

200501166A

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手法の
開発、高度化に関する研究

(H17-化学-003)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 幸男

平成 18(2006)年 3 月

別添 1

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手法の開発、高度化に関する研究

(H17-化学-003)

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 小川 幸男

平成 18(2006)年 3 月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

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

小川 幸男 1

II. 分担研究報告書

1. トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露による網羅的遺伝子発現解析

小川 幸男 10

2. 吸入暴露による網羅的遺伝子発現データの解析による吸入毒性評価と経口暴露の比較研究

菅野 純 20

3. 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

長野 嘉介 27

4. 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

今田中伸哉/辻村 和也 (H17.10.3付研究者交替) 33

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 43

IV. 研究成果の刊行物・別刷 44

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書

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

主任研究者 小川 幸男 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部室長

研究要旨

気化性化学物質の吸入によるリスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスとして、小型実験動物(マウス)の小規模な実験から、肺及び肝臓に於ける遺伝子発現の網羅的なプロファイルを生成することにより、インフォマティクス技術の構築を通して、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気化性化学物質の安全性確保の為の、毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速且つ正確・精密な吸入毒性予測・評価システムの開発について検討した。このシステムの開発により、1) 吸入毒性評価の効率化(実験期間及び解析時間の短縮)、2) 実験動物から人への外挿の正確さの向上、3) 毒性発現メカニズムに支えられた包括的な吸入毒性評価(急性、慢性毒性、呼吸器限局性及び全身性の影響の統合などを含む)、の面で飛躍的な進捗が期待される。具体的にはシックハウス症候群への対応を取り上げ、高感度指標及び有害性指標としての有用性を検討するため、4つの分担研究によって構成し、初年度は低濃度暴露を可能とする設備改修を含む研究体制を固め、ホルマリンを最初の対象物質としてデータ採取・解析を進めた。

A. 研究目的

本吸入トキシコゲノミクス研究は気化性化学物質リスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現変化解析法を毒性学に適用するものであり、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質トキシコゲノミクスデータベースを構築することにより、インフォマティクス技術を活用した気化性化学物質の安全性評価の為の、より迅速、正確且つ安価な評価システムを構築することを目的とする。また、高感度指標及び有害性指標としての有用性を検討する目的で、アレルギー関連物質ヒスタミンを高感度測定し、遺伝子発現変化解析とともに化学物質の生体反応の関連性についても検討する。これにより、吸入毒性発現メカニズムに基づいた、より正確な吸入毒性

の評価及び評価システムの作成、更に、シックハウス症候群の様に、ヒトに於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吸入毒性分野の精度・感度向上への貢献を目指す。

吸入毒性に関わる評価については、気化性化学物質によるシックハウス症候群に代表されるが如く、ヒトに於ける被害報告濃度と実験動物の器質変化濃度の乖離が甚だしく、実験動物による吸入毒性試験の毒性指標(測定項目)ではカバーすることが難しいことが示唆されており、安全性確保をより確実なものとする何らかの方策が必要であるとされてきた。この様な、従来の方が持つ問題を包括的に解決する方策として、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティ

クスの構築が有効であることは内外の研究活動の方向性が示すところである。

B. 研究方法

(1) トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露による網羅的遺伝子発現解析

第一検討物質として選択したホルマリンをマウスに吸入暴露するシステムを整備し、肺、肝を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。マウスへの暴露濃度は室内汚染化学物質の室内濃度指針値である0.08ppmを参考にし、0.001ppm、0.01ppm、0.1ppmとし、暴露システム整備を検討した。

現有設備を活用してこのような極低濃度のホルムアルデヒド暴露システムを達成するために、当初、横層流型大型チャンバーと縦層流小型チャンバーを併用した希釈方法を検討したが、縦層流小型チャンバー発生装置単独でのホルムアルデヒド蒸気発生希釈を検討したところ、小型チャンバー単独で目標濃度が得られることが判明した。検体を暖める温浴の温度、発生ガスを冷却する温度、バブリングする気流量、希釈流量などの調節を経てガス濃度調整を行い、高感度ホルムアルデヒドガスモニターによる測定と、捕集管による測定で安定して設定濃度を得られる条件を見出した。

他方、マウスを暴露装置に投入すると、その直後にガスモニター表示値が測定限界以下となる問題が明らかとなり、原因としてマウス被毛へのホルムアルデヒドガス吸着が考えられた。そのため、送気濃度を0.1、0.3、1.0ppmに上げ、容量の大きい横層流型大型チャンバーを用い、且つ、内部に電動ファンを設置しチャンバー内の気相を強力に攪拌することによりマウス存在下で所定の暴露装置内濃度が得られる条件を確定した。この

条件でマウスへの暴露を行い、肺及び肝の遺伝子発現の網羅的プロファイルを取得した。暴露時間は2時間とし、臓器採取は暴露終了直後、その2時間後、6時間後、及び22時間後の4時点にて実施した。

(2) 吸入暴露による網羅的遺伝子発現データの解析による吸入毒性評価と経口暴露の比較研究

上記(1)の条件にてホルマリンに経気道短期暴露されたC57BL/6CrSlcマウスの肺と肝臓を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。ホルマリンの指針値0.08ppmに対し、2時間吸入時の実測暴露濃度(捕集管値)は0、0.175、0.302、及び0.745ppmであった。これは、マウスの呼吸量を1分当たり13.2mLとした場合に、各々13.8、23.9、58.9ug/kg/2hrの暴露量に相当する。2時間の経気道暴露の後にすぐに臓器を採取した群を2時間群とし、更に2、6、22時間後採取群を4、8、24時間群とした(別途実施の単回経口暴露実験との整合性を保つため)。得られた肺、肝臓について、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。DNAマイクロアレイはAffymetrix社のGeneChip(Mouse Genome 430 2.0)を用いた。データ解析に当たっては、別途当方で得た経口単回暴露(0、3、10、30mg/kgの4用量、時間は同一条件)後のデータと比較した。

(3) 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

1. ホルムアルデヒドガスの発生方法

シックハウス症候群で問題とされているホルムアルデヒドガスは極低濃度であり、従来の吸入暴露実験の設定のままでは困難であ

ることが予想された。そこで、その濃度域での暴露を実現するために、ガス発生方法の調査を行った。その結果、従来用いられてきた、1) パラホルムアルデヒドを加熱する方法、2) ホルマリン水溶液を噴霧する方法に加え、3) ホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法が考えられた。以下、各方法について記す。

1) パラホルムアルデヒドを加熱する方法

固体であるパラホルムアルデヒドを発生容器中で加熱し、昇華したホルムアルデヒドを希釈して動物に暴露する方法で、従来試験の多くがこれを用いている。加熱温度は、54～90℃であり、発生容器の容量と加熱温度によってホルムアルデヒド蒸気の発生量を調整している。発生したホルムアルデヒドを発生容器から送り出すキャリアーガスは、空気を使用している報告が多いが、窒素ガスを用いる報告もある。

2) ホルマリン水溶液を噴霧する方法

ホルマリン水溶液を、ネフライザーを用いて噴霧することによりホルムアルデヒド蒸気を発生させる方法である。この方法で使用するホルマリン水溶液は、重合を防止するために5%から13%の割合でメチルアルコールが添加されている。

3) ホルムアルデヒドの標準ガスを用いる方法

現在、大気汚染物質測定用に標準ガスが市販されている。ホルムアルデヒドについても、1 ppmと20 ppmの標準ガスが入手できる。この標準ガスボンベのホルムアルデヒドをさらに希釈して動物に暴露する方法である。ホルマリン液には安定化剤としてアルコールが添加されており、その影響が常に問題となるが、ボンベで供給される場合はアルコールが含まれておらず、この問題を回避することができる利

点を有する。

2. ホルムアルデヒドの濃度制御の方法

次に、発生したホルムアルデヒドを空気と混合し、設定濃度に希釈して、動物を収容した吸入チャンバーに送気する方法を調査検討した。その結果、いずれの報告も発生したホルムアルデヒド蒸気と空気との流量比をフローメータにより調整し、一定濃度のホルムアルデヒド混合空気を作成していることが分かった。その他の工夫として、発生容器の容量と加熱温度によってホルムアルデヒド蒸気の発生量を調整していること、発生したホルムアルデヒド蒸気をテドラバックに一時的に集め、テドラバックからの流量により微調整していることが分かった。ホルムアルデヒド発生装置と吸入チャンバーの間に混合槽を設け、段階的に希釈していた。

希釈に使用する空気については、過去の実験報告では特に考慮されていなかった。一方で、大気中のホルムアルデヒド濃度は、一般環境大気で0.2～7 ppb(幾何平均値:2 ppb)、室内空気で16～211 ppb(幾何平均値:50 ppb)と報告されていた(環境省、2002)。

3. 吸入チャンバー内のホルムアルデヒド濃度をモニターする方法

極低濃度のホルムアルデヒド濃度をモニターする方法を調査した。

ホルムアルデヒドの測定方法は、1) 気中濃度を直接測定する方法、2) 捕集法による分析がある。

1) 気中濃度を直接測定する方法には、赤外分光光度計、ガスクロマトグラフィー、光音響ガスモニター等の機器が用いられている。赤外分光光度計によるホルムア

ホルムアルデヒドの分析限界は数ppmであり、空气中に混在する他のガスの影響を受けやすい。ガスクロマトグラフィーによる方法は、メタナイザによるメタン変換後にFID検出器で測定すると測定限界が100 ppb、PDD検出器で測定すると測定限界が30 ppbである。光音響ガスモニターは、赤外線を吸収する性格を利用する方法であり、測定限界が40 ppbであり、測定に要する時間が1分未満である。

2) 捕集法による分析は、一般環境大気中のホルムアルデヒド濃度の測定に使用されている方法である。捕集剤にDNPH含浸シリカゲルを用い、高速液体クロマトグラフィーにより分析する方法では、20 Lの空気(1000 ml/分、20分)を捕集するとホルムアルデヒド濃度をppb単位で測定することができる。

(4) 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒドの長期低濃度吸入暴露実験を行うための暴露システムの整備に加え、高感度指標及び有害性指標としての生体内ヒスタミンの有用性検討を行った。

1. 低濃度吸入暴露法の確立

1.1 分析手法の確立及び実験環境下のホルムアルデヒド濃度確認

発生法検討に先立ち、気中ホルムアルデヒド分析手法の確立及び実験環境下の潜在的に存在するホルムアルデヒド濃度の確認を行った。操作ブランク(n=3)から算出した定量限界値は、0.941 ppbであった。本研究に於いては1 ppbを定量限界値と設定した。

次に、実験環境下に於ける潜在的ホルムアルデヒド濃度の測定を行った。吸入実験室内、アイソレーションラック内(動物無・

マウス飼育)及び屋外濃度は、それぞれ、1.61 ppb、1.89 ppb、1.95 ppb 及び 2.00 ppb であり室内に於いても屋外と同程度のホルムアルデヒド濃度であった。

また、換気流量を変化させた時の全身暴露チャンバー内濃度は、換気流量が増えるに従い、減少傾向が見られ、換気流量300 L/分 15分換気が最低濃度を示した。本条件(換気流量 300 L/分 15分)で処理後の各全身暴露チャンバー内ホルムアルデヒド濃度を見てみると、4.95～9.08 ppbであった。

次に、室内吸気HEPAフィルター前に市販活性炭フィルターを設置したが、その効果はみられなかった。

1.2 発生法検討

室内濃度指針値である80 ppb及び日本化学会誌防災指針、厚生省「住宅建建材ガイドライン」を参考に発生目標濃度を中濃度群:80 ppb、高濃度群: 400 ppbとし、発生条件の検討を行った。発生条件は、3 L/分及び0.7 L/分の発生流量でばっ気、換気流量 300L/分、ウォーターバス温度及び冷却管温度をそれぞれ約 30℃及び20℃に制御した。発生後 0.5、1 時間の濃度測定を行った。中濃度及び高濃度それぞれ平均 75.4 ppb 及び 437 ppb の発生が可能であった。一方、低濃度群に於いては実験環境濃度を参考に目標濃度をチャンバー内バックグラウンド濃度の約 3 倍の 30 ppb とした。低濃度の発生には 20 ppm に濃度制御されたホルムアルデヒドポンベを用いた。暴露チャンバーへの流量を 0.4 L/分に制御した。換気流量は 300 L/分で行った。発生後 0.5 時間、1 及び 3 時間の濃度は、それぞれ 20.8 ppb、30.2 ppb 及び 22.7 ppb(平均 24.6 ppb)であった。次に同じ発生条件下で、高濃度群及び低濃

度群について、マウス 12 匹/群、6 時間の単回暴露を行い、発生後 1、3、6 時間に於ける発生濃度の確認を行った。高濃度群に於ける平均濃度は 464 ppb であった。一方、低濃度群では、平均濃度 34.7 ppb であった。

1.3 ホルムアルデヒド7日間反復吸入暴露

1.2 で設定した条件で、7 日間の反復暴露を行った。又、発生濃度については、Day 1、3 及び 7 に於いて、発生開始後 1、3 及び 5 時間後にサンプリングを行い、実測定を行った。濃度監視に於いては、検知管を用いた。その結果、各濃度群に於ける実測濃度の平均値は、低濃度群：27.5±0.681 ppb (設定値 30 ppb)、中濃度群：96.8±38.1 ppb (設定値 80 ppb) 及び高濃度群：450±31.4 ppb (400 ppb) であった。これらの結果から、6 時間/日、7 日間の安定な発生が可能となった。

2. ヒスタミン測定

シックハウス症原因 4 物質(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン)を経口投与した時のマウス血漿中ヒスタミン濃度を酵素免疫測定 (ELISA) で定量した。

C. 研究結果

(1) トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露による網羅的遺伝子発現解析

現有の暴露施設が非極性のベンゼン等の低濃度吸入暴露に適したシステムであったことを踏まえ、このシステムに小変更を加え、極性のホルムアルデヒドを始めとする多くの異なる気化性化学物質にも対応可能なものとすべく検討、改修を行い、ホルムアルデヒド低濃度ガス発生法と濃度の検出法を確定した。また、その結果を受け、ホルムアルデヒドの低濃度ガスをマウスに暴露し、

肺及び肝の遺伝子発現の網羅的プロファイルを取得した。

(2) 吸入暴露による網羅的遺伝子発現データの解析による吸入毒性評価と経口暴露の比較研究

ホルムアルデヒド経気道暴露のデータを解析した結果、最も多くの遺伝子の発現が変化した臓器は肝臓であり、発現変動が示唆された遺伝子数は約 400 であった。一方、経気道暴露による肺では約 60 種類の遺伝子の発現変動が示唆された。また、経口短期暴露では、肝臓で約 60 種類、肺で約 110 種類の遺伝子の発現変動が示唆された(投与経路から遠いと思われる臓器に多く変動が認められた)。以下で、吸入暴露により発現変動が認められた遺伝子について考察を加えた。

まず、化学物質代謝に関わる遺伝子として、アラキドン酸、リノール酸を代謝する Cyp2c55 の他、Glutathione S-transferase (GST)、mu2、mu3、theta3 の発現誘導が認められた。どれも暴露後 24 時間の時点で暴露量依存的に発現上昇するパターンを示した。これは、吸収されたホルムアルデヒドによる代謝酵素誘導に一定の時間を要することを示唆する。

また、DNA 障害への対応に関与する RAD9 の発現上昇がやはり 24 時間目に用量依存的に認められた。これがホルムアルデヒドによる DNA 障害を反映するものであるかは検証が必要であるが、注目すべき変化である。

更に、マレイン酸をピルビン酸へ代謝する Mod1 (malate dehydrogenase) や、クエン酸回路に於けるオキサロ酢酸からクエン酸への代謝を担う CS (citrate synthase) の発現上昇も認められ、糖ヌクレオチド運搬体である Slc35b4 も発現上昇した。また、T 細胞活性化に関わる Ly6a (Sca-1) の発現が 2、24 時間

の時点で発現上昇した。

2 時間時点で発現上昇した遺伝子として、膜タンパクで金属イオン結合領域を持つが機能不明である Zinc finger DHHC domain containing 12 (Zdhhc12)やアポトーシスへの関与が示唆される B-cell leukemia/lymphoma 6(Bcl6)があり、ホルマリンの生物作用といかに関連するか更に解析を加える必要がある。

(3) 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

- 1) ホルムアルデヒドガスの発生方法は、市販されている標準ガスを利用することによって簡便化できるとともに、ホルマリン液に添加されているアルコールの影響を排除できる。
- 2) 空気との混合及び濃度制御の方法は、流量比による制御が基本であり、極低濃度暴露の場合には希釈率の限界を考慮して混合槽による段階希釈等を行う必要がある。また、希釈に使用する空気からの化学物質の除去が必要である。
- 3) 濃度測定は、濃度制御のためのモニターには直接測定、吸入チャンバー内の暴露濃度の精度を確認するためには捕集法による分析が適しており、極低濃度暴露実験には、両者を併用するのが合理的である。

(4) 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

ホルムアルデヒドの低濃度吸入長期暴露方法を検討し、実験環境下に 1-2 ppb レベルのホルムアルデヒドが存在する結果を得、ホルムアルデヒドボンベ及びホルマリン希釈液をばっ気及び希釈することで低濃度(設定濃度 30 ppb)から高濃度(設定濃度 400 ppb)に至るま

で1日6時間、合計7日間、安定に吸入暴露させることを可能とした。また、高感度指標及び有害性指標としての有用性を検討する目的で、アレルギー関連物質のひとつである生体中ヒスタミン変動をシックハウス症原因4物質(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、トルエン、キシレン)を経口投与したマウス血漿について酵素免疫測定(ELISA)を用いて定量検討した。その結果、トルエンでわずかに用量依存的なヒスタミンの増加傾向がみられたが、顕著なヒスタミン変動を見出すことは出来なかった。

D. 結論

(1) トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露による網羅的遺伝子発現解析

現有暴露施設のシステム変更を行い、極性気化性物質であるホルマリンをマウスに短期間安定して低濃度暴露するシステムを確立した。それによりホルマリンの低濃度ガスをマウスに暴露し、肺及び肝の遺伝子発現の網羅的プロファイル取得に成功した。次年度も引き続きシックハウス関連物質の低濃度吸入暴露システムの構築を行う。次の物質として、ホルマリンを検討した際に得た経験を生かし、アセトアルデヒド暴露システムの整備と遺伝子発現プロファイル取得を行う。

(2) 吸入暴露による網羅的遺伝子発現データの解析による吸入毒性評価と経口暴露の比較研究

ホルマリンの吸入暴露と経口暴露の肺、肝に於ける網羅的遺伝子発現データを比較解析し、吸入暴露により肝で種々の遺伝子の発現が誘導されたことを見出し、化学物質の経気道暴露による生体反応変化を捉えるのに、網羅的遺伝子発現解析手法が有効であることを実証する結果を得た。以上、今年

度の解析結果は、ホルマリンの経気道暴露により肝臓で種々の遺伝子の発現が誘導されたことを示し、化学物質の経気道暴露による生体反応変化を捉えるのに、複数臓器を対象とした網羅的遺伝子発現解析手法が有効であることを実証するのに十分な結果であると考えられる。また、今回取り上げた遺伝子は経口投与では弱く発現上昇するか変化が認められないものであった。ホルマリンの経気道暴露と経口投与暴露で肝臓の反応が異なる意義について今後検討する必要がある。

(3) 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

ホルムアルデヒドを例に取り、過去に於ける吸入暴露実験の報告及び現在の吸入暴露技術等の資料を収集し、100 ppb から 1 ppb の濃度でホルムアルデヒドを実験動物に吸入暴露するための方法について検討し、次年度以降に実施予定である各種気化性化学物質の連続暴露実験手順を提案した。

(4) 室内空気汚染化学物質を用いた低濃度吸入暴露実験

高感度指標としてのヒスタミン高感度測定について、投与経路を含めた今後の検討が必要であることが分かった。

E. 考察

人に於ける吸入毒性作用を、毒性発現のメカニズムに基づいて、より迅速、正確且つ詳細に予測可能となることである。これにより、呼吸器、特に肺を第一の標的とした影響のみならず、血液を介した全身影響、あるいは嗅覚を介した神経影響等を包括的に評価することが可能となると期待される。特に、これまでに捕捉不能であった、器質的な変質を伴わない低

濃度吸入暴露による毒性を、遺伝子発現解析を通じて検出することが可能となれば、それによりシックハウス症候群などの対応にも格段の改善が予想される。本年度得られた基礎的情報を元に、次年度以降、2時間単回暴露、6時間/日、7日間暴露、及び22時間/日、7日間暴露実験を分担実施し、その影響差を検討する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sekita K., Umemura T., Saitoh M., Ogawa Y., Ueno K., Kaneko T., Uchida O., Matsushima Y., Kawasaki Y., Inoue T. Kooroo Color: 90-Day Toxicity Study in F344 Rats. J Food Hyg. Soc. Japan, 43: 148-154, 2002

Ogawa Y., Sekita K., Umemura T., Saitoh M., Ono A., Kawasaki Y., Uchida O., Matsushima Y., Inoue T., Kanno J. Gymnema sylvestre Leaf Extract: A 52-Week Dietary Toxicity Study in Wistar Rats. J Food Hyg. Soc. Japan, 45: 8-18, 2004

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, and Taku Nagao, "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays
BMC Genomics. 2006 Mar 29;7:64.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen

receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA.2006 103(1):224-9

2. 学会発表

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1～3日、東京

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Per cell" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference "Toxicogenomics", (2005.6)

◎菅野 純 神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害のPercellome トキシコゲノミクス研究
第32回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

◎五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純 飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析
第32回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、相賀裕美子、菅野 純 Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the "Percellome" system as a model for molecular developmental toxicity

第32回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純 Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice
第32回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野純 Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法
第32回日本トキシコロジー学会学術年会 (2005.7)

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics
the 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2005.8)

◎ Jun Kanno Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics(2005.8)

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama "Percellome" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics(2005.8)

中津則之、相崎健一、菅野純
Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発
現変動解析

第 64 回日本癌学会学術総会(2005.9)

◎五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎
健一、北嶋聡、菅野純 飼料中の植物エスト
ロジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響
環境ホルモン学会第 8 回研究発表会
(2005.9)

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、
北嶋聡、五十嵐勝秀 雌性マウスにおける視
床下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現の
Percellome 解析

環境ホルモン学会第 8 回研究発表会
(2005.9)

Jun Kanno Approaches by Basic Biology to
Reinforce the Screening and Testing
Strategy for the Endocrine Disruptors
KFDA/NITR International
Symposium(2005.10)

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸
夫、菅野純 Diethylnitrosamine 及び
N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝
子発現変動解析

第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純
マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマ
イクロアレイ解析

第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

北嶋 聡、Glenn I. Fishman、富田幸子、井
上 達、菅野 純、相賀裕美子 転写因子
Mesp1 非発現細胞はマウス刺激伝導系細

胞に寄与する

第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

安彦行人、原口清輝、高橋 雄、菅野 純、
相賀裕美子 Notchシグナルは Tbx6 依存的
に *Mesp2* 発現を活性化する

第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

◎Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun
Kanno Mass Distributed Clustering : A
New Clustering Algorithm for Repeated
Measurements in Gene Expression Data
The 16th International Conference on
Genome Informatics(2005.12)

菅野純、中津則之、相崎健一、北嶋聡、五
十嵐勝秀「Percellome Project による発がん
関連 transcriptomics」- Diethylnitrosamine
等の Carcinogen の肝遺伝子発現解析 (B6
versus C3H の検討から) -

第3回日本癌学会カンファレンス(2006.3)

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima,
Yukio Kodama Percellome Project for
phenotype-independent toxicogenomics
CASCADE Annual Meeting(2006.3)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

主任研究報告書

トキシコゲノミクスに有用な吸入暴露システムの開発・改良と吸入暴露による
網羅的遺伝子発現解析

主任研究者 小川 幸男 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部室長

研究要旨

本研究は、気化性化学物質の吸入によるリスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスとして、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術の構築を通して、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気化性化学物質の安全性確保の為の、毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速且つ正確・精密な吸入毒性評価システムを作成することを目的として実施するものである。

具体的な目標として、少数のマウスの肺及び肝臓に於ける遺伝子発現の網羅的なプロファイル生成により室内空気汚染化学物質等の毒性評価を従来の吸入毒性試験に比して、迅速、正確且つ詳細に予測するシステムの開発を目指す。このシステムの開発により、1) 吸入毒性評価の効率化(実験期間及び解析時間の短縮)、2) 実験動物から人への外挿の正確さの向上、3) 毒性発現メカニズムに支えられた包括的な吸入毒性評価(急性毒性、慢性毒性、呼吸器限局性、及び全身性の影響などの統合を含む)、の面で飛躍的な進捗が望める。

殊に、シックハウス症候群に関しては原因物質としてホルムアルデヒド等の13物質に対して、室内濃度指針値が設定されている。しかし、従来の動物試験法での症候検出可能濃度とヒトに於いて実際に報告される症候発現濃度には隔たりがあることが指摘される。本研究では、室内空気汚染化学物質等の低濃度吸入暴露方法を確立するとともに、申請者らが先に開発した定量性に優れるトキシコゲノミクス手法をこれに適応し、肺及び肝臓での遺伝子発現量を解析することで、この隔たりを埋めることを検討する。

現在所有する暴露施設は、非極性のベンゼン等の低濃度吸入暴露が比較的容易に可能であるが、更にこのシステムに小変更を加え、極性のホルマリンを含む多くの異なった気化性化学物質にも対応が可能なものとし、急性吸入毒性に関わる極低濃度暴露システムとした上で、急性吸入暴露実験を実施する。このための化学物質の精密な気中への拡散法(発生方法)、希釈などによる吸入チャンバー内の化学物質の濃度コントロール(濃度の安定)、及び吸入チャンバー内の濃度をモニターするための各方法の開発・検討を行う。

ホルムアルデヒド急性吸入暴露実験に際して、バブリング法によって安定したガス濃度が得られることが判明した。その上で、動物をチャンバー内に収容した時に、被毛に吸着することで起こる濃度の低下や不均一性は、大量のガスを発生する大型チャンバー用発生機を使用し、サーキュレーターをチャンバー内に設置し強力に空気を攪拌することで解消した。これにより、一定濃度を安定的に保持し動物に吸入暴露することが可能となり、暴露した動物より得られた肺、肝臓について、網羅的遺伝子発現解析の結果、発現上昇が認められ、生体反応を捉えるのに有効であることが実証された。

A.研究目的

本試験は、気化性化学物質の吸入によるリスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスとして、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術の構築を通して、日常生活に於いて暴露される様々な気化性化学物質の安全性確保の為の、毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速且つ正確・精密な吸入毒性評価システムを作成することを目的として実施するものである。

殊に、シックハウス症候群に関しては原因物質としてホルムアルデヒド等の13物質に対して、室内濃度指針値が設定されている。しかし、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は隔たりがある。本研究では、室内空気汚染化学物質等の低濃度吸入暴露方法を確立するとともに、トキシコゲノミクス手法をこれに適応し、肺及び肝臓での遺伝子発現量を解析することで、この隔たりを埋めることを検討する。

現在、所有する暴露施設では非極性のベンゼン等の低濃度吸入暴露が比較的容易に可能となるが、更にこのシステムに小変更を加え、極性のホルマリンまで多くの異なった気化性化学物質にも対応が可能なものとする。室内汚染化学物質の濃度指針値を参考に、さらに理論的にも難しいとされている極低濃度暴露のための化学物質の精密な発生方法、希釈などによる吸入チャンバー内の化学物質の濃度コントロール、及び吸入チャンバー内の濃度をモニターするための各方法の開発・検討を行う。

B.研究方法

現在所有する暴露施設のシステムを改修、極性物質まで多くの異なった気化性化学物質にも対応が可能なものとし、急性吸入毒性に

関わる極低濃度暴露システムの開発・改良、急性吸入暴露実験を実施する。極低濃度暴露のための化学物質の精密な発生方法、希釈などによる吸入チャンバー内の化学物質の濃度コントロール、及び吸入チャンバー内の濃度をモニターするための各方法の開発・検討を行う。

室内汚染化学物質において最も知られている物質に、ホルムアルデヒドが挙げられる。最初に本物質による暴露試験を計画した。それぞれに発生装置を持つ横層流型の大型チャンバー(容積3m³, Photo 1)、縦層流大型チャンバー(容積600L, Photo 2)、及び縦層流小型チャンバー(容積30L, Photo 3)を保有している。本実験では、短期間少数匹動物の暴露計画であるため、縦層流小型チャンバーを使用し、暴露試験材料である化学物質の量を最小限にする。また急性吸入試験用の小型チャンバーは、高用量及び中用量が大きなアイソレーター内に設置され、暴露中・暴露後の動物の出し入れ時においても室内にガスが漏出しないう仕組みを備えている。ホルムアルデヒド蒸気発生を計画するに当たり、マウスへの暴露濃度を、室内汚染化学物質の室内濃度指針値である0.08ppmから、最高濃度を0.1ppmとし、公比10で0.01、0.001ppmと設定した。

ホルムアルデヒド発生法には、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してガス化する、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、などの方法がある。①では加熱し消耗した量に従い発生量が低下するため安定性に問題があり、また発生するガス濃度が高いため、低濃度までガスを希釈するシステムを作る必要があると考えられた。②は濃度の安定性や

低濃度を作り出すにはすぐれているが、定流量ポンプには精度の高い機器を必要とし、加熱空気作成、加熱チャンバー内噴霧等の設備が必要となるため、低濃度を安定的に得るには③のバブリング方式が設備的にも最適と考えた。

ホルムアルデヒドのバブリング式発生器内蒸気濃度は、その蒸気圧から試算すると250ppmと予想され、これを希釈して目標濃度である0.1ppmまで低下させるには、最大100倍希釈しかできない縦層流小型チャンバー単独では難しいと判断した(図1)。横層流型大型チャンバーの発生装置で発生したホルムアルデヒド蒸気を横層流型大型チャンバーで100倍まで希釈し、この廃棄管から小型チャンバーの発生装置へ配管導入しさらに希釈することで目標濃度が達成されると考えた(図1)。実際に、ホルムアルデヒド液(ワコー純薬、濃度37%溶液)を100倍に希釈して横層流型大型チャンバーの発生装置に投入し、発生させたホルムアルデヒド蒸気濃度は、検知管(No.91L,ガステック社)で測定すると20ppm程度であった。この測定結果から、縦層流小型チャンバー発生装置でホルムアルデヒド蒸気を発生させ希釈して、小型チャンバー内で目標濃度が得られることが判明した。

ホルムアルデヒド液を100倍に希釈して縦層流小型チャンバーの発生装置に投入し、検体を入れるタンクを暖める温浴の温度、発生したガスを冷やす冷却管の温度、タンクの液中へ空気を送りバブリングする(発生)流量、ガスを希釈する流量などそれぞれを調節することによりガス濃度調整を行い、高感度ホルムアルデヒドガスモニター(FP-250 FLW型、理研計器社、Photo 4)による測定で安定した濃度と、捕集管(GL-Pak mini AERO DNPH, GLサイエンス社、

Photo 5)による測定で設定濃度を達成した。高感度ホルムアルデヒドガスモニターは、発色性のテープに200ml/分の量でサンプル空気を30分間(低濃度モード)通し、ホルムアルデヒドガスによるテープの発色を比色測定する簡易測定器である。捕集管測定法は、一定流速で捕集管に空気を送り込み、これにホルムアルデヒドを吸着させ、溶媒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方法である。

所定濃度に達し、同一濃度を2時間維持した時点でマウスを小型チャンバーに入れ暴露を行った。マウスを投入した直後に、ガスモニター表示値は測定限界以下となった(図2)。マウス被毛へのガス吸着が、濃度低下を引き起こしたものと考えられた。マウスのホルムアルデヒドガス吸着能を確認するため、3ppmまで濃度を上げてマウスに暴露したが、直後にガスモニター濃度は測定限界以下となった(図3)。小型チャンバーの発生機での吸着量を上回るホルムアルデヒドガスの発生は、計算上不能と思われた。マウス被毛への吸着量が非常に多いため濃度制御が難しく、また飼育室内及び当所近隣の環境中のホルムアルデヒドガス濃度が約0.001ppmであることから、暴露濃度を1.0, 0.3, 0.1ppmに上げ、容積3m³の横槽流大型チャンバーと発生機を用いることとした。加熱浴槽温度、冷却温度、発生空気量、希釈空気量などそれぞれを調節することによりガス濃度調整を行い、高感度ホルムアルデヒドガスモニター(1.0ppmでは200ml/分の量でサンプル空気を1分間通す高濃度モードを使用した)による測定で安定した濃度が得られた。既設の架台にマウスを入れ暴露を行ったところ、サンプリングポートに近い場所へマウスを配置すると、ガスモニター表示値は測定限界以下となり、チャンバー内濃度の均一性が失われていることが

判明した(図4)。チャンバー内に入れる架台を製作し、これにサーキュレーター(Photo 6)とケージを載せ、サーキュレーターでチャンバー内部空気を強力に攪拌することで、濃度の不均一を解消した。サーキュレーターは、対照群を含む4チャンバー全てに設置した。高感度ホルムアルデヒドガスモニターと捕集管法による濃度は、本試験前にその値を比較し(図5)、この差及び小型チャンバーで比較測定した低濃度モードでの差を踏まえ、捕集管値に合わせた。すなわち高感度ホルムアルデヒドガスモニターによる表示値は1.0ppmでは下げ、0.3, 0.1ppmでは上げるよう濃度を調整した。暴露中の経時的な濃度安定性については高感度ホルムアルデヒドガスモニターを用い、最終的な暴露濃度は、室内濃度に関する指針値を策定した「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する捕集管法による値とした。

次の暴露試験はアセトアルデヒドを選択して行う予定にしている。アセトアルデヒドはホルムアルデヒドと同様の物理化学的性質を有しているものと思われ、ホルムアルデヒドの暴露試験がそのまま応用できるものと考えられる。アセトアルデヒド(MERCK99%)の希釈液を発生機タンク内に入れ発生機を運転し、タンク内濃度を測定したところ、0.1%まで希釈しても発生するガス濃度は100ppm以上(検知管、No.92M, ガステック社製)を示したため、横層流大型チャンバー用の発生機にボンベガスの接続が可能になるよう、改修工事を行っている。アセトアルデヒドは100ppmのボンベガス(高千穂商事)を購入し、これを流量計でコントロールしつつ送風空気で単純に希釈するため、タンク内で希釈液をバブリングさせるよりは、安定した濃度

が得られ、暴露時の濃度維持にも問題はないものと考えている。

(倫理面への配慮)

当所内の動物実験倫理委員会が定めた規定に則り、動物の飼育には適正な居住空間を確保、清潔なケージや器材を使用し、動物に苦痛を与えないため、採血及び屠殺処分に際しては麻酔を行うなど細心の注意を払っている。

C. 研究結果及び考察

発生方法については、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。ガスの希釈法では、100倍希釈液をバブリングすることで、小型チャンバーとその発生機のみで目標濃度を達成することが可能であった。しかし、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なため、横槽流大型チャンバーとその発生機を用いることとした。さらに、大型チャンバー内にサーキュレーターを設置し、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した。捕集管による濃度は、最高濃度の設定濃度1.0ppmに対して0.74ppmと26%低く、最低濃度0.1ppmでは0.175ppmと75%高いが、中間濃度0.3ppmは目的値を達成し、公比は約2であった(図6)。このときの高感度ホルムアルデヒドガスモニター値(平均値±標準偏差)は最高濃度で 0.789 ± 0.046 ppm、中間濃度 0.402 ± 0.027 ppm、最低濃度 0.197 ± 0.019 ppmであり、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。

得られた肺、肝臓について、網羅的遺伝子発現解析した中で、肝臓の第一相薬物代謝酵

素 Cytochrome P450 ファミリーに属する Cyp2c55 あるいはグルタチオン抱合体を生成する Gstm2, Gstm3, Gstm3 などの遺伝子発現の上昇が 24 時間目に認められた(図 7)。

D. 結論

ホルムアルデヒドはバブリング法によって安定したガス濃度が得られ、動物をチャンバー内に収容した時に被毛に吸着することで起こる濃度の低下や不均一は、大量のガスを発生する大型チャンバー用発生機を使用し、サーキュレーターをチャンバー内に設置し強力に空気を攪拌することで解消が可能であった。

最高濃度は0.74ppm、中間濃度は0.3ppm、最低濃度は0.175ppm、公比は約2で、一定濃度を安定的に保持でき、動物に暴露することができた。また、これらの濃度で暴露したマウスの肺及び肝臓において遺伝子発現の上昇が認められ、生体反応を捉えるのに有効であることが実証された。

本研究の取り扱い低用量域での吸入暴露は、国の内外を問わずこれまで行われたことがなく、シックハウス症候群の発症解明につながる貴重な実験結果が得られることにより、国民のみならずその健康保持を担う行政においても意義の大きいものと考えられる。

E.健康危険情報

なし

F.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松

島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of

Hydroxycitric acid in mice、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1 ~3 日、東京

G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

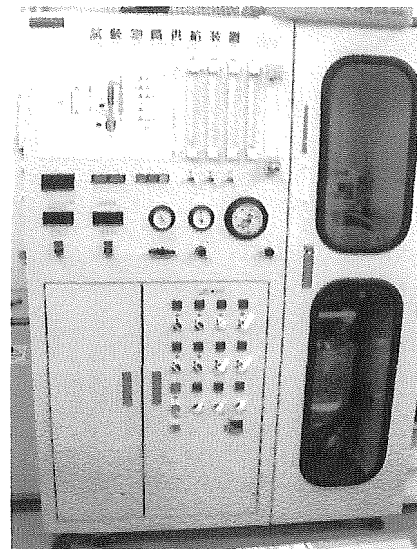
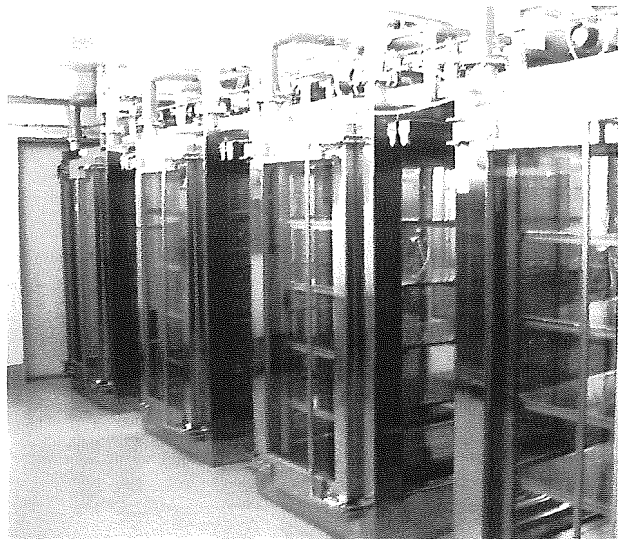


Photo 1 横層流大型チャンバー と その発生機

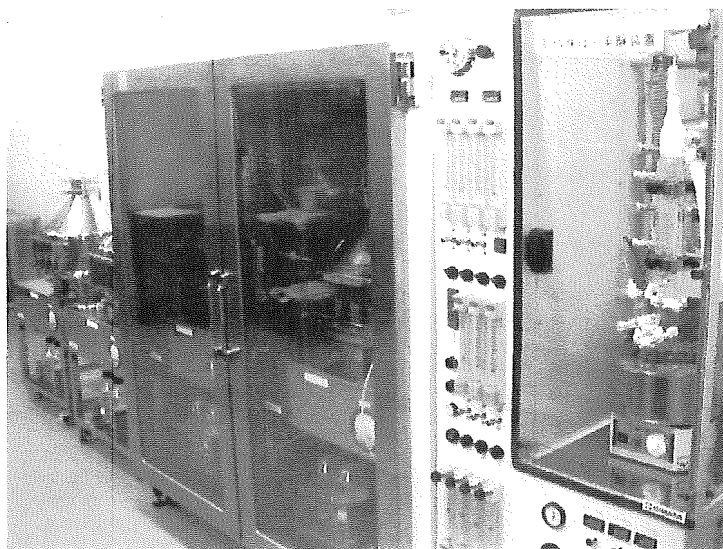
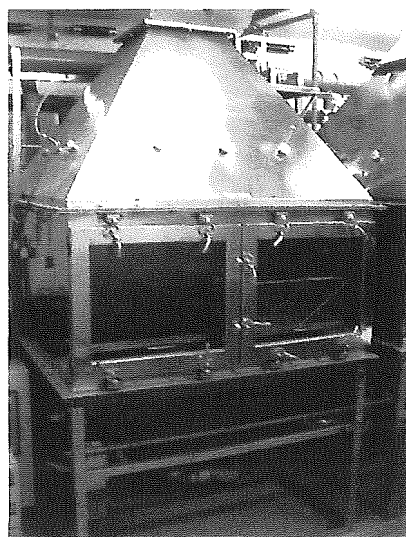


Photo 2 縦層流大型チャンバー Photo 3 縦層流小型チャンバーと発生機

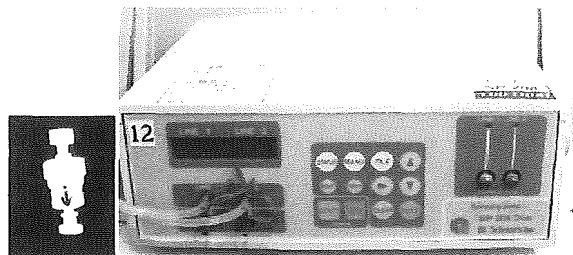


Photo 4 高感度ホルムアルデヒドガスモニター Photo 5 捕集管及び捕集管採気用ポンプ

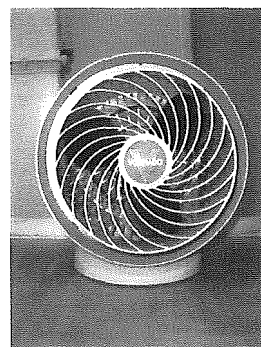
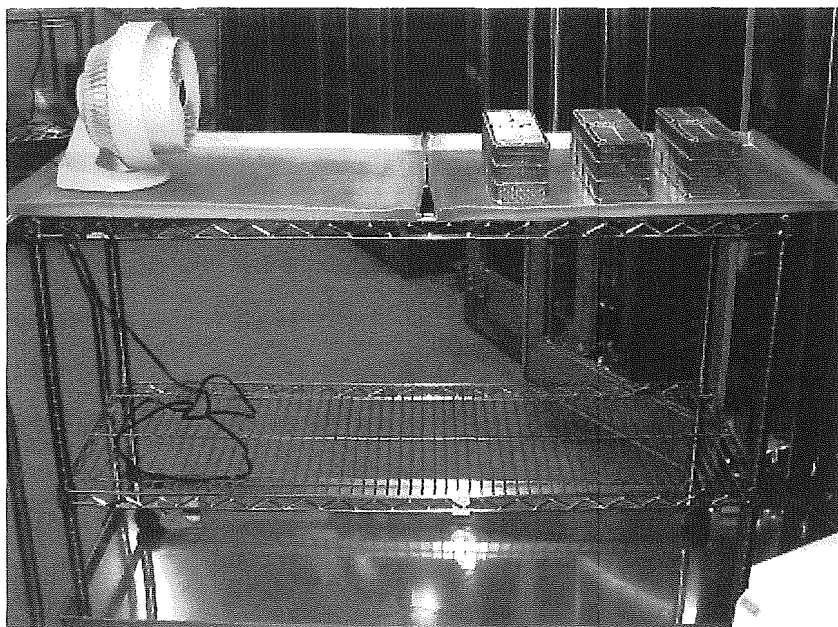


Photo 6 横層流チャンバー内へ入れるカート上に設置したケージとサーキュレーター

