

200941006A

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レベル低濃度暴露を考慮した吸入トキシコゲノミクスを

核とする評価体系の開発—

(H20-化学-一般-001)

平成 21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 幸男

平成 22(2010)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レベル低濃度暴露を考慮した吸入トキシコゲノミクスを

核とする評価体系の開発—

(H20-化学-一般-001)

平成 21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 幸男

平成 22(2010)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レベル低濃度暴露を考慮した吸入トキシコゲノミクスを  
核とする評価体系の開発—  
(H20-化学-一般-001)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 幸男

平成 22(2010)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レベル低濃度暴露を考慮した吸入トキシコゲノミクスを  
核とする評価体系の開発-

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

小川 幸男 ..... 121

2. 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

慶長 直人 ..... 137

3. 吸入暴露影響の網羅的遺伝子発現解析、経口暴露との対比による評価・優先順位  
付けの網羅性の向上

菅野 純 ..... 141

4. 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 ..... 149

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 165

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 167

# I . 総括研究報告書

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レベル低濃度暴露を考慮した吸入トキシコゲノミクスを核とする  
評価体系の開発-

研究代表者 小川 幸男

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

本研究は、化学物質リスク評価法の基盤整備として、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、定量的、且つ、高精度な吸入毒性評価システムを構築することを目的とする。特に、シックハウス症候群の様に、人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極低濃度吸入毒性への理論的及び現実的な対応を包含することを目指すものである。

先行3年間の研究（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-化学一般-003））に於いて、「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物質の内、ホルマリン、トルエンなど6種の気化性物質について同検討会・室内指針値付近の極低濃度に於ける暴露実験を実施し、肺及び肝の網羅的遺伝子発現変動解析によるデータの蓄積（一化合物につき、単回暴露、反復暴露など3プロトコール、各48匹、肺及び肝の2臓器、延べ6,300万遺伝子発現情報）及び、インフォマティクス解析により低濃度吸入毒性の特性を示唆する生物学的に興味深い所見が得られている。本研究では、先行研究の成果を踏まえ、上記13物質の内、暴露条件の設定が比較的難しい昇華性化学物質の極低濃度吸入暴露実験の実施と、肺を主体とした遺伝子発現変動解析、データベース構築を推進する。これに加えて新たに、ヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* 解析研究を実施し、人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。トキシコゲノミクスに有用な経気道暴露システムの開発・改良と吸入暴露（小川）、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）、経気道暴露影響の網羅的遺伝子発現解析、経口暴露との対比による評価・優先順位付けの網羅性の向上（菅野）、人への外挿にかかわる基礎的及び臨床的解析、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）。

今年度小川は、有機リン系殺虫剤である昇華性化学物質クロルピリフォスの極低濃度暴露（指針値0.07ppbを暴露目標値とした）に対応した、加熱・バブリングにより気化させる方法による発生装置（全発生器の温浴温度を60℃）を用い、捕集管による実測により目的とする極低濃度の暴露濃度0.07ppbを得た。またクロルピリフォス極低濃度

吸入暴露実験を実施し、具体的には、クロルピリフォス（指針値 0.07ppb、暴露目標値 0.07、0.21、0.70 ppb）（4 用量、16 群構成、各群 3 匹）について、2 時間単回暴露（2、4、8、24 時間後）、6 時間/日×7 日間暴露（6、22、70、166 時間後）と 22 時間/日×7 日間暴露（22、70、166、190 時間後）をおこない、マウス肺および肝の mRNA サンプルを取得した。長野は、クロルピリフォスを対象として室内濃度指針値（0.07 ppb）を考慮した濃度でマウスに全身暴露する方法の開発を試み、加熱後、微細な気泡でバブリングすることにより気化させる方法を用いて、0.07、0.21 および 0.7ppb の目標暴露濃度でクロルピリフォスを吸入暴露する方法を開発した。菅野は、国立医薬品食品衛生研究所毒性部において開発された定量性に優れたトキシコゲノミクス手法(Percellome 法)を適用し、クロルピリフォスにつき経気道暴露したマウス肺、肝サンプルの網羅的遺伝子発現データを解析した。その結果、6 時間暴露よりも 22 時間暴露時の方が発現変動を示す遺伝子数が少ないことが明らかとなったが、解析を進めた結果、この理由として、クロルピリフォスに対する防御機構が発動する可能性が考えられ、この機構に関与する候補遺伝子を見いだした。今後、発現遺伝子の組織内局在を明らかにするために *in situ* hybridization を実施する予定である。また、解析の精度と再現性の向上のために、マイクロアレイデータ解析技術開発委託研究を実施した。慶長は、ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の系を用いて、よりシックハウス症候群の病態に近づけるべく、ホルムアルデヒド暴露下に、外来微生物由来の刺激である Poly I:C を添加した際の炎症増強効果を IL-8 mRNA 量など、その際のシグナル伝達系への影響も含め検討した結果、相乗効果が認められた。このことはこの実験系の有用性を示唆するだけでなく、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いる。

このように、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、網羅的遺伝子発現解析手法により昇華性化学物質の低濃度経気道暴露によって生じる生体反応変化を予測することが可能であることが示唆された。すなわち、網羅的遺伝子発現解析手法は、ヒトに於ける症候発現濃度を動物に暴露した場合にも有効な生理反応検出手法として活用できることが示された。これにより、これまで指摘されてきた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隔たりがあるという課題を、遺伝子発現解析手法が克服しうることが示された。加えて、ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の実験系での解析の実用性が示されたことから、より人への外挿性の向上を計ることが可能となった。今後も、本研究の手法を基にした昇華性物質につき極低用量経気道暴露による高精度な毒性評価手法の開発を推し進めていくことが重要であると考える。

研究分担者	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所
小川 幸男	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 部長
	毒性部 室長	
	長野 嘉介	中央労働災害防止協会
慶長 直人	国立国際医療センター研究所	日本バイオアッセイ研究センター 副所長
	呼吸器疾患研究部 部長	

## A. 研究目的

本研究は、化学物質リスク評価法の基盤整備として、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化学物質の安全性確保の為に毒性発現メカニズムに基づいた、より迅速、定量的、且つ、高精度な吸入毒性評価システムを構築することを目的とする。特に、シックハウス症候群の様に、人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極低濃度吸入毒性への理論的及び現実的な対応を包含することを目指すものである。

先行3年間の研究（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-化学一般-003））に於いて、「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物質の内、ホルマリン、トルエンなど6種の気化性物質について同検討会・室内指針値付近の極低濃度に於ける暴露実験を実施し、肺及び肝の網羅的遺伝子発現変動解析によるデータの蓄積（一化合物につき、単回暴露、反復暴露など3プロトコル、各48匹、肺及び肝の2臓器、延べ6,300万遺伝子発現情報）及び、インフォマティクス解析により低濃度吸入毒性の特性を示唆する生物学的に興味深い所見が得られている。

本研究では、先行研究の成果を踏まえ、上記13物質の内、暴露条件の設定が比較的難しい昇華性化学物質の極低濃度吸入暴露実験の実施と肺を主体とした遺伝子発現変動解析、データベース構築を推進する。これに加えて新たに、ヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* 解析研究を実施し人への外挿性の向上を計る。本研究を通して、シックハウス症候群レベルの低濃度を考慮した吸入毒性作用の評価が毒性発現の網羅的な分

子メカニズム解析に基づきシステム化され、より迅速化、定量化、高精度化されることが期待される。更に、当毒性部が用意する肝や脳に関するトキシコゲノミクスデータとの対比により、呼吸器影響のみならず、血液を介した全身影響、或いは嗅覚等を介した神経影響等の包括的評価が可能となると期待される。これにより、ホルムアルデヒド等の既存物質によるシックハウス症候群の本態解明と、新規物質への予測体系の整備が進むことが期待される。即ち、これまでに捕捉不能であったところの、明瞭な器質的変質を伴わない低濃度暴露による毒性を、遺伝子発現解析を通じて検出することが可能となれば、シックハウス症候群、化学物質過敏症などの対応の格段の改善など、高感受性集団を含む国民全体に対する化学物質の吸入に対する安全性確保の向上が期待される。

## B. 研究方法

先行3年間で確立した液性化学物質の極低濃度吸入暴露条件に加え、本研究では、厚生労働省シックハウス問題に関する検討会が掲げる13物質のうちの昇華性化学物質を主対象に、極低濃度吸入暴露の条件設定を行い、マウス肺を主標的、肝をその対照臓器として、網羅的遺伝子発現プロファイルを取得しデータベース化する。独自開発になる教師無しクラスターと既知機能クラスターを基にしたインフォマティクス解析により予測システム機能の精度を継続的に向上させて行く（大量データのインフォマティクスはNTTデータとの共同委託研究を実施する）。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。

平成21年度は、有機リン系殺虫剤である



昇華性化学物質クロルピリフォスを対象とし、室内濃度指針値（0.07 ppb）を考慮した濃度でマウスに吸入暴露し検討した。

#### (B-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

今年度は、有機リン系殺虫剤である昇華性化学物質クロルピリフォスの極低濃度暴露システムの改良と、マウスへの経気道暴露及び網羅的遺伝子発現解析を行うための肺及び肝を採取した。

クロルピリフォス（分子量：350.6、Cas No.：2921-88-2）の蒸気圧は0.0024 Pa（20℃）である。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が0.07 ppbであることから、これを低濃度とし、公比 $\sqrt{10}$ で0.2、0.7 ppmを中高用量の目標値とした。ガス発生方法は、加熱・バブリングする方法（全発生器の温浴温度を60℃）を採用した。濃度検知は、捕集管（昭和電工、Autoprep PS@Gas）を用いる方法で測定した。

昇華性化学物質クロルピリフォス（指針値：0.07 ppb、暴露目標値：0.07、0.21、0.70 ppb）について、雄性C57BL/6Jマウス（12週齢、日本チャールス・リバー）に極低用量経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）を行い、各物質につき、2時間単回暴露（2、4、8、24時間後）、6時間/日×7日間暴露（6、22、70、166時間後）と22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）を実施し、マウス肺及び肝のmRNAサンプルを取得した。クロルピリフォスは、Tronto Reseach Chemicals社（株）製の純度98%（ガスクロ用標準品）を使用した。なおクロルピリフォスは、直接昇華させる方法では、目標濃度を得ることができなかった。

#### (B-2) 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

今年度は、クロルピリフォスを対象として、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行った。

クロルピリフォスは融点が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フォス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。なお、クロルピリフォスは160℃以上で分解することから、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。濃度検知は、捕集管（XAD-2 OVS Tube, SKC, Inc）を用いて測定した。

#### (B-3) 吸入暴露影響の網羅的遺伝子発現解析、経口暴露との対比による評価・優先順位付けの網羅性の向上

今年度は、昇華性化学物質クロルピリフォスにつきデータ解析を検討した。雄性C57BL/6Jマウスに経気道的に、2時間単回暴露（2、4、8、24時間後）、6時間/日×7日間暴露（6、22、70、166時間後）と22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）（4用量、16群構成、各群3匹）を検討し、得られたマウス肺及び肝の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。暴露目標値は、クロルピリフォスは指針値0.07 ppbに対し、0.07、0.21、0.70 ppbである。DNAマイクロアレイはAffymetrix社のGeneChip（Mouse Genome

430 2.0) を用いた。遺伝子発現変動を、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトウェアは、各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意と考えられる順に並び替えるものである。また、シグナルパスウェイの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて検討した。

#### (B-4) 人への外挿にかかわる基礎的及び臨床的解析、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

今年度は、化学物質の慢性的な吸入曝露の状況下で、外界の吸入粉塵や微生物の刺激を受けて生じる応答が修飾される場合を想定して、種々の条件検討を行った。

「刺激物質」は、前年度の検討から、外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、作用機作がよく検討されており、構造の単純な、Poly I:Cを選択した。「細胞」は、ヒト気道上皮細胞株BEAS2Bを用い、培養及び予備実験を行った。「培養及び刺激」は、細胞株を25cm<sup>2</sup>フラスコで培養し(5×10<sup>5</sup> cells/flask)、90% confluentでホルムアルデヒド(1, 10 µM)を添加3-24時間後、Poly I:C (1, 10 µg/ml)の刺激を加え、さらに12時間後に細胞を回収、RNAを抽出し、定量的RT/PCRを実施した。

前年度の検討から、炎症マーカーとなる発現遺伝子として、IL-8を選択した。また、タンパク発現については、ELISA系(Multi-Analyte ELISArray Kit : SABiosciences)により、培養上清中の12

種類のサイトカイン(IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1a, MIP-1b, IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin, TARK, MDC, GROa)を同時測定した。

#### C. 研究結果

##### (C-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

今年度は、クロルピリフォスの極低濃度暴露システムの改良と経気道暴露実験を行った。

昇華性化学物質クロルピリフォスについて、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が0.07 ppbであることから、これを低濃度とし、公比√10で0.21、0.70 ppbを中高用量の目標値とした。ガス発生方法は、先ずの蒸気圧の低い昇華性の化合物に応用可能な多段式の発生器を新たに設計、製作した。昇華性化学物質について、送気に対し表面積を大きく、温度を上げることによりガス圧も上昇する。この方法で設計し、蒸気圧が小さい物質であっても、暴露濃度がppbオーダーの低濃度であれば、目標濃度での動物に対する暴露が可能になると思われた。しかしながら、この方法では目標濃度を得ることができず、改めて温浴により溶解させ、バブリングによりガスを発生させる装置を製作し、これによりガスを発生させ、それを希釈することで、低用量群では0.051ppbと27%ほど低く、中用量群では0.240ppbと20%ほど高いが、高用量群では0.710ppbと目標濃度を達成し、ほぼ目的とした用量段階をもって動物に暴露することができた。

対照群チャンバー内濃度及び室内濃度

は、定量下限値の0.006 ppb (0.09  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) 以下であったことから、環境からの影響はないことが確認された。

このような発生器、発生方法を用いて、昇華性化学物質クロルピリフォス（指針値0.07 ppb、暴露目標値0.07、0.21、0.70 ppb）の経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）を2時間単回暴露（2、4、8、24時間後）、6時間/日×7日間暴露（6、22、70、166時間後）と22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）について実施し、マウス肺及び肝のmRNAサンプルを取得した。

#### (C-2) 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

昇華性化学物質クロルピリフォスは融点が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フォス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。なお、クロルピリフォスは160℃以上で分解するため、加熱温度は50℃の条件を選択した。具体的な工夫として、発生容器内でクロルピリフォ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フォスの再凝集は認められず、この発生容器がクロルピリフォス蒸気の発生に利用できることを確認した。また、発生したクロルピリフォ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℃の温水で加熱する装置を設けた。その結果、配管内での再凝固も認められなかった。

微量のクロルピリフォ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された。このような工夫と加熱・バブリングする方法により0.07、0.21および0.7 ppbの目標暴露濃度で吸入暴露する方法を開発することが出来た。

指針値が0.07 ppbであるため、目標吸入暴露濃度0.07、0.21及び0.7 ppbについて、6時間/日、7日間及び、22時間/日、7日間のクロルピリフォ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0.070±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。従って、

すべてを通して、目標濃度との差は各濃度とも20%以内とすることが出来た。

### (C-3) 吸入暴露影響の網羅的遺伝子発現解析、経口暴露との対比による評価・優先順位付けの網羅性の向上

今年度は、クロルピリフォス（指針値：0.07 ppb、暴露目標値：0.07、0.21、0.70 ppb）につきデータ解析を検討した。12週齢の雄性 C57BL/6J マウスに経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）させ、2時間単回暴露（2、4、8、24時間後）、6時間/日×7日間暴露（6、22、70、166時間後）と22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）を検討し、得られたマウス肺及び肝 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。

解析の結果、0.07 ppb という極低濃度暴露によっても、肺及び肝、双方に於いてシグナル伝達に関わる多くの遺伝子発現変動が認められ、また肺と肝では遺伝子発現プロファイルが異なること、肺、肝共に発現変動を示す遺伝子数が6時間暴露よりも22時間暴露時の方が少ないことなどが明らかとなった。解析を進めた結果、この理由として、クロルピリフォスに対する防御機構が発動する可能性が考えられ、この機構に関与する候補遺伝子 *Cyr61* を見いだした。

また、解析の精度と再現性の向上のために、マイクロアレイデータ解析技術開発研究（マイクロアレイの測定値をプローブ毎に補正し、より高精度の定量測定を行うための技術開発）を委託し、従来、除去不能であったクロスハイブリダイゼーションによる系統誤差を補正する諸技術の開発・改良を実施した。

以下に具体的に、2時間単回暴露、6時間/日×7日間暴露と22時間/日×7日間暴露、それぞれについて、肺と肝に於ける解析結果を示す。

C-3-1A: クロルピリフォス [2時間単回暴露]の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析：

サンプリングは終了しており、今後、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

C-3-1B: クロルピリフォス [2時間単回暴露]の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析：

サンプリングは終了しており、今後、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

C-3-2A: クロルピリフォス [6時間/日×7日間暴露]の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして235 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして60 psが見いだされた。Ingenuity Pathways Analysis (IPA)による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかったが、炎症に関与すると考えられる、*Cxcr4*(22時間後、高用量；70時間後、中・高用量)および *IL1β* (70時間後、中・高用量；166時間後、高用量)遺伝子の有意な発現増加が認められた。したがって、肺において炎症に関係するシグナルが活性化されている可能性が示唆された。

C-3-2B: クロルピリフォス [6時間/日×7日間暴露]の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして661 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆され

たものとして 307 ps が見いだされた。

IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかったが、酸化ストレスに関与すると考えられる Srxn1 (22・70 時間後、高用量)、Prdx (22 時間後、高用量) 遺伝子の有意な発現増加が認められた。したがって、肝において酸化ストレスが誘発されている可能性が示唆された。

C-3-3A: クロルピリフォス [22 時間/日 × 7 日間暴露] の「肺」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 45 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 20 ps が見いだされた。したがって、[6 時間/日 × 7 日間暴露] の肺の場合と比較し、増加 ps 数が約 1/3 だけ少ないこととなる。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。また、生物学的な発現変動が示唆されたほとんどの遺伝子の発現増加は顕著ではなかったが、Cyr61 遺伝子のみ顕著な発現変動が認められた (22 時間後、低・中・高用量; 70 時間後、中・高用量; 166 時間後、低・中用量)。この遺伝子は、[6 時間/日 × 7 日間暴露] の「肝」においても発現増加が認められている。

C-3-3B: クロルピリフォス [22 時間/日 × 7 日間暴露] の「肝」に於ける網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が、有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 604 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 134 ps が見いだされた。したがって、[6 時間/日 × 7 日間暴露] の肝の場合と比較し、生物学的な変化が示唆された増加 ps 数は、約 1/2 だけ少ないこととな

る。IPA による検討の結果、シグナルネットワークとして、Mitochondrial dysfunction、Oxidative phosphorylation が抽出されてきた。これに関与するシグナル分子は、Ndufb2 (22 時間後、高用量)、Cox6c (22 時間後、低・高用量; 70 時間後、低用量; 166 時間後、低・中・高用量) などであった。したがって、ミトコンドリア電子伝達系が活性化されている可能性が示唆された。過度の活性化は酸化ストレスを誘発する可能性が示唆されるが、酸化ストレスに係る遺伝子の顕著な発現変動が認められなかった。

#### (C-4) 人への外挿にかかわる基礎的及び臨床的解析、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

昨年度は、Poly I:C (10 µg/ml) 存在下、24 時間後にホルムアルデヒド (1, 10, 100 µM) を添加、3 時間後に細胞を回収、IL-8 の RT/PCR を実施し、ホルムアルデヒドの濃度依存性を検討したところ、ホルムアルデヒド 10 µM 以上で、再現性よく、IL-8 mRNA の発現亢進が観察された。

今年度は、ホルムアルデヒド (1, 10 µM) 添加 3 時間後に、ホルムアルデヒド曝露を継続し、その結果、Poly I:C (10 µg/ml) の存在下、12 時間後の IL-8 mRNA 発現亢進が認められた。しかしながら poly I:C 適用後にホルムアルデヒドを適用した結果と比べると、再現性が必ずしも良好でなかった。また、それ以外のサイトカイン、ケモカインについては、必ずしも傾向が一定しなかった。

予備実験として、IL-8 の遺伝子発現へ至細胞内シグナル伝達分子への影響を検討する目的で、p38MAPK, ERK1/2, JNK のリン酸化を 0, 15, 30, 60, 120 分まで観察した

結果、poly I:C 刺激による各タンパクリン酸化の誘導を確認することができた。

#### D. 考察

##### (D-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

昇華性化学物質クロルピリフォスにつき、温浴により溶解させた後に、バブリングによりガスを発生させる装置を製作し、この方法によりガスを発生させ希釈することで、ppb オーダーという極低濃度の目標濃度にて実験動物に暴露することができた。

クロルピリフォスは昇華による方法で目標濃度を得ることができなかったが、この原因として、飽和蒸気圧に達する時間が、かなり長時間になるためと考えられた。来年度検討予定の、室内汚染化学物質として指針値が示されているダイアジノン等の化学物質のガス化は更に困難と思われ、これらの性状を精査検討した上で発生方法を試みる必要があり、シックハウス症候群の原因といわれる全ての物質についての実験が行える体制を整えるべく継続して発生法の検討を続けている。

##### (D-2) 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

クロルピリフォスの発生装置については、クロルピリフォスの特性、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フォスに空気でバブリングし、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した結果、今回の目標暴露濃度の最高濃度である 0.7 ppb 以上の

濃度でクロルピリフォスを暴露できることが確認できた。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、微量のクロルピリフォ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、従来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、微量のクロルピリフォ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フォ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フォ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。

##### (D-3) 吸入暴露影響の網羅的遺伝子発現解析、経口暴露との対比による評価・優先順位付けの網羅性の向上

今年度は、昇華性化学物質クロルピリフォスにつきデータ解析を検討した。雄性 C57BL/6J マウスに経気道的に、2 時間単回暴露（2、4、8、24 時間後）、6 時間/

日×7日間暴露(6、22、70、166時間後)と22時間/日×7日間暴露(22、70、166、190時間後)(4用量、16群構成、各群3匹)を検討し、得られたマウス肺及び肝の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。2時間単回暴露については、サンプリングは終了しており、近々解析する予定である。ここまでの解析の結果、クロルピリフォスの0.07ppb以上という極低濃度暴露によって、肺及び肝、双方に於いてシグナル伝達に関わる多くの遺伝子発現変動が認められ、有害性を示唆するシグナルとして、[6時間/日×7日間暴露]の「肺」では「炎症に関係するシグナル」が、「肝」では「酸化ストレス」が誘発されている可能性が示唆されたが、[22時間/日×7日間暴露]の「肺」および「肝」ではそれを見いだすことが出来なかった。

[22時間/日×7日間暴露]においては、肺、肝共に発現変動を示す遺伝子数が6時間暴露よりも少なかった。解析を進めた結果、この理由として、クロルピリフォスに対する防御機構が発動する可能性が考えられ、この機構に関与する候補遺伝子としてCyr61を見いだした。このことは、当該分子が変異或いは欠損することなどにより機能不全を来した場合、呼吸毒性が経時的に増悪する可能性を示唆しており、健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。Cyr61遺伝子欠失マウスのホモ型は、胎盤における血管形成障害により胎生致死を示すため、肺におけるCyr61遺伝子の機能解析のために、肺特異的Cyr61欠失マウスの作製・解析が有用であると考えられる。

#### (D-4) 人への外挿にかかわる基礎的及び臨床的解析、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

昨年度、ホルムアルデヒドのヒト気道上皮細胞への影響を株化細胞であるBEAS2B株により検討し、poly I:Cの低濃度刺激後に、ホルムアルデヒドの曝露があると、IL-8 mRNA発現が誘導されることを確認した。今年度は逆に、ホルムアルデヒド曝露中に、poly I:C刺激を与えることにより、poly I:C単独に比べて、炎症応答が増強されるか否かについて検討した。その結果、実験を繰り返したにも関わらず、ばらつきのある結果が得られた。この理由として、ホルムアルデヒドによる炎症応答増強効果が、細胞障害による非特異的抑制効果の影響を受けたことが考えられた。今後は、poly I:C適用の、ホルムアルデヒドによるサイトカイン産生への相乗効果の分子機序を解明すべく、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

国立国際医療センター研究所では、呼吸器外科との共同研究により、連結不可能匿名化された、ヒト初代継代気管支上皮細胞の凍結保存品を200サンプル以上保有しており、最適な系が確立したら、株化細胞のみならず、これらの正常細胞でも同様の現象が見られるか否かを検討する予定である。

#### E. 結論

本研究の遂行によって期待される成果は、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にある。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、将来的に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はもとより、科学物質過敏症などの対応についても格段の改善が予想される。

今年度、昇華性化学物質クロルピリフォスにつき、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、その経気道暴露影響に関わる可能性のある遺伝子発現変化を捉えることが出来たことは、遺伝子発現解析法の検出感度が、低濃度吸入暴露影響を解析するために十分であることを実証するものであり、ヒトに於ける症候発現濃度を動物に暴露した場合にも有効な生理反応検出手法として活用できることが示された。加えて、クロルピリフォスに対する防御機構に関与する候補遺伝子を見いだした事は、当該分子が変異、欠損あるいは発現が異常低下することなどにより機能不全を来した場合、呼吸毒性が経時的に増悪する可能性を示唆しており、健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。また、ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の実験系での解析の実用性が明らかとなったことから、より人への外挿性の向上を計ることが可能となった。今後も、昇華性物質を含め極低用量経気道暴露による高精度な毒性評価手法の開発を推し進めていくことが重要であると考え。平成 22 年度も引き続き、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、ダイアジノン、フェノブカルブについて同様な検討を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍等

なし

###### 2) 雑誌

Kawasaki, Y., Hirabayashi, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kodama, Y., Matsushima, Y., Ogawa, Y., Saitoh, M., Uchida, O., Umemura, T., Yoon, B., Inoue, T.  
Benzen-Induced Hematopoietic Neoplasms Including Myeloid Leukemia in Trp53-Deficient C57BL/6 and C3H/He Mice. *Toxicol. Science* 110(2): 293-306, 2009.

Hang NTL, Ishizuka N, Keicho N, Hong LT, Tam DB, Thu VTX, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Sakurada S, Lien LT.  
Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting. *BMC Infect Dis* 9: 66, 2009.

Keicho N, Itoyama S, Kashiwase et al.  
Association of HLA-class II alleles with SARS in the Vietnamese population. *Hum Immunol* 70: 527-531, 2009.

Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey B, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC.  
Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibodies and Myeloid Cell Immune Functions in Healthy Individuals. *Blood* 113 (11): 2547-56, 2009.



Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. J Infect Dis 199 (11): 1707-1715, 2009.

Lien LT, Hang NTL, Kobayashi N, Yanai H, Toyota E, Sakurada S, Thuong PH, Cuong VC, Nanri A, Mizoue T, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Tuan LA, Keicho N. Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam. PLoS One 4 (8): e6798, 2009.

Kanno J., Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects". J Toxicol Sci 34 Suppl 2: SP199-200, 2009.

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J., Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. J Toxicol Sci 34 Suppl 2:SP279-86, 2009.

Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. Environmetrics 20:1-13, 2009.

Kano, H., Umeda, Y., Kasai, T., Sasaki, T., Matsumoto, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S. Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years. Food and Chemical Toxicology 47: 2776-2784, 2009.

Take, M., Ohnishi, M., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure. The Journal of Toxicological Science 34: 221-226, 2009.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kano, H., Umeda, Y., Matsumoto, M., Asakura, M., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S. Oral carcinogenicity and toxicity of 2-amino-4-chlorophenol in rats. Journal of Occupational Health 51: 249-260, 2009.

Ohbayashi, H., Umeda, Y., Senoh, H., Kasai, Kano, H., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats, J Toxicol. Sci. 34: 53-63, 2009.

## 2. 学会発表

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

菅野 純、RISK MANAGEMENT FOR FOOD SAFETY AND INTRODUCTION TO THE SCIENCE AND TECHNOLOGY、Risk Management Seminar 2009、2009 年 3 月

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝秀、種村健太郎、小川幸男、関田清司、肝障害性薬剤による初期遺伝子発現応答の Percellome 解析、薬学会第 129 年会、2009 年 3 月

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、小縣昭夫、北嶋聡、多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月

菅野 純、相崎健一、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

広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、菅野 純、ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、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 (NanOEh2009),

2009. 8. 28, Helsinki, Finland

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio Ogata, Norio Ohashi, and Satoshi Kitajima, Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX V), 2009. 9. 12, Taipei

菅野 純、ナノマテリアルの毒性-発がん性を中心に、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月

山崎一法、加納浩和、梅田ゆみ、松本道治、妹尾英樹、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：2-アミノ-4-クロロフェノールのラット及びマウスへの経口投与による発がん性と慢性毒性、第 82 回日本産業衛生学会、2009 年

浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の培養細胞を用いる細胞毒性および変異原性、第 82 回日本産業衛生学会、2009 年

相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の単回気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響：I. 病理学的検索、第 82 回日本産業衛生学会、2009 年  
芹田富美雄、鷹屋光俊、久保田久代、甲田茂樹、相磯成敏、山崎一法、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチ

ューブ (MWCNT) の単回気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響：II. 気管注入時の投与物質及び肺内 MWCNT の SEM 観察、第 82 回日本産業衛生学会、2009 年

妹尾英樹、梅田ゆみ、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：N,N-Dimethylformamide の吸入曝露と飲水投与における肝臓病変の比較、第 25 回日本毒性病理学会、2009 年

梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：F344 ラットの大腿部に認められた滑膜肉腫の 1 例、第 25 回日本毒性病理学会、2009 年

相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、高信健司、長野嘉介、福島昭治：複層カーボンナノチューブの単回気管内投与によるラットの肺毒性、第 26 回日本毒性病理学会 2010 年

高信健司、妹尾英樹、梅田ゆみ、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：F344 ラットにみられた悪性エナメル上皮腫の 1 例、第 26 回日本毒性病理学会、2010 年

## H. 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

## 委託研究報告書

I) クロルピリフォス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) (平成21年度)

II) クロルピリフォスのマウスを用いた極低濃度暴露試験報告書  
(22時間/日、7日間暴露) (平成21年度)