西)。4) 人への外挿性向上を目指しヒト気道上皮細胞を用い、微生物関連物質 (polyI:C) とホルムアルデヒドとの IL-8 遺伝子の発現増強作用について、平成 25 年度は、ホルムアルデヒド以外のシックハウス関連の 4 物質について同様の検討を行い、クロルピリホスにも、ホルムアルデヒドと同様の IL-8 産生増強効果が認められる事を見いだした (慶長)。この事はこの *in vitro* 解析系が、人への外挿を含めて有用であることを示しているだけでなく、微生物由来物質の存在により、吸入暴露による症状が増強されることを示唆しており、吸入暴露による毒性を考える上で重要な知見と考える。また、海馬に対する二次シグナル候補であるインターロイキン 1 β は、IL-8 に比較し弱いながら、本解析系において産生増加傾向が示されており、今後の IEG との関連解析が期待された。

以上のごとく、シックハウスレベルの極低濃度の化学物質の吸入暴露に於いて、脳サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により、中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。特に、化学構造の異なる 3 物質 (ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン) に共通して示唆された海馬における神経活動の抑制所見は、本研究の目的の一つであるシックハウス症候群の「不定愁訴」の分子実態の一端を明らかにしたものと考えられ、その原因解明の手がかりとなる可能性がある。今後、より短い 2 時間単回暴露時の海馬の遺伝子発現変動を解析することにより、より詳細に神経活動抑制の上流に位置する因子の解明が進むものとする。この神経活動の抑制所見は、記憶をはじめとする情動認知行動異常を誘発する可能性が高く、情動認知行動解析と神経科学的物証の収集により、発生・発達期暴露も考慮に入れて、海馬に対する有害性の実証及び遺伝子発現変動データの予見性の確認について検討計画中である。

研究分担者

北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長
慶長 直人 公益財団法人 結核予防会
結核研究所 生体防御部
部長
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 部長
大西 誠 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
試験管理部 室長

A. 研究目的

日常生活で暴露される様々な化学物質の毒性評価は、概ね実験動物における毒性所見を人に外挿することで実施されている。しかし、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と、従来の実験動物で検出可能な器質変化濃度の乖離が甚だしく、現行の実験動物の吸入毒性指標(器質的障害)を人へ外挿することは困難である。この問題に対し、先行研究「シックハウス症候群レベルの暴露を考慮した吸入毒性評価系に関する研究」(厚労科研費・化学物質リスク研究事業)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、器質的变化が誘発される以前の段階(時間的及び濃度的)での遺伝発現変動を網羅的に評価可能な Percellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。

この成果を踏まえ、本研究は、第一に極低濃度下での比較的長期暴露時(28日間)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、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、を目的とする。この為に、肺・肝に加え中枢神経のトキシコゲノミクス解析を実施し、惹起される反応を抽出し、その後の超微形態解析等の標的の絞り込みを行う。

本研究により、1) 先行研究では検討対象外とした形質変化を、比較的長期の暴露の際には観測可能となる事が期待される。短い(1~7日間)暴露により発現が誘導された遺伝子と、比較的長期の暴露による肺の形質変化の関係、即ち形態学的に有害性が実証される事、2) 中枢神経系での遺伝子発現変動を検討することにより、人のシックハウス症候群において中心的な位置を占める「不定愁訴」の実態を把握・評価し得ること、が期待される。特に後者の「不定愁訴」あるいは「脳機能所見」について、規制決定の際の毒性情報として採用可能なものとするためのバリデーションに耐える評価系を提案する。これらの事項を通して、近年の技術革新の加速に伴い急増する「新規物質」の吸入毒性評価に際し中枢影響を含むかたちで、極低濃度での有害性を見逃しなく検出できるようになることが期待される。

B. 研究方法

先行研究にて、シックハウス問題に関する検討会が掲げるホルマリンを含む13物質を対象に確立した極低濃度下の吸入暴露条件、及び肺と肝における遺伝子発現経時データベースを基に、本研究では28日間の吸入暴露後の電子顕微鏡による高精度な形態観察を行うとともに、肺・肝に加えて脳を対象臓器として、網羅的遺伝子発現プロファイルを取得し、多臓器連関の解析及びデータベース化を行う。加えて、ヒト気道上皮細胞系を用いた *in vitro* 解析系の構築を実施し、ヒトへの外挿性の向上を計る。そこで研究班を次の4つの分担研究によって構成し研究を開始した。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と研究の総括(北嶋)、人への外挿にかかわる臨床的解析、及びヒト気道上皮細胞系による毒性応答メカニズムの研究(慶長)、吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、インフォマティクス解析(菅野)、化学物質の極低濃度下での長期暴露による毒性確認に関する研究(大西)である。

平成25年度はパラジクロロベンゼン(指針値:0.04 ppm)について、室内濃度指針

値を考慮した極低濃度下でマウスに吸入暴露し検討した。以下に実験方法の概要を示す。

トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験：12週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）を対象とした吸入暴露試験（4用量、16群構成、各群3匹）を、6時間/日×7日間反復暴露（＝労働暴露モデル）、及び22時間/日×7日間反復暴露（＝生活暴露モデル）の2種類のプロトコールにより実施する。採取組織は先行研究時の肺・肝に加え、脳4部位（海馬、皮質、脳幹、小脳）とする。パラジクロロベンゼン（和光純薬工業）は先行研究と同じものを使用し、ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、加熱昇華法によりおこない、濃度は捕集管を用いる方法で測定した。

評価システムの構築：雄性 C57BL/6J マウス（12週齢）に吸入暴露（6時間/日×7日間反復暴露 [6、22、70、166時間後に観測]と22時間/日×7日間反復暴露 [22、70、166、190時間後に観測]）（4用量、16群構成、各群3匹）させ、得られたマウスの海馬、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した 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。4用量、4時点の遺伝子発現情報をすでに開発済みの波面解析等を用いた解析を行い、脳・肺・肝の多臓器連関の解析及びインフォマティクス構築を進めた。

遺伝子発現プロファイル生成：再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し、Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。

形態観察のための極低濃度暴露下での長期暴露実験：雄性 C57BL/6J マウス（暴露開始時8週齢、日本チャールスリバー）を対象とした28日間の反復全身吸入暴露実験（22時間/日×7日間反復）（4用量、4群構成、各群6匹）を実施し、その際の肺について、透過型電子顕微鏡（TEM）による超微細形態学的検索をおこなった。グルタルアルデヒド添加パラホルムアルデヒドで固定した左肺を、気道（肺内気管支～終末細気管支）から肺胞まで連続して追うことができるよ

う、主気管支の走行に沿った位置で0.8mm幅の肺の全断面サンプルを切り出し、脱水、オスミウム固定の後、エポキシ樹脂に包埋した。セミシン切片（厚さ1μm）を作製・鏡検して電顕検索部位の絞り込みを行い、標的とする部分につきウルトラミクロトームで厚さ100nmの超薄切片を作製してTEM観察に供した。

ヒト気道上皮細胞系を用いた *in vitro* 解析実験：吸入暴露実験との対応を取りつつ、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いる *in vitro* 暴露解析実験を実施した。「刺激物質」は、外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、自然免疫系が病原体（特にウイルス）を認識する際のレセプターの agonist として知られる Poly I:C を選択した。複合影響実験では、細胞株を 25cm² フラスコで培養し（5×10⁵ cells/flask）、90% confluent で Poly I:C（10 μg/ml）存在下、24時間後にホルムアルデヒド（10 μM）あるいは、シックハウス症候群関連13物質の内4物質、すなわちクロルピリホス（2.85, 28.5, 285 μM）、トルエン（10, 100, 1,000 μM）、アセトアルデヒド（50, 500, 5,000 μM）及びキシレン（10, 100, 1,000 μM）（溶媒：エタノール）を選択し、各物質を添加3時間後に細胞を回収し、IL8 の mRNA 発現レベルを TaqMan Gene Expression Assay（Hs00174103_m1）を用い定量的 RT/PCR で測定した。

（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的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1：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（北嶋）：

平成25年度はパラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について、目標通りに極低濃度下（0、0.04、0.12、0.4 ppm）での、肺の形態観察の為の22時間/日×28日間反復（4用量、4群構成、各群6匹）、及びトキシコゲノミクスの為の6時間/日×7日間

反復と 22 時間/日×7 日間マウス反復吸入暴露実験 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) を実施した。いずれの場合も、ほぼ目標暴露濃度 (96~103%) にて実施した。

C-2 : 吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、インフォマティクス解析 (菅野) :

平成 25 年度はパラジクロロベンゼン (指針値 : 0.04 ppm) の極低濃度 (0, 0.04, 0.12, 0.4 ppm) を雄性マウスに吸入暴露 (4 用量にて、6 時間/日×7 日間反復暴露 [6、22、70、166 時間後に観測] と 22 時間/日×7 日間反復暴露 [22、70、166、190 時間後に観測]) し、海馬、肺、肝の網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。

解析の結果、「海馬」において有害性を示唆するシグナルとして、初期応答遺伝子関連シグナル (IEG 遺伝子群) が見いだされた。具体的には、パラジクロロベンゼンの 22 時間×7 日間反復暴露の暴露期間中、神経活動の指標となる IEG 遺伝子群、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Egr2 遺伝子等の発現が強く抑制され、暴露休止後 24 時間目の 190 時間時点で、逆にこれらの発現の増加が認められた。6 時間×7 日間反復暴露では、これらの遺伝子の発現抑制は 6 時間暴露直後に確認され、その後の観測点である暴露終了 16 時間目では、むしろリバウンド現象を示唆する所見を得た。一方「肝」では、酸化的ストレス、アポトーシスを含め有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークの変動は認められなかった。「肺」では 22 時間/日×7 日間反復暴露により、IEG の顕著な発現減少とそれに続く暴露休止 24 時間後での発現増加が認められたが、海馬で認められた IEG の全てではなくその一部 (Dusp1、Nr4a1、Cyr61、Klf2 遺伝子) であった。この所見はホルムアルデヒド及びキシレンの場合と同じであった。また、酸化的ストレス関連遺伝子の発現増加が認められた。

肺或いは肝からの二次的シグナルが共通因子として海馬に作用する可能性が考えられたため、3 物質につき肝・肺の連関解析を実施した。その結果、6 時間/日×7 日間

反復暴露時の肺及び肝において、インターロイキン 1 β (I11b) 遺伝子の発現増加が 3 物質に共通して認められたため、この分子が共通因子の候補と考えられた。尚、I11b 遺伝子は、IEG 遺伝子群の上流遺伝子を既存文献データ (Ingenuity Pathway Analysis) に対し検索した際に高確率でリストアップされた。

C-3 : 化学物質の極低濃度下での長期暴露による毒性確認に関する研究 (大西) :

平成 25 年度は、平成 24 年度に実施したキシレン (指針値 : 0.2 ppm) の極低濃度 (0, 0.2, 0.7, 2.0 ppm) 22 時間/日×28 日間反復吸入暴露時の肺、及び、パラジクロロベンゼン (指針値 : 0.04 ppm) の極低濃度 (0, 0.2, 0.7, 2.0 ppm) 22 時間/日×28 日間反復吸入暴露時の肺について、透過型電子顕微鏡 (TEM) による超微形態学的検索を実施した。

キシレン暴露肺において、光学顕微鏡による観察では投与群の動物の細気管支の線毛細胞と気道終末部のクララ細胞には形態学的に対照群と差を認め無かったが、TEM 検索で、極低濃度キシレン暴露群の動物の気道終末部の非線毛細胞 (クララ細胞) などに分泌顆粒の増加を示唆する所見が認められた。

パラジクロロベンゼンについては、平成 24 年 12 月に暴露が終了し、得られた肺サンプルについて解析を実施中であり、今年度中に終了する。

C-4 : 人への外挿にかかわる臨床的解析、及びヒト気道上皮細胞系による毒性応答メカニズムの研究 (慶長) :

最も正常の気道細胞に近いといわれるヒト気道上皮細胞株 (BEAS2B 細胞) を用いる *in vitro* 解析系により、先行研究で見いだした微生物関連物質 (polyI:C) とホルムアルデヒドとの IL-8 遺伝子の発現増強作用について、平成 25 年度は、ホルムアルデヒド以外のシックハウス関連の 4 物質 (クロルピリホス、トルエン、アセトアルデヒド及びキシレン) について同様の検討を行った。その結果、クロルピリホスにおいては、

IL-8 の産生増強の効果が認められたが、その他、トルエン、アセトアルデヒド、キシレンにおいては、IL-8 の mRNA 発現量に明らかな増強効果は認められなかった。I11b は、IL-8 に比して弱いながら発現誘導を示唆するデータが得られ、IEG 上流因子の可能性について、ヒト細胞での検討が期待された。

D. 考察

以上、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、平成 25 年度はパラジクロロベンゼン (指針値: 0.04 ppm) について、目標通りの極低濃度 (0、0.04、0.12、0.4 ppm) での、肺の形態観察のための 22 時間/日×28 日間反復、及びトキシコゲノミクスのための 6 時間/日×7 日間反復と 22 時間/日×7 日間マウス反復吸入暴露実験を実施した。

遺伝子発現変動解析では、シックハウス症候群レベルの極低濃度の吸入暴露により、海馬において有害性を示唆するシグナルとして、初年度 (平成 23 年度) 検討したホルムアルデヒド、及び昨年度 (平成 24 年度) 検討したキシレンと同様に、初期応答遺伝子関連シグナル (IEG 遺伝子群) の抑制およびリバウンド現象が見いだされ、連続暴露期間中は、神経活動が抑制され、暴露が中断されると、神経活動が過剰となるリバウンド現象が起こることが示唆された。6 時間×7 日間反復暴露の所見からは、IEG の遺伝子の発現抑制は少なくとも 6 時間以上の暴露で誘発され、16 時間以上の休止でリバウンドが生じ、かつ反復による影響が次の日に残留しない可能性が示された。

本 3 年間研究により、ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼンという化学構造の異なる 3 物質に共通して海馬における IEG の発現減少が認められ、海馬における神経活動の抑制が示唆された。この抑制所見は、本研究の第二の目的であるシックハウス症候群の「不定愁訴」の分子実態の一端を明らかにしたものと考えられ、その原因解明の手がかりとなる可能性がある。

また、いずれの IEG の遺伝子も同様な発現パターンを示した事から、同一の分子機

序により発現が制御される可能性が示唆された。この点、Saha ら (Nat Neurosci 14(7): 848-856, 2011) は、ラット初代培養神経細胞を用いて、IEG の遺伝子の発現は、Pol II に結合する 4 つのサブユニット (NELF-A, NELF-B, NELF-C/D and NELF-E) の複合体である Negative elongation factor (NELF) によって制御されると報告している。しかし本解析結果では、この NELF のサブユニットの各遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。したがって NELF の発現変動を伴わずに、その機能が修飾された結果 IEG の遺伝子の発現減少が誘発された可能性、あるいは異なる機構が存在すること、が考えられた。

この 3 物質に共通して認められた海馬における IEG の抑制分子機序として、化学構造が異なっている事から、3 物質が直接的に同一の標的分子を介して作用する可能性は低いものと考ええる。むしろ、異なった標的分子に作用したとしても最終的には共通する因子が介在することにより、IEG の発現減少が誘発される可能性が考えられた。IEG の発現抑制は、6 時間/日×7 日間反復暴露の際の初回暴露 6 時間終了直後に認められていることから、少なくとも暴露 6 時間以内にこの共通因子が発現するものと考えられる。その条件を満たすものとしてインターロイキン 1 β (I11b) 遺伝子が同定された。次いで I11b 遺伝子が IEG 遺伝子の転写発現調節因子であるか否かを検索する目的で、IEG 遺伝子 (Arc, Fos, Dusp1, Nr4a1, Junb, Egr4, Cyr61, Egr2, Ier2, Klf2) につきプロモーター解析 (in silico) (Upstream analysis, Ingenuity Pathways Analysis) を検討したところ、I11b が候補として抽出されてきたことから、この分子が IEG の発現抑制因子の候補であることが支持された。文献検索の結果、I11b が海馬依存的な記憶に障害を与えるという報告 (Gonzalez P ら, Brain Behav Immun 34:141-150, 2013) が見いだされた。

このことから、I11b が IEG の発現抑制を介し、情動認知行動異常、特に記憶障害を誘発する可能性が考えられる。

しかし、6 時間/日×7 日間反復実験では、I11b が実験後半に上昇する傾向にあること、22 時間/日×7 日間反復暴露実験では上昇がみられないこと、などから上流因子としての要件を満たしていない可能性が残る。今後、より短い 2 時間単回暴露時の海馬の遺伝子発現変動を解析することにより、より詳細に神経活動抑制の上流に位置する因子の確定を進める計画である。

第一の目的に向けた 28 日間暴露時の肺の電子顕微鏡による形態解析では、昨年度（平成 24 年度）実施したキシレン暴露時の肺の気道終末部の上皮細胞にクララ細胞の分泌顆粒の増加を示唆する所見が認められた。この影響がキシレン暴露による可能性が示唆されたが、現時点では、細胞のオルガネラレベルでの暴露の影響を正確に評価するための正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動に関する知見が不足しているため、結論を得るにはさらに検討を要するものと考え。今年度実施したパラジクロルベンゼン暴露時の肺については解析が遅れているが、今年度内には解析が終了する見込みであり、肺において酸化的ストレス関連遺伝子の発現変動が認められることから、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ができるものと考え。

加えて、人への外挿性向上を目指しヒト気道上皮細胞を用い、微生物関連物質 (polyI:C) とホルムアルデヒドとの IL-8 遺伝子の発現増強作用について、平成 25 年度は、ホルムアルデヒド以外のシックハウス関連の 4 物質について同様の検討を行い、クロルピリホスでも、ホルムアルデヒドと同様の IL-8 産生増強効果が認められる事を見いだした。この事は、この *in vitro* 実験系が、人への外挿を含めて有用であることを示しているだけでなく、微生物由来物質の存在により、吸入暴露による症状が増強されることを示唆しており、吸入暴露による毒性を考える上で重要な知見と考える。

また、I11b は、IL-8 に比して弱いながら発現誘導を示唆するデータが得られ、IEG 上流因子の可能性について、ヒト細胞での検討が期待された。

E. 結論

以上のごとく、シックハウスの極低濃度暴露により、極低濃度の化学物質の吸入暴露に於いても、脳サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により、その中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。特にホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼンという化学構造の異なる 3 物質に共通して 22 時間/日×7 日間反復暴露の際に示唆された、海馬における神経活動の抑制所見は、本研究の第二の目的であるシックハウス症候群の「不定愁訴」の分子実態の一端を明らかにしたものと考えられ、その原因解明の手がかりとなる可能性がある。この 3 物質に共通して認められた海馬における IEG の抑制機序として、化学構造が異なっている事から、3 物質が直接的に同一の標的分子を介して作用する可能性は低いものとする。むしろ、異なった標的分子に作用し、最終的に共通する因子により、IEG の発現減少が誘発される可能性が考えられた。この共通因子の候補にインターロイキン 1β (I11b) 遺伝子が挙げられた。しかし、6 時間/日×7 日間反復実験では、実験後半に上昇する傾向にあること、22 時間/日×7 日間反復暴露実験では上昇がみられないこと、などから上流因子としての要件を満たしていない可能性が残った。今後、単回暴露時の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析することにより、神経活動抑制の上流に位置する分子機序と肺・肝の関与が解明できるものとする。またこの神経活動の抑制所見は、記憶をはじめとする情動認知行動異常を誘発する可能性が高く、情動認知行動解析と神経科学的物証の収集により、今後、海馬に対する有害性の実証及び遺伝子発現変動データの予見性の確認について検討予定である。

第一の目的に向けた 28 日間暴露時の肺の電子顕微鏡による形態解析につき、今年度実施したパラジクロルベンゼン暴露時の解

析が遅れているが、今年度内には終了する見込みであり、肺において酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が認められることから、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ができるものとする。加えて、ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の解析系にて、微生物関連物質 (polyI:C) とホルムアルデヒドとの複合影響がクロルピリホスでも認められた事は、この系が人への外挿を含めて有用であることを示しているだけでなく、微生物由来物質の存在により、吸入暴露による症状が増強されることを示唆しており、吸入暴露による毒性を考える上で重要な知見と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y, Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci* 38: 643-654, 2013.

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J, An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci*. 38(4):619-28, 2013.

Noguchi S, Hamano E, Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Nagase T, Keicho N. Differential effects of a common splice site polymorphism on the generation of OAS1 variants in human bronchial epithelial cells. *Hum Immunol* 74 (3): 395-401, 2013.

Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Nagase T, Keicho N. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics* 65 (2): 107-14, 2013.

Ohnishi M, Umeda Y, Katagiri T, Kasai T,

Ikawa N, Nishizawa T, Fukushima S. Inhalation carcinogenicity of 1,1,1-trichloroethane in rats and mice. *Inhalation Toxicology* 25: 298-306, 2013.

Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 8: 30, 2013.

2. 学会発表

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクス、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013. 6. 18.)

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Katsuhide IGARASHI and Jun KANNO, Application of Percellome Toxicogenomics approach to food safety: A flavor, estragole appears to be a PPAR-alpha agonist, The XIII International Congress of Toxicology 2013 (ICT 2013) (2013. 7. 3.), Seoul, Korea

種村健太郎、五十嵐 勝秀、古川佑介、大塚まき、白形芳樹、相崎 健一、北嶋 聡、佐藤英明、菅野 純、発生～発達期マウスへの低用量ビスフェノール A 暴露による晩発中枢影響解析、第 40 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2013. 6)

五十嵐 勝秀、種村健太郎、古川佑介、大塚まき、森山紀子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、脳発達期における GABA シグナルの一過性活性化による遅発中枢神経系影響の解析、第 40 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2013. 6)

Kentaro Tanemura, Katsuhide Igarashi, Yusuke Furukawa, Maki Otsuka, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Eimei Sato and Jun Kanno, Delayed Effects on CNS Induced by Disturbance of Neural Activity during Development-Behavioral Impairment in Male Adult Mice Induced by Postnatal Oral Intake of Acephate, The XIII International Congress of Toxicology 2013

(ICT 2013) (2013.7.), Seoul, Korea

Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Yusuke Furukawa, Maki Otsuka, Noriko Moriyama, Ken-Ichi Aisakil, Satoshi Kitajima and Jun Kanno, Analysis of Late-onset Effects on CNS Induced by Transient GABA Signal Activation with Hypnotics During Brain Development, The XIII International Congress of Toxicology 2013 (ICT 2013) (2013.7.), Seoul, Korea

菅野 純、ケミカルバイオロジーの視点からのトキシコゲノミクス：Percellome Projectの進捗とその応用性、第40回日本毒性学会学術年会 (2013.6.18)

Kanno J, Percellome Toxicogenomics : a quantitative and comprehensive approach for basic and applied toxicology. The XIII International Congress of Toxicology 2013 (ICT 2013) (2013.7.2), Seoul, Korea, Invited

Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Keicho N. Beta defensin-1 expression and genetic polymorphisms in human airway epithelial cells. In:18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, (2013.11.), Yokohama, Japan

松下育美, 土方美奈子, 伊藤秀幸, 慶長直人、ヒト気道上皮細胞系による微生物関連物質とホルムアルデヒドの毒性応答メカニズムにおける複合効果の検討. In:第53回日本呼吸器学会学術講演会, 東京 (2013.4.)

笠井辰也、片桐卓、大西誠、斎藤新、後藤薫、平井繁之、晴佐久満、西沢共司、福島昭治、多層カーボンナノチューブのラットにおける13週間全身吸入曝露試験：曝露環境（エアロゾル濃度、濃度制御、粒度分布m形態観察）第86回日本産業衛生学会（松山）(2013.5.)

妹尾英樹、加納浩和、鈴木正明、大西誠、笠井辰也、高信健司、梅田ゆみ、相磯成敏、福島昭治、ナノマテリアルの生体影響評価における気管内投与法の有用性と活用方法 第28回発癌病理研究会（沖縄）(2013.8.)

特許第5177712号、2013年1月18日登録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究所、NTTデータ、発明者：菅野純、相崎健一ら、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」特願2012-148848、出願日2012年7月2日（出願中）

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願2012-158343、出願日2012年7月17日（出願中）

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

Ⅱ. 分担研究報告書

平成25年度厚生労働科学研究補助金（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-（H23-化学-一般-001）

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

日常生活で暴露される様々な化学物質の毒性評価は、実験動物における毒性所見を人に外挿することで実施されている。しかし、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と実験動物で検出可能な器質変化濃度の乖離が甚だしく、現行の吸入毒性試験での毒性指標（器質的障害）を人へ外挿することは困難である事が指摘されてきた。この点に対し先行研究「シックハウス症候群レベルの暴露を考慮した吸入毒性評価系に関する研究」（厚生労働費・化学物質リスク研究事業）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、器質的变化が誘発される以前の段階（時間的及び濃度的に）での遺伝発現変動を網羅的に評価可能なPercellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。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×28日間反復暴露のプロトコールにより、また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×7日間反復暴露及び22時間/日×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25年度（今年度）は、パラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について極低濃度下（0.04、0.12及び0.40 ppm）での6時間/日×7日間反復、22時間/日×7日間反復、及び22時間/日×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、0.04、0.12及び0.40 ppmの目標暴露濃度に対して、前二者の場合は、それぞれ0.040、0.117、0.399 ppm 及び0.039、0.123、0.402 ppm、後者では0.039、0.124、0.410 ppmと、ほぼ目標暴露濃度（96～103%）にて、パラジクロロベンゼン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

日常生活で暴露される様々な化学物質の毒性評価は、実験動物における毒性所見を人に外挿することで実施されている。しかし、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と実験動物で検出可能な器質変化濃度の乖離が甚だしく、現行の吸入毒性試験での毒性指標(器質的障害)を人へ外挿することは困難である事が指摘されてきた。この点に対し先行研究「シックハウス症候群レベルの暴露を考慮した吸入毒性評価系に関する研究」(厚生科研費・化学物質リスク研究事業)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、器質的变化が誘発される以前の段階(時間的及び濃度的)での遺伝発現変動を網羅的に評価可能な Percellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。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×28日間反復暴露のプロトコルにより、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×7日間反復暴露及び22時間/日×7日間反復暴露の2種類のプロトコルにより実施する。今年度(平成25年度)は、パラジクロロベンゼン(指針値: 0.04 ppm)につ

いて室内濃度指針値を考慮し、0.04、0.12及び0.40 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

パラジクロロベンゼン(paradichlorobenzene; 分子量: 147、CAS No.: 106-46-7)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: パラジクロロベンゼン

カタログ番号: 047-01315 (500 g 瓶)

ロット番号: WEP0371

沸点: 174°C

蒸気圧: 0.17kPa (20°C)

純度: 99.9% (和光純薬工業(株)測定値)

使用した被験物質の特性は、GC/MS(日立社製M-80B)を用いて定性した。図1-1に被験物質のマススペクトルを、図1-2にパラジクロロベンゼンの文献のマススペクトルを示した。その結果、被験物質とパラジクロロベンゼンの文献データとは一致し、かつ分子イオンピーク及びフラグメントピークを確認した。

B-2: パラジクロロベンゼンの吸入暴露システム

B-2-1: 6時間/日×7日間反復及び、22時間/日×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2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2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2のB)、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2のC)、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2のD）、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2のE）によって構成した。

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1,060L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。

B-2-2: 22時間/日×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。

パラジクロロベンゼンのガスの発生法は先行研究での検討の結果、もっとも安定して発生することができる、加温により昇華発生させる装置を用いてガスを発生する方法を採用した。温浴槽で40℃に加温した密閉容器内へパラジクロロベンゼン(Cat No. 047-01315、和光純薬)を入れ、この中へ発生空気を送りガスを発生させ、このガスを一次希釈空気により一定濃度に希釈混合、流量計を用いて一定量を横層流型吸入チャンバー(柴田科学、Photo 1)上部のラインミキサーに供給し、ラインミキサー内で空調(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 m³、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: パラジクロロベンゼンの発生方法

B-3-1: 6時間/日×7日間反復及び22時間/日×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。

恒温槽(27℃)に収納したパラジクロロベンゼン入り密封容器に、清浄空気(発生空気)を供給しパラジクロロベンゼンを気化させた。このパラジクロロベンゼンを含む空気と清浄空気(キャリア空気)を混合し、被験物質供給装置(柴田科学株式会社)の発生容器(循環式恒温槽で27℃に温度維持)に導入した。さらに、清浄空気(希釈空気)で一定濃度に希釈混合した後、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し、ラインミキサー上で新鮮空気と混合し、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。新鮮空気はHEPAフィルターと活性炭フィルターにより濾過して使用した。なお、暴露濃度が目標濃度となるように、ガス濃度を毎日測定し、その結果を基にガス供給量を毎日補正し、暴露を行った。具体的には、前日の濃度分析結果を基に、ガス供給量を浮子式流量計のフローコントロールバルブにて調節することにより目的濃度を作製した。(表1)

B-3-2: 22時間/日×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。

発生流量を2.0L/分、一次希釈空気量を15.0L/分とし、供給流量はチャンバー内濃度測定結果を考慮し調整し、目標濃度0.4ppmに対して4.48～8.22L/分、0.12ppmには0.99～2.20L/分、0.04ppmには0.37～0.80L/分とし、チャンバー換気流量650L/分で希釈し暴露した。

B-4:パラジクロロベンゼンの吸入チャンバー内の濃度測定の方法

B-4-1: 6時間/日×7日間反復及び22時間/日×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

パラジクロロベンゼン濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定することにより算出した。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学株式会社製)を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管(ORBOTM-91 Tube, Extra-Large, SUPELCO社製)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。捕集時間は暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ6時間とした。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、対照群は1本、暴露群は各濃度とも3本とした。捕集管の前処理及び分析条件は、捕集管の活性炭(1層及び2層)を取り出し、各々、バイアルビン(柴田科学株式会社製)に入れ、二硫化炭素(和光純薬工業株式会社製、作業環境測定用)を加え、蓋をしてダイレクトミキサー(サーマル化学産業株式会社製)を用いてしんとうした。各濃度の活性炭1層の抽出液は、検量線の所定の範囲に入るように希釈した。その後、バイアルビン(Agilent Technologies社製)に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ(Agilent

Technologies社製 HP5890A)により測定した。

B-4-2: 22時間/日×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。

パラジクロロベンゼンのガスの濃度検知は、チャンバー内濃度について、定流量ポンプ(MPΣ-30、MPΣ-300(柴田科学)、Photo 4)により活性炭捕集管(ORBOTM-91 Tube, Extra-Large, SUPELCO社製)へチャンバー内空気を通し、捕集管内に充填されている活性炭にガスを吸着させ、溶媒(二硫化炭素)で抽出し、ガス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、500mL/分[660L]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的配慮を十分行い、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×7日間反復及び22時間/日×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。

C-1-A: パラジクロロベンゼンの濃度制御の方法の検討

目標吸入暴露濃度である0.04、0.12および0.40

ppm に濃度制御する方法について、パラジクロロベンゼンガスの発生装置へ送るバブリングのための発生空気の流量、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 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 1)。

検討 1：発生空気の流量を 0.2 L/分、恒温槽の温度を 27℃、パラジクロロベンゼンガスの再加熱温度を 23℃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 0.04、0.12 および 0.40 ppm の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.0418 ppm (目標濃度に対し 105%)、0.112 ppm (目標濃度に対し 93.3%) および 0.372 ppm (目標濃度に対し 93.0%) であった。0.12 および 0.40 ppm の群で目標濃度よりやや低値であった。

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 0.04、0.12 および 0.40 ppm の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.0381 ppm (目標濃度に対し 95.2%)、0.110 ppm (目標濃度に対し 91.7%) および 0.387 ppm (目標濃度に対し 96.8%) であり、全ての群で目標濃度よりやや低値であった。

C-1-B: 吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼンの濃度測定

目標吸入暴露濃度 0.04、0.12 および 0.40 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 層目へのパラジクロロベンゼ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 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 0.04、0.12 および 0.40 ppm の吸入チャンバーの平均値 ± 標準偏差 (最低～最高値) がそれぞれ 0.0397 ± 0.001 ppm (0.0379 ppm～0.0408 ppm) (目標濃度に対し 99.3%)、 0.117 ± 0.003 ppm (0.104 ppm～0.128 ppm) (目標濃度に対し 97.5%) 及び 0.399 ± 0.009 ppm (0.392 ppm～0.409 ppm) (目標濃度に対し 99.8%)、22 時間の運転でも目標吸入暴露濃度 0.04、0.12 および 0.40 ppm の吸入チャンバーの平均値 ± 標準偏差 (最低～最高値) がそれぞれ 0.0390 ± 0.002 ppm (0.0368 ppm～0.0404 ppm) (目標濃度に対し 97.5%)、 0.123 ± 0.002 ppm (0.118 ppm～0.130 ppm) (目標濃度に対し 103%) 及び 0.402 ± 0.007 ppm (0.394 ppm～0.410 ppm) (目標濃度に対し 101%) 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 7A, B)。

従って、パラジクロロベンゼンの室内濃度指針値である 0.04 ppm を考慮した 0.04、0.12 および 0.40 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 × 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、発生流量を 2.0 L/分とし、供給流量はチャンバー内のパラジクロロベンゼン濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度 0.4 ppm に対して 4.48～8.22 L/分、0.12 ppm には 0.99～2.20 L/分、0.04 ppm には 0.37～0.80 L/分とし、チャンバー換気流量 650 L/分で希釈し暴露した。目標吸入暴露濃度 0.04、0.12 および 0.40 ppm の吸入チャンバーの実測値 (以下、