

ンバーでは1.18ppmであった。この結果、空チャンバーに比較して、マウスの入ったチャンバーでは、ホルムアルデヒドの濃度が約10%弱減衰したものの、チャンバー内のホルムアルデヒド濃度のコントロールは、0.1ppm～1.0ppmの範囲で十分に制御できた。

以上のことから、ホルムアルデヒドを低濃度でマウスに正確に暴露するための条件は、ホルムアルデヒドを冷却して発生し、縦層流及び容量を十分に確保した(1000L以上)吸入チャンバーを用い、マウスを平置き均一配置にすることであり、これらの条件により、マウスの被毛に対するホルムアルデヒドの吸着は若干認められたものの、動物を挿入したチャンバー内ホルムアルデヒドの濃度減少はほとんど無く、低濃度におけるチャンバー内ホルムアルデヒドの濃度コントロールが可能であった。

#### C-1-1-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1.0ppmで、2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2時間とした。

具体的には、2時間の暴露運転で目標吸入暴露濃度0.1、0.3及び1.0ppm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0.0966±0.0014ppm(目標濃度に対し96.6%)、0.292±0.008ppm(目標濃度に対し97.3%)および0.998±0.020ppm(目標濃度に対し99.8%)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6A)。

従って、ホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08ppmを考慮した0.1、0.3および1.0ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた。

#### C-1-2: アセトアルデヒドの場合

##### C-1-2-A: アセトアルデヒドの濃度制御の方法の検討

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 毒性部では、アセトアルデヒドを正確にマウスに暴露するために、2種類の吸入チャンバーを用いてチャンバー内アセトアルデヒドの濃度検討を行った。

発生方法については、アセトアルデヒド(99%、MERCK)0.3%希釈液を用いたバブリングによる発生装置内タンクのガス濃度は100ppm以上を示し、0.1%に希釈倍率を上げても、この濃度は100ppm以上を示し、ホルムアルデヒドと異なりアセトアルデヒドは揮発性が高く、希釈倍率を上げてもアセトアルデヒドガス濃度を低下させることができないことが考えられた。バブリング法では低濃度が得られないため、標準ガスボンベを用いる方法を採用することとし、ガスの供給システムを変更、ガスボンベ用のマスフローコントローラー及び流量計を新たに設置、ボンベガスを希釈することで所定の濃度の暴露が可能となった。高千穂商事から購入した標準ガス濃度は104ppmであった。このガスをチャンバー内の総換気空気650L/分により希釈した。0.3ppm濃度を目標に標準ガス1.9L/分をチャンバー内に送気、高感度ホルムアルデヒドガスモニター(理研計器)による濃度測定を試みた。高濃度群のモニター値は0.091±0.011ppm(平均値±標準偏差)を示した。

2回目に行った濃度測定試験では、設定濃度0.3ppmに対し標準ガスを1.87L/分流した高濃度群の捕集管(GL-Pak mini AERO DNPH, ジーエルサイエンス)測定による濃度は0.237ppmと21.2%低く、設定濃度0.03ppmに対し標準ガスを0.19L/分流した低濃度群の捕集管測定による濃度は0.027ppmと8.3%低く、設定濃度0.1ppmに対し標準ガスを0.63L/分流した中間濃度群は0.094

ppm と 6%低かった。高濃度群のモニター値は  $0.126 \pm 0.009$  ppm (平均値±標準偏差)と捕集管測定値  $0.237$  ppm との濃度差が大きかった。

3回目の濃度測定時において  $2.37$  L/分に増やして流した高濃度群の捕集管測定による濃度は  $0.286$  ppm と 4.7%低く、設定濃度  $0.03$  ppm に対し標準ガスを  $0.21$ L/分流した低濃度群の捕集管測定による濃度は  $0.026$  ppm と 13.3%低く、設定濃度  $0.1$ ppm に対し標準ガスを  $0.67$  L/分 流した中間濃度群は  $0.089$  ppm と 11%低かった。チャンバー内濃度の安定性を高感度ホルムアルデヒドガスモニターで測定したところ  $0.185 \pm 0.018$  ppm (平均値±標準偏差) であり、捕集管値  $0.286$  ppm との濃度差が大きかった。

4回目の濃度測定試験では、設定濃度  $0.3$ ppm に対し標準ガスを  $2.5$ L/分 流した高濃度群の捕集管測定による濃度は  $0.323$  ppm と 7.2%高く、設定濃度  $0.03$  ppm に対し標準ガスを  $0.25$ L/分 流した低濃度群の捕集管測定による濃度は  $0.033$  ppm と 8.3%高く、設定濃度  $0.1$ ppm に対し標準ガスを  $0.76$  L/分 流した中間濃度群は  $0.106$  ppm と 6%高かった。高濃度群のモニター値は  $0.093 \pm 0.019$  ppm(平均値±標準偏差)であり、捕集管値  $0.323$  ppm との濃度差が大きかった。4回行った高感度ホルムアルデヒドガスモニターの測定結果は、安定性を確認するには使用が可能であるような数値の推移を示すが、捕集管値と比べかなり低い濃度を示していた。本機器は、アセトアルデヒドに対し反応性が悪く信頼性は低いと考えられた。

本試験において4回目の濃度試験データを基に、 $0.03$ ppm では  $0.23$ L/分、 $0.1$ ppm では  $0.72$ L/分、 $0.3$ ppm では  $2.33$ L/分に流量を補正し標準ガスを流入させ、得られた捕集管測定濃度は  $0.028$ 、 $0.094$ 、 $0.277$ ppm であり、 $6.5 \sim 8.7\%$ ほど低いが目標値に近い一定濃度を安定的に保持し、動物に暴露することができた。また対照群チャンバー内濃

度は  $0.0020 \pm 0.0013$  ppm ( $3.75 \pm 2.19$   $\mu$ g/m<sup>3</sup>、平均値±標準偏差)、室内濃度は  $0.0040 \pm 0.0024$  ppm ( $6.83 \pm 4.49$   $\mu$ g/m<sup>3</sup>、平均値±標準偏差)と低濃度群の  $0.028$  ppm と比し低い濃度であり、一般環境大気濃度  $0.23 \sim 7.9$   $\mu$ g/m<sup>3</sup> (平均値  $2.5$   $\mu$ g/m<sup>3</sup>) (環境省、2003)と動物室内は同等であり、一般家庭の室内空气中で検出される平均濃度  $17$ ppb (国土交通省、2003)を下回り、実験に影響はないものと考えられた。

#### C-1-2-B: 吸入チャンバー内のアセトアルデヒドの濃度測定

目標吸入暴露濃度  $0.03$ 、 $0.10$ および  $0.30$  ppm で、2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、暴露全時間におたる2時間とした。

具体的には、2時間の暴露運転で目標吸入暴露濃度  $0.03$ 、 $0.10$ および  $0.30$  ppmの吸入チャンバーの平均値±標準偏差がそれぞれ  $0.0311 \pm 0.0003$  ppm (目標濃度に対し103.6%)、 $0.105 \pm 0.003$  ppm (目標濃度に対し105.0%) 及び  $0.312 \pm 0.005$  ppm (目標濃度に対し104.0%) 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6B)。

従って、アセトアルデヒドの室内濃度指針値である  $0.03$  ppmを考慮した  $0.03$ 、 $0.10$ および  $0.30$  ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた。

#### C-2: 情動認知行動解析のためのホルムアルデヒド22時間/日×7日間反復吸入暴露実験の場合

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。成熟期マウスに暴露する場合と幼若期マウスに暴露する場合の2種類の実験を実施した。

先行研究での検討結果を踏まえて、発生流量

を0.7L/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2.0ppmに対して1.62~1.70L/分とし、一次希釈流量25L/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1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値（以下、平均値±標準偏差、最小～最大値）は、成熟期マウスに暴露した場合は、1.04±0.05 ppm（0.97～1.12 ppm）、幼若期マウスに暴露した場合は、0.865±0.11 ppm（0.73～1.01 ppm）と、目標濃度に対しそれぞれ104.0%、86.5%となり、ほぼ目標濃度が得られた。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1.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた（図6C）。また対照群チャンバー内にホルムアルデヒドは検出されなかった。

・（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_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/kisha03/07/071219\\_.html](http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha03/07/071219_.html)

C-3: ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼンおよびアセトアルデヒドの指針値濃度の吸入暴露量[mg/kg/日]の試算

化学物質評価の際に使用されるマウス、ラットおよびヒトの呼吸器量と体重を基に、ホルムアル

デヒド、キシレン、パラジクロロベンゼンおよびアセトアルデヒドについて、各指針値濃度に吸入暴露された際の、1日あたりの吸入暴露量〔mg/kg/日〕換算〕につき試算した。

各呼吸気量を以下に記載する。

マウス： 43 L/日 = 0.043 m<sup>3</sup>/日  
ラット： 290 L/日 = 0.29 m<sup>3</sup>/日  
ヒト： 15,000 L/日 = 15 m<sup>3</sup>/日

各体重を以下に記載する。

マウス： 0.028 kg  
ラット： 0.425 kg  
ヒト： 50 kg

各物質の指針値濃度を、ppmとμg/m<sup>3</sup>表記にて、以下に記載する。

ホルムアルデヒド：100 μg/m<sup>3</sup>（0.08 ppm）  
キシレン：870 μg/m<sup>3</sup>（0.20 ppm）  
パラジクロロベンゼン：240 μg/m<sup>3</sup>（0.04 ppm）  
アセトアルデヒド：48 μg/m<sup>3</sup>（0.03 ppm）

指針値濃度における1日あたりの吸入暴露量（体重1kgあたり）〔mg/kg/日〕は、

指針値濃度（μg/m<sup>3</sup>）×呼吸気量（m<sup>3</sup>/日）÷  
体重（kg）÷1,000

の計算式により算出できる。

その結果、各物質の指針値濃度についての1日あたりの吸入暴露量〔mg/kg/日〕は、マウスおよびヒトでの場合、以下に通りととなった。計算上、マウスの場合はヒトの場合の約5倍量となる。

マウスの場合；

ホルムアルデヒド： 0.15 mg/kg/日  
キシレン： 1.34 mg/kg/日

パラジクロロベンゼン： 0.37 mg/kg/日

アセトアルデヒド： 0.07 mg/kg/日

ヒトの場合；

ホルムアルデヒド： 0.03 mg/kg/日

キシレン： 0.26 mg/kg/日

パラジクロロベンゼン： 0.07 mg/kg/日

アセトアルデヒド：0.01 mg/kg/日

#### D. 結論

平成27年度（今年度）は、トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験に向け、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）及びアセトアルデヒド（指針値：0.03 ppm）について、SHSレベル（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3、1.0 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10、0.30 ppm）での2時間単回吸入暴露を実施し、また情動認知行動解析のための吸入暴露実験に向け、ホルムアルデヒド（0、1.0 ppm：1.0 ppmは指針値の10倍濃度）について、SHSレベルでの22時間/日×7日間反復暴露をマウス（成熟期及び幼若期）に対して実施した。その結果、トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験において、ホルムアルデヒドの目標暴露濃度（0.1、0.3及び1.0 ppm）に対して、それぞれ0.0966、0.292及び0.998 ppm、アセトアルデヒドの目標暴露濃度（0.03、0.10及び0.30 ppm）に対して、0.0311、0.105及び0.312 ppm、他方、情動認知行動解析のための吸入暴露実験においては、ホルムアルデヒドの目標暴露濃度（1.0 ppm）に対して、成熟期暴露では1.04 ppm（104.0%）、幼若期暴露では0.865 ppm（86.5%）と、それぞれほぼ目標暴露濃度にて、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

なし

##### 2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純  
医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究  
第42回日本毒性学会学術年会(2015.6.29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、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と遅発性中枢影響解析  
第42回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡  
Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタログ化とその毒性予測利用  
第42回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白形芳樹、原健士朗、北嶋 聡、菅野 純  
幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬投与による神経行動毒性発現  
第18回環境ホルモン学会(2015.12.)

#### 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 吸入チャンバー内のホルムアルデヒドの被験物質濃度（2時間／日、単回暴露）

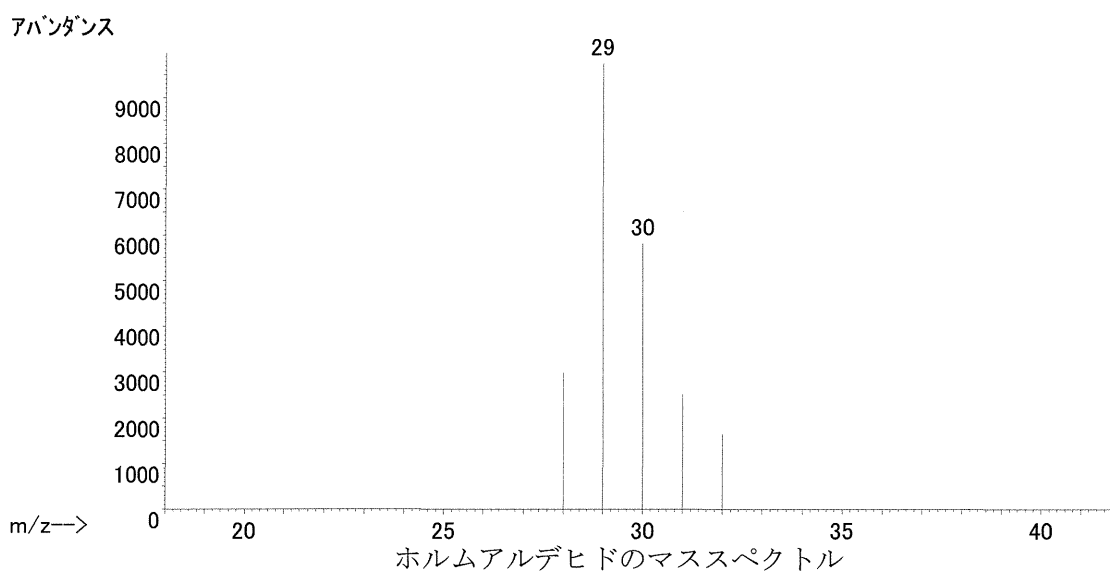
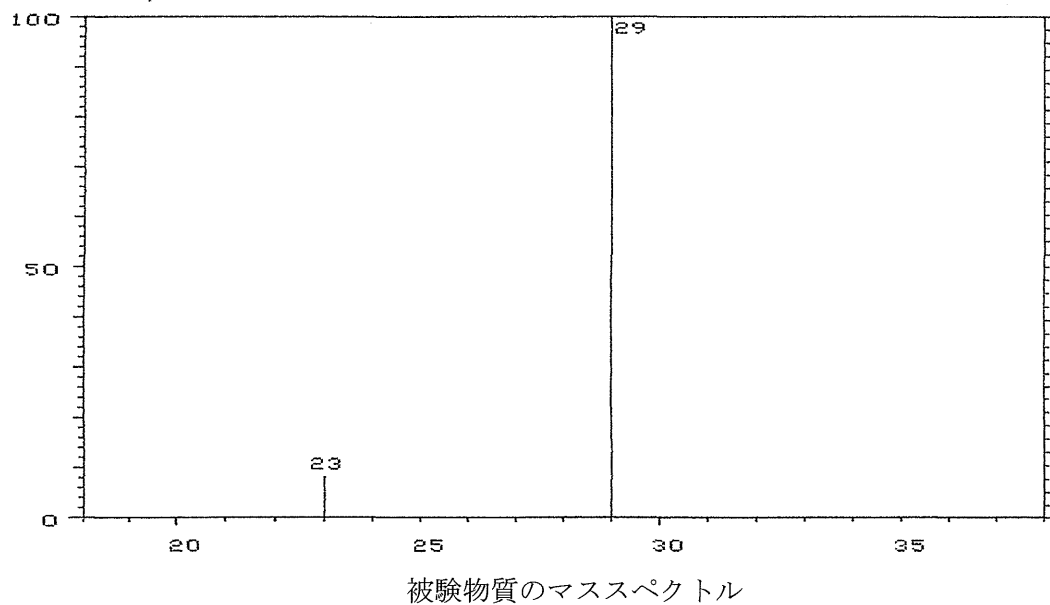
単位：ppm

	対照群	0.1 ppm群	0.3 ppm群	1.0 ppm群
平均濃度	0	0.0966	0.292	0.998
標準偏差	0	0.0014	0.008	0.020

表 2 吸入チャンバー内のアセトアルデヒドの被験物質濃度（2時間／日、単回暴露）

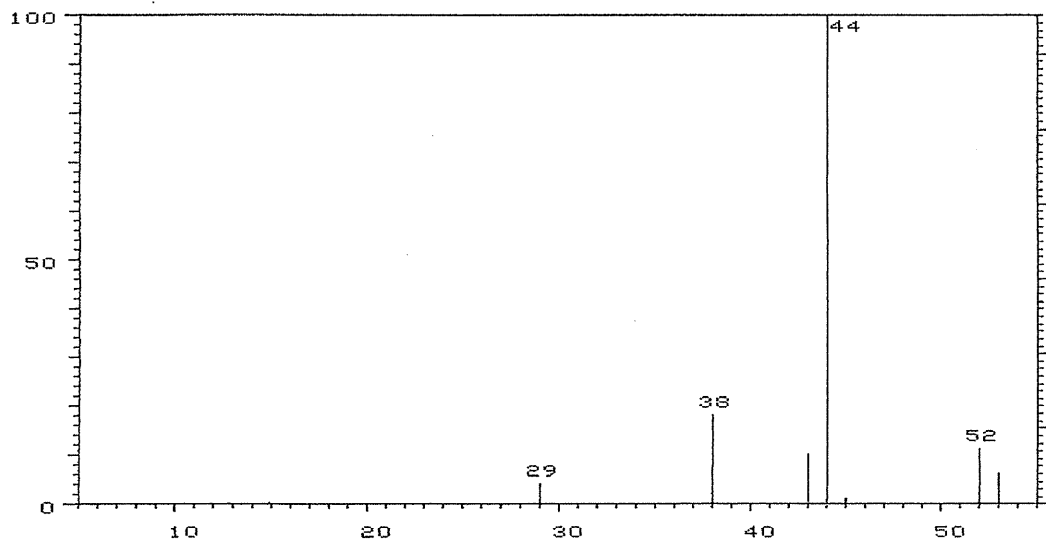
単位：ppm

	対照群	0.03 ppm群	0.10 ppm群	0.30 ppm群
平均濃度	0	0.0311	0.105	0.312
標準偏差	0	0.0003	0.003	0.005



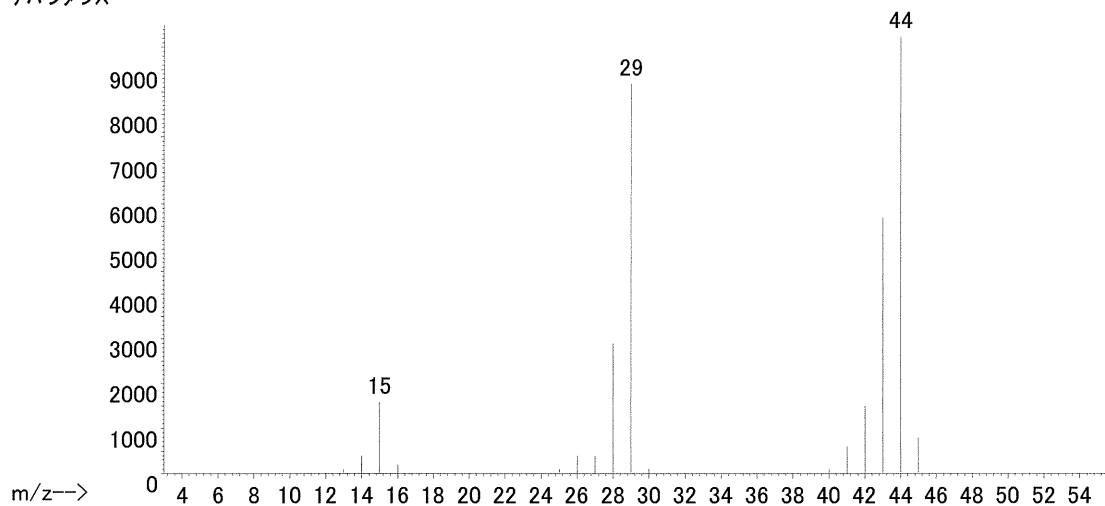
McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.  
6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.

図1 ホルムアルデヒドのマススペクトル



被験物質のマススペクトル

アブダンス



アセトアルデヒドのマススペクトル

McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.  
6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.

図2 アセトアルデヒドのマススペクトル



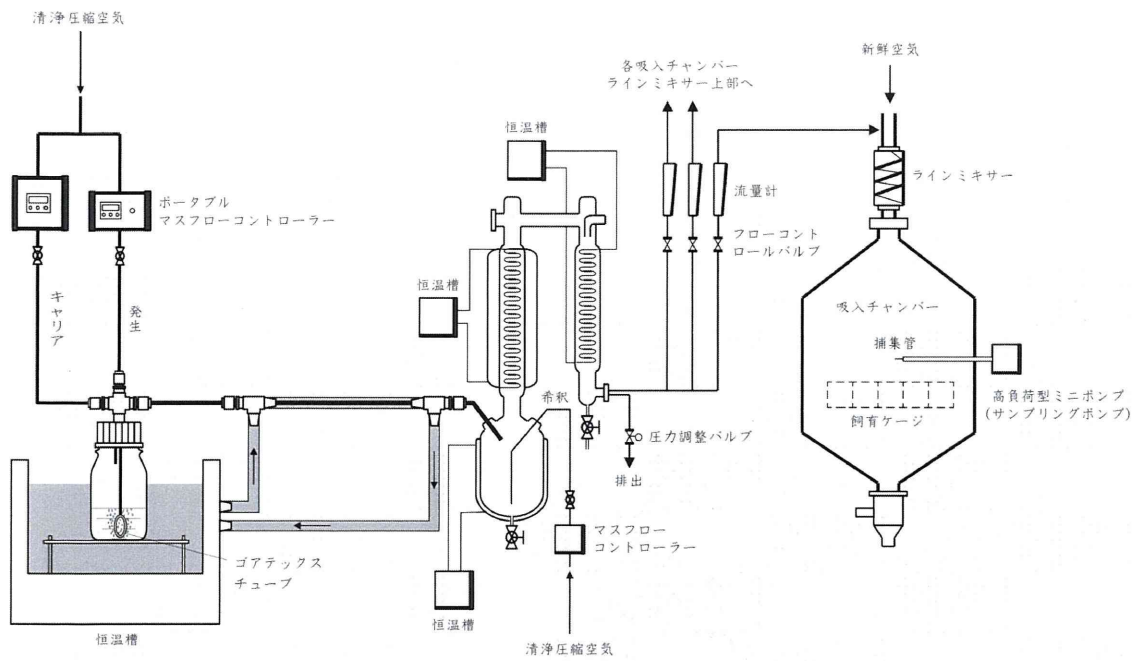


図3 吸入暴露装置のシステム (ホルムアルデヒド)

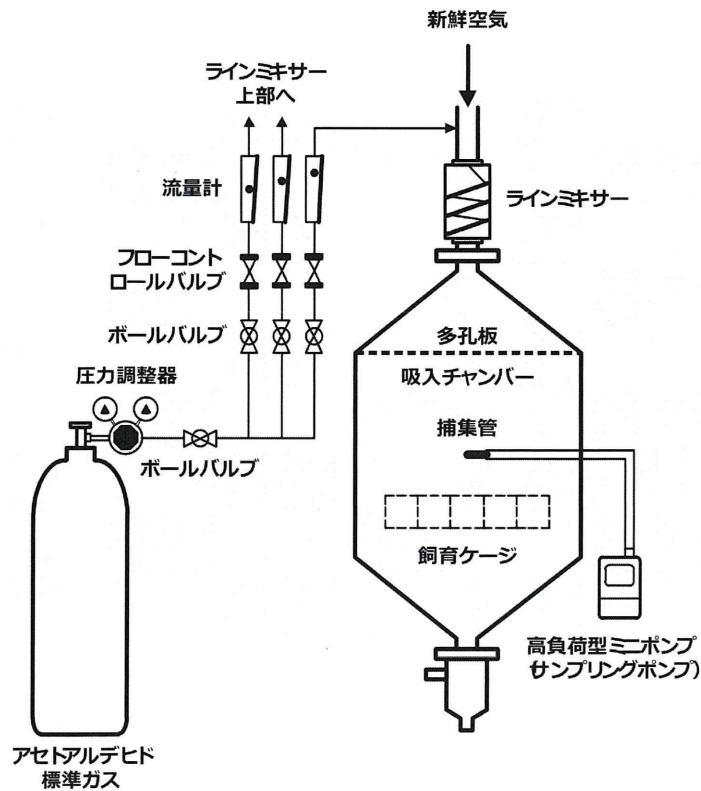


図4 吸入暴露装置のシステム (アセトアルデヒド)



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)

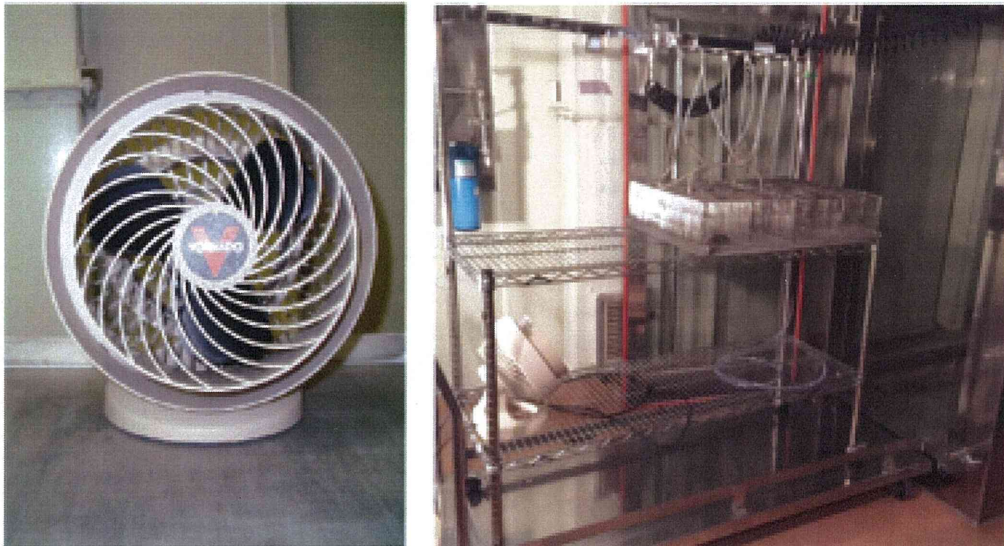


Photo 2 チャンバー内空気攪拌用サーキュレーター(ボルネード)、及び暴露ケージ(柴田科学)を載せた架台



Photo 3 マウスを暴露ケージ(柴田科学)に収容した状態

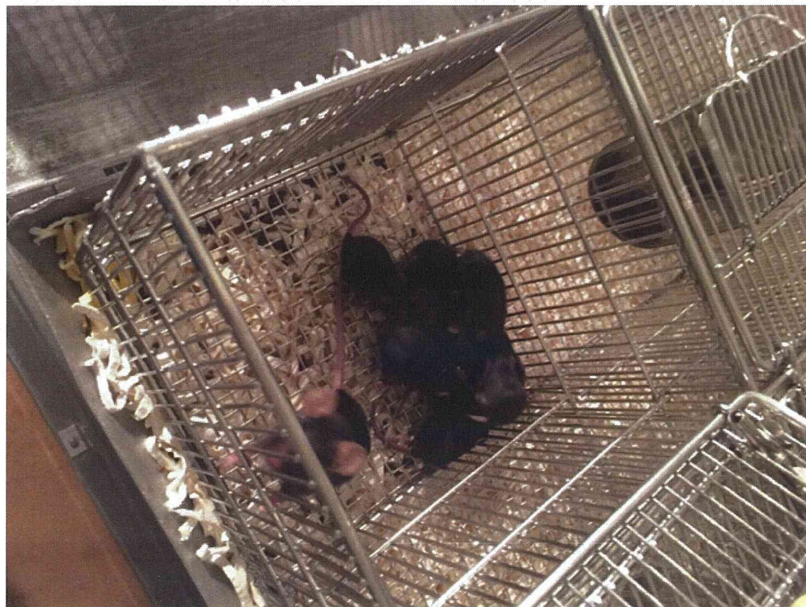


Photo 4 母児マウスを暴露ケージ(柴田科学)に収容した状態  
トレイ上にパルプ製床敷(パルマス μ)を敷き、暴露ケージに密着させた。



Photo 5 捕集管採気用ポンプ MP  $\Sigma$ -30、(柴田科学)



図 5. ホルムアルデヒドの発生装置

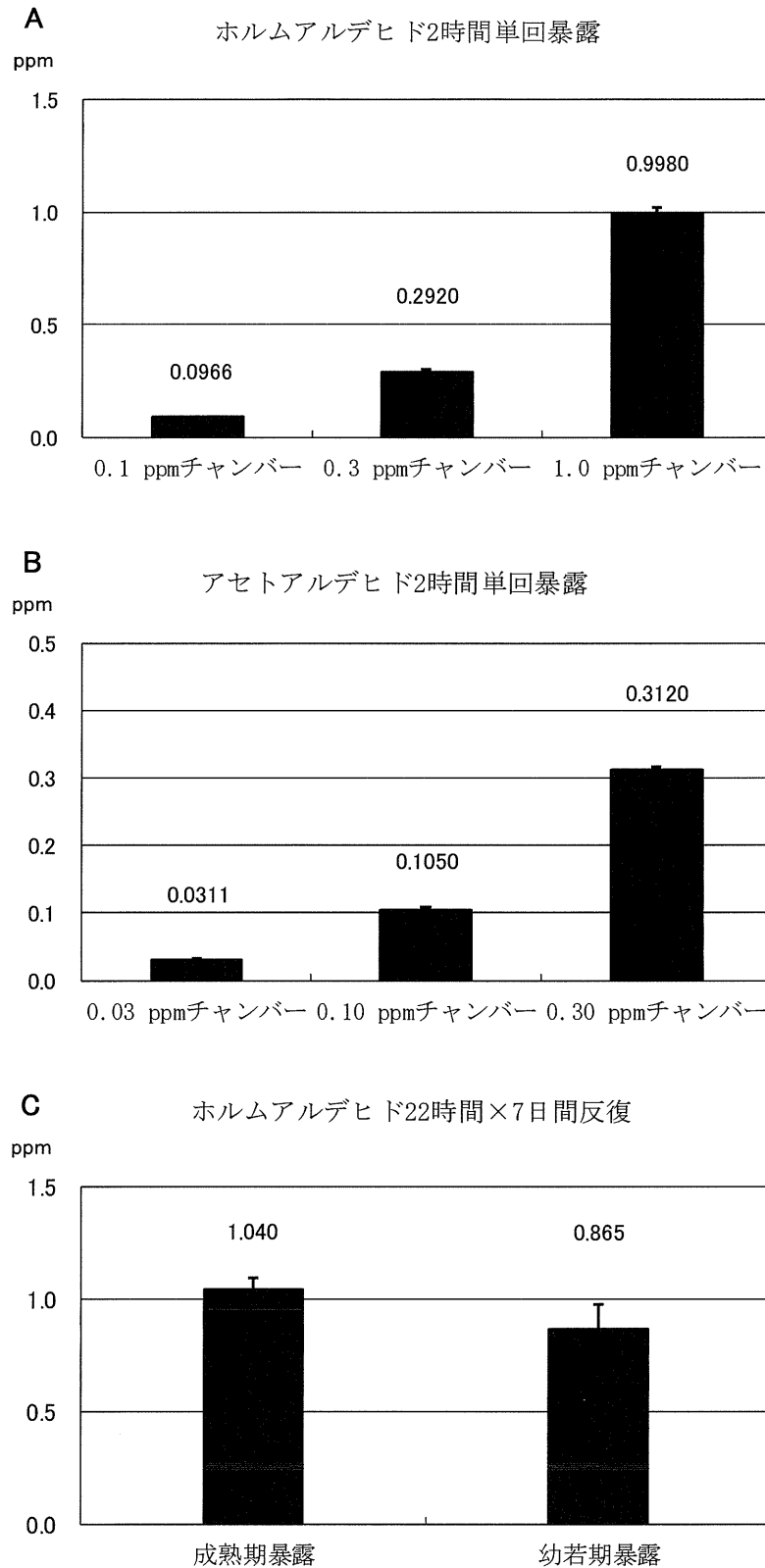


図6 本実験におけるホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド暴露濃度の測定結果  
 A: ホルムアルデヒド2時間単回暴露の場合、B: アセトアルデヒド2時間単回暴露の場合、  
 C: ホルムアルデヒド22時間/日×7日間反復暴露の場合 (平均値±標準偏差)。  
 平均値をグラフ中に記載した。

## 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

(2時間/日、単回暴露)

試験番号：0864

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 2 時間/日、単回全身暴露（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。投与濃度は、0.1、0.3 及び 1.0 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。投与終了時、並びに投与開始後 4 時間目、8 時間目及び 24 時間目に各群 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、目標投与濃度 0.1、0.3 及び 1.0 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差は、それぞれ  $0.0966 \pm 0.0014$  ppm、 $0.292 \pm 0.008$  ppm 及び  $0.998 \pm 0.020$  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。

## 1. 試験材料

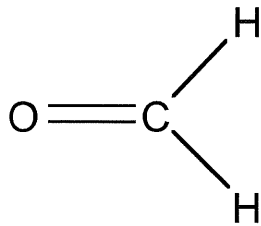
## 1-1 被験物質の性状等

## 1-1-1 名称等

名 称 : ホルムアルデヒド  
別 名 : メタナール、オキシメタン  
CAS No. : 50-00-0

## 1-1-2 構造式及び分子量

構 造 式 :



ホルムアルデヒド

分 子 量 : 30.03

## 1-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 刺激臭のある無色気体  
沸 点 : -19.2℃  
蒸 気 圧 : 1.33kPa(10mmHg)(-88℃)  
比 重 : 0.815

## 1-2 使用ホルムアルデヒド発生用原液

名 称 : ホルムアルデヒド液  
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社  
カタログ番号 : 064-00406  
ロット番号 : ECR1935  
純 度 : 37.1%(メタノールを7.0%含有)  
詳細は別紙-1参照

## 1-3 被験物質の特性

使用した被験物質の特性は、GC/MS（日立製作所 M-80B）を用いて定性した。その結果、ホルムアルデヒドに相当するイオンピークを確認した（図1）。



## 1-4 試験動物

## 1-4-1 種、系統及び清浄度

種 : マウス  
系 統 : C57BL/6J  
清浄度 : SPF

## 1-4-2 性及び導入匹数

雄 : 52匹

## 1-4-3 週齢

導 入 時 週 齢 : 生後10週齢 2015年4月14日生まれ  
投与開始時週齢 : 生後12週齢  
解剖サンプリング時週齢 : 生後12週齢

## 1-4-4 供給業者

日本チャールス・リバー (株) 厚木飼育センター

## 1-4-5 検疫及び馴化

動物導入後、1週間の検疫を行った。検疫期間後、動物を吸入チャンバー室に移動し、1週間の馴化を行った。

検疫期間 : 7日間 (2015年6月23日～2015年6月29日)  
馴化期間 : 7日間 (2015年6月30日～2015年7月 6日)

## 2. 試験方法

## 2-1 投与

## 2-1-1 投与経路

投与経路は全身吸入暴露による経気道投与とした。

## 2-1-2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

## 2-1-3 投与期間 (図2参照)

投与は単回2時間暴露 (午前10時から午後0時) とした。

## 2-1-4 投与濃度

投与濃度は、0.1、0.3及び1.0 ppmの3段階 (公比約3) に設定した。なお、対照群は

HEPAフィルターと活性炭フィルターにより濾過した新鮮空気による換気のみとした。

#### 2-1-5 投与経路及び投与濃度の設定理由

投与経路は、室内環境におけるヒトへの主な暴露経路に合わせ、全身吸入暴露とした。

投与濃度はホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08 ppmを考慮して、最高投与濃度を1.0 ppmとし、以下0.3、0.1 ppmの3段階の濃度（公比約3）を設定した。

#### 2-1-6 ホルムアルデヒド暴露に関する国立医薬品食品衛生研究所での経緯

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 毒性部では、ホルムアルデヒドを正確にマウスに暴露するために、2種類の吸入チャンバーを用いてチャンバー内ホルムアルデヒドの濃度検討を行った。

当初は、縦層流の40L小型チャンバーを用いてホルムアルデヒドをマウスに暴露した。その結果、暴露したホルムアルデヒドの濃度にかかわらず、チャンバー内ホルムアルデヒドの濃度はゼロとなり、チャンバー内の濃度コントロールが不能であった。しかしながら、マウスのいない空チャンバーの状態ホルムアルデヒドを暴露すると、設定どおりのホルムアルデヒドの暴露が可能であった。このことから、暴露したホルムアルデヒドは40Lのチャンバー内でマウスの被毛に吸着し、チャンバー内濃度が急激に低下したことが考えられた。

次に、横層流で3000Lの大型チャンバー(毎分560L送気量)を用いて、ホルムアルデヒドをマウス用の100匹用大型ラックに12匹のマウスを集中的に配置した状態で暴露した。その結果、ホルムアルデヒドの濃度はゼロとなり、チャンバー内の濃度コントロールが不能であった。このことから、暴露したホルムアルデヒドは3000Lの広いチャンバー内であっても、横層流による暴露及び集中配置したマウスの被毛にホルムアルデヒドが吸着し、チャンバー内濃度が急激に低下したことが考えられた。

#### 2-1-7 ホルムアルデヒド暴露の予備検討結果

当センターでは、縦層流の1060Lの中型チャンバー(毎分212Lの送気量)でマウス(系統:CrIj:CD1(ICR)・供給会社:日本チャールス・リバー(株) 厚木飼育センター・週齢:6週齢)を平置き均一配置(12匹)にした状態で、ホルムアルデヒドの暴露検討を行った。ホルムアルデヒドの発生は、循環式恒温槽(5℃)中のホルムアルデヒド液入り密封容器に、清浄空気(発生空気及び搬送空気)を供給しホルムアルデヒドを気化させた。このホルムアルデヒドを含む空気を被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)に導入し、同装置内で清浄空気(希釈空気)と混合し、循環式恒温槽で一定温度(23℃)にした後、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た。また、チャンバー内濃度の確認は、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 S10L(カタログ番号:505361-U 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。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。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。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(4.6mm

φ×150mm、粒径：5μm（財）化学物質評価研究機構）、検出波長はUV260nm、試料注入量は10μL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、0.1～10μg/mLの範囲で検量線を作成した。

その結果、動物のいない空チャンバーでホルムアルデヒドを暴露したチャンバー内のホルムアルデヒドの濃度は、設定濃度を0.1ppmとした暴露チャンバーでは0.12ppm、0.3ppm暴露チャンバーでは0.33ppm、1.0ppmチャンバーでは1.35ppmであった。

一方、動物を入れたチャンバーでホルムアルデヒドを暴露したチャンバー内のホルムアルデヒドの濃度は、0.1ppm暴露チャンバーでは0.11ppm、0.3ppm暴露チャンバーでは0.32ppm、1.0ppmチャンバーでは1.18ppmであった。この結果、空チャンバーに比較して、マウスの入ったチャンバーでは、ホルムアルデヒドの濃度が約10%弱減衰したものの、チャンバー内のホルムアルデヒド濃度のコントロールは、0.1ppm～1.0ppmの範囲で十分に制御できた。

以上のことから、ホルムアルデヒドを低濃度でマウスに正確に暴露するための条件は、ホルムアルデヒドを冷却して発生し、縦層流及び容量を十分に確保した(1000L以上)吸入チャンバーを用い、マウスを平置き均一配置にすることであり、これらの条件により、マウスの被毛に対するホルムアルデヒドの吸着は若干認められたものの、動物を挿入したチャンバー内ホルムアルデヒドの濃度減少はほとんど無く、低濃度におけるチャンバー内ホルムアルデヒドの濃度コントロールが可能であった。

#### 被験物質の暴露方法

循環式恒温槽（5℃）中のホルムアルデヒド液入り密封容器に、清浄空気（発生空気及び搬送空気）を供給しホルムアルデヒドを気化させた。このホルムアルデヒドを含む空気を被験物質供給装置（柴田科学(株)特注）に導入し、同装置内で清浄空気（希釈空気）と混合し、循環式恒温槽で一定温度（23℃）にした後、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た。対照群は新鮮空気の換気のみとし、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。

#### 2-1-8 被験物質濃度の測定

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。すなわち、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 S10L(カタログ番号：505361-U スペルコ社)を吸入チャンバー内に挿入し、2時間、吸入チャンバー内のホルムアルデヒドを捕集した。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れ、そのホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル(HP LC分析用 和光純薬工業株式会社)10mL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。なお、HPLCの分析条件に関して、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(4.6mm φ×150mm、粒径：5μm（財）化学物質評価研究機構）、検出波長はUV260nm、試料注入量は10μL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  $\mu$ g/mLの範囲で検量線を作成した。

## 2-2 動物管理

### 2-2-1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群 12 匹の動物を用いた。また、投与終了時、投与開始後 4 時間目、8 時間目及び 24 時間目の解剖期を設けた。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	解剖期	雄 使用動物数(動物番号)
0	対照群	投与終了時解剖	3 匹 (1001～1003)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1004～1006)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1007～1009)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1010～1012)
1	0.1 ppm 群	投与終了時解剖	3 匹 (1101～1103)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1104～1106)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1107～1109)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1110～1112)
2	0.3 ppm 群	投与終了時解剖	3 匹 (1201～1203)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1204～1206)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1207～1209)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1210～1212)
3	1.0 ppm 群	投与終了時解剖	3 匹 (1301～1303)
		投与開始 4 時間目解剖	3 匹 (1304～1306)
		投与開始 8 時間目解剖	3 匹 (1307～1309)
		投与開始 24 時間目解剖	3 匹 (1310～1312)

### 2-2-2 群分け及び個体識別方法

群分けは、投与前日に行った。供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した。

動物の個体識別は、検疫期間、馴化期間及び投与期間ともケージに個体識別番号を記したラベルを付すことにより行った。なお、動物はバリア区域内の独立した室（516 室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他の試験及び異種動物と区別した。

### 2-2-3 飼育条件

#### (1) 飼育環境