

201035001A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 幸男

平成 23(2011)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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 幸男

平成 23(2011)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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 幸男

平成 23(2011)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 17

2. 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 直人 111

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 117

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 137

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 151

IV. 研究成果の刊行物・別刷 155

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に伴って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や難揮発性の化学物質を主とした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）である。

今年度（平成22年度）小川は、カーバメート系殺虫剤フェノブカルブについて、加熱・バブリングし気化させる方法により（全発生器の温浴温度を70～80℃）、目的とす

る暴露濃度を得、2時間単回暴露(2、4、8、24時間後)下での極低濃度吸入暴露実験を実施した(指針値3.8ppb、暴露目標値3.8、12.0及び38.0ppb)。今まで70-80℃という高温条件下でのガス発生の経験がなかったため、気化成分の分析をおこなったところ2種の分解物が認められ、そのひとつは2-(1-Methylpropyl)-phenolであった。しかしながらこの分解物は常温(25℃)で発生させても生じていることが確認されたことから、実際の生活環境中の暴露においても、この分解物が存在すると考えられた事から、この条件にてフェノブカルブ(主成分)の目標濃度を得ることとした。加えて、有機リン系殺虫剤ダイアジノンについて、これまでの研究の中で最も低い濃度を目標値(指針値0.02ppb、暴露目標値0.02、0.07及び0.20ppb)として極低濃度吸入暴露実験を実施した。具体的には、ダイアジノン(4用量、16群構成、各群3匹)について、6時間/日×7日間暴露(6、22、70、166時間後)(=労働暴露モデル)及び22時間/日×7日間暴露(22、70、166、190時間後)(=生活暴露モデル)をおこない、マウス肺及び肝のmRNAサンプルを取得した。また、解析の精度と再現性の向上のために、(株)NTTデータとのマイクロアレイデータ解析技術開発に関する共同委託研究を実施した。長野は、ダイアジノンを対象として室内濃度指針値(0.02ppb)を考慮した低い濃度でマウスに全身暴露する方法の開発を試みた。これまでの加熱後バブリングする手法ではなく、低温(10℃)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、目標暴露濃度で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、フェノブカルブ及びダイアジノン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。その結果フェノブカルブ2時間単回暴露時、肺では顕著な発現変動を示す遺伝子は認められなかったが、肝では酸化的ストレス関連遺伝子の発現増加が認められ、酸化的ストレスが誘発されている事が示唆された。ダイアジノン暴露の場合は、6時間暴露時では肺及び肝共に、炎症に関わる遺伝子の発現増加が認められたが、22時間暴露時では、この関連遺伝子の発現増加は顕著に認められない事を見いだした。また、昨年度の研究で見いだした吸入暴露影響の軽減に関与する候補分子Cyr61遺伝子の発現が、ダイアジノン暴露時でも、6時間よりも22時間暴露時の方が持続的に、また有意に増加することを見いだした。このCyr61遺伝子の発現増加が22時間×7日間暴露時に強く誘導される現象は、先行研究ならびに本研究にて検討した物質の内、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカン、パラジクロロベンゼン、クロルピリフォス及びダイアジノンにて観察されたが、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの場合は認められないことを見いだした。Cyr61が機能不全を来す状況においては、肺の毒性症状が経時的に増悪する可能性が考えられ、このことは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、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにするために、セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)及び(株)ベリタスとのin situ hybridization解析の技術開発に関して共同研究を実施した。慶長は、ヒト気道上皮細胞株BEAS2B細胞を

用いる *in vitro* 実験系を用いて、ヒトにおけるシックハウス症候群の病態に近づけるべく、polyI:C(ウイルス感染モデル物質)をあらかじめ適用し、その後にホルムアルデヒドを適用した際の、サイトカイン産生の変動につき定量的 RT-PCR により検討した。その結果、polyI:C 存在下で、ホルムアルデヒド (1-100 μ M) 適用により、IL-8 等のサイトカインの mRNA の濃度依存的な発現亢進、増強効果が再現性よく (3 回) 認められたという成果が得られた。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。IL-8 遺伝子発現に関わると報告されている ERK, p38, JNK のリン酸化のうち、ホルムアルデヒドは、JNK のリン酸化を亢進して、遺伝子発現増強に寄与する可能性が強く示唆された。他方、先にホルムアルデヒドを適用し、その後に polyI:C を適用する条件下では、再現性のよい相乗効果が認められなかった。

このように、シックハウス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又は難揮発性の化学物質の極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体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。本研究により、極低濃度吸入暴露影響の評価が、網羅的な分子メカニズム解析に基づき、より高精度化されることが期待され、シックハウス症候群などの対応への格段の改善など、高感受性集団を含む国民全体における化学物質の吸入毒性に対する安全性確保の向上が期待される。

研究分担者

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	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。
慶長 直人	国立国際医療研究センター 研究所 呼吸器疾患研究部 部長	
菅野 純	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 部長	
長野 嘉介	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 副所長	

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を中心とした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。独自開発によ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るために、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・改良を実施する。また、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにするために、セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)及び(株)ベリタスとの *in situ hybridization* 解析の技術開発に関する共同研究を実施する。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22年度は、有機リン系殺虫剤ダイア

ジノンならびに、カーバメート系殺虫剤フェノブカルブを対象とし、室内濃度指針値（それぞれ 0.02ppb 及び 3.8ppb）を考慮した極低濃度下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、有機リン系殺虫剤ダイアジノンならびにカーバメート系殺虫剤フェノブカルブを対象とした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。

難揮発性の有機リン系殺虫剤ダイアジノン (Diazinon; 分子量: 304.35、Cas No.: 333-41-5、lot No. 8170X, SZE8170X、純度98.3%、Sigma-Aldrich) 及び、フェノブカルブ (Fenobucarb; 分子量: 207.3、Cas No.: 3766-81-2、純度97.4%(ガスクロ用標準品)、Sigma-Aldrich) についてデータ解析を進めた。ダイアジノンの場合、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0.02ppbであることから、これを低濃度とし、公比 $\sqrt{10}$ で0.07及び0.20ppbを中高用量の目標値とした。この目標値は、これまでの検討の中で最も低い濃度である。ガス発生方法は、低温(10°C)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)を採用した。濃度は、捕集管(XAD-2 OVS Tube, SKC, Inc)を用いて測定した。

フェノブカルブの場合、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3.8ppbであることから、これを低濃度とし、公比 $\sqrt{10}$ で12.0及び38.0ppbを中高用量の目標値とした。ガス発生方法

は、加熱・バブリングにより気化させる方法(全発生器の温浴温度を70-80°C)を採用した。70-80°Cという条件下でのガス発生の実験はなかったため、成分の分析をおこなったところ2種の分解物が認められ、分解物のひとつは2-(1-Methylpropyl)-phenolであった。常温(25°C)で発生させても分解物が認められたことから、この分解物は常温気化時に常に共存するものと考えられたため、分解物の存在を前提としてフェノブカルブの目標濃度を得ることとした。濃度検知には、捕集管(昭和電工、Autoprep PS@Gas)を用いた(分析委託:財団法人化学物質評価研究機構東京事業所)。

両物質について、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、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)(=労働暴露モデル)及び22時間/日×7日間暴露(22、70、166、190時間後)(=生活暴露モデル)を実施し、マウス肺及び肝のmRNAサンプルを取得した。

ダイアジノン及びフェノブカルブの検討を計画するに際し、両化合物とも分析用の高純度製品を単一ロットで調達すること難しく(商社を通じて世界各国より調達してもバブリングによる発生に最低限度必要な100g程度しか購入できなかった)、従って、一つの化合物を2施設にまたがって実施することが困難となったことから、フェノブカルブは2時間暴露(小川)、ダイアジノンは6及び22時間の7日間暴露(長野)について検討することとした。

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、ダイアジノンを対象として、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。

ダイアジノンは沸点が83~84℃であり、常温では液体である。また、固体での蒸気圧は0.012 Pa (25℃) であり、揮発しにくい少量は気化するため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。これまでのバブリングによる発生法では、蒸気の発生を安定させるために恒温槽の温度を室温より高い条件で行ってきた(加熱バブリング法)。しかし、加熱した条件下では安定した低濃度のガス発生が難しかったため、10℃に冷却し、ゴアテックスチューブを用いて微細な気泡によるバブリングを行う冷却バブリング法を採用し、目標とするガス濃度を安定して得ることができた。

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、ダイアジノンならびにフェノブカルブ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)及び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、ダイ

アジノンでは指針値が0.02ppbに対し、0.02、0.07及び0.20ppbであり、フェノブカルブでは指針値3.8ppbに対し、3.8、12.0及び38.0ppbである。上述したように、フェノブカルブについては2時間暴露、ダイアジノンについては6及び22時間の7日間暴露について解析した。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、既知情報との照合によるシグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis(IPA)(Ingenuity Systems Inc.)を用いて行った。有意差の検定は、Studentのt検定により行い、P値が0.05未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

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暴露の状況下で、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た実験条件の再検討を主に行なった。

「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、培養及び実験を行った。「培養及び刺激」は、細胞株を25cm²フラスコで培養し(5×10⁵ 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、シグナル伝達分子リン酸化検出のためのwestern blottingを検討した。培養・刺激後の細胞を、脱リン酸化阻害剤を添加したLysis Bufferに溶解、遠心分離した上清をサンプルとした。サンプルを限外ろ過にて濃縮後、20 μgをSDS sample bufferに溶解、200V、50~60分電気泳動(SDS-PAGE)を行い、引き続きpolyvinylidene fluoride (PVDF)膜に20%メタノール含有のblotting bufferにて160 mA、35分で転写した。転写膜を5% skim milk/TBS-T (1×TBS、0.1% Tween-20)で室温、1時間ブロッキング後、各々推奨希釈濃度に5%BSA/TBS-Tにて希釈したリン酸化タンパク質特異的の一次抗体(p38MAPK, ERK1/2 及びJNK)とともに4℃、一晚震盪した。次に、PVDF膜を洗浄後、HRP標識二次抗体を含む5%BSA/TBS-T中で室温、1時間インキュベートした。検出は、化学発光(ECL plusもしくはECL Advance)により、CCDカメラにて画像取得後、Quantity Oneソフトウェアを用いて解析を行った。

(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. 研究結果及び考察

C-1: 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及び、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、ダイアジノン及びフェノバルブの極低濃度暴露システムの改良とそれによる経気道暴露実験を行った。

ダイアジノンを室内濃度指針値である0.02 ppbを考慮し、0.02、0.07及び0.2ppbを目標暴露濃度として吸入暴露方法の開発を行った。ダイアジノンの発生装置については、ダイアジノンの特性、すなわち、常温で液体であり、蒸気圧は0.012 Pa (25℃)であり、揮発しにくい少量は気化するため、ダイアジノンを空気でバブリングし、ゴアテックス製チューブを利用した微細な気泡を発生させる方法を選択した。このバブリング法による吸入暴露装置の試運転をした結果、発生容器を入れた恒温槽の温度を室温あるいは加温した場合には、チャンバー内のダイアジノン濃度を安定させることができなかった。そこで、恒温槽の温度を10℃に冷却してバブリングする条件下で検討したところ、0.018±0.000 (目標濃度に対し92%)、0.066±0.001 (目標濃度に対し95%) および0.211±0.003 (目標濃度に対し106%)となり、目標濃度に近似した値が得られた。これまでの極低濃度暴露の研究では、恒温槽の温度を室温または室温以上の温度にしてバブリングする加熱バブリング法により目的の暴露濃度を

得ることができていた。pptオーダーでのガス発生を検討する際には、原体を冷却する手法を考慮した方がよい事が明らかとなった。理論的・熱力学的な常識論よりも、安定して発生させる事を目的とした試行錯誤が功を奏したものと考える。

フェノブカルブの場合、指針値3.8ppbを考慮し、3.8、12.0及び38.0ppbを目標暴露濃度として吸入暴露方法の開発を行った。フェノブカルブは融点が32℃、常温では液体である。国際化学物質安全性カードあるいは化学物質等安全データシートに記載されている蒸気圧は、0.00986 Pa (20℃) (0.000074 mmHg)である。この蒸気圧データを基に、加熱バブリング法によりフェノブカルブを気化させることで一定濃度のフェノブカルブ蒸気を得ることが可能と思われた。発生器の加温温度を60、65及び70℃としたところ60℃では7.8ppb、65℃では12.5ppb、70℃では17.5ppbが得られた。高用量群の目標濃度をえるため、加温温度を80℃としたところ、低用量及び中用量群は20及び45ppbと高いが、高用量群は目標値に近い43ppbが得られた。最終的に加温温度を、低・中用量群では70℃、高用量群では80℃とし、発生流量を、低用量群には0.5L/分、中用量群には4.0L/分、高用量群には8.0L/分としたところ、目標濃度に近似した値が得られた(低用量群:3.5 [8%低い]、中用量群:12.0 [目標値]、高用量群:48.5ppb [28%高い]が得られた。対照群チャンバー内濃度は、ガスマス定量下限値の0.04ppb($\mu\text{g}/\text{m}^3$)未満であり、室内濃度も0.045 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と定量下限値付近の値であり、実験に影響を及ぼす濃度ではなかった。

このような発生器、発生方法を用いて、

ダイアジノン及びフェノブカルブの経気道暴露(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)及び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-1-1:マイクロアレイデータ解析技術開発に関する共同開発委託研究

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(MLANG最適化研究、すなわち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研究)を(株)NTTデータに委託し、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。

その結果、既開発のMLANG補正後のデータを用いても異常中断することなく、独自開発の教師無しクラスタリング処理ができるようになり、さらに従来は判別の難しかった非発現遺伝子群("ZERO"発現群)を特定・抽出することにも成功した。これにより、シックハウスレベルの極低濃度暴露実験において存在が予測される、真の微小変動を呈する遺伝子を、ノイズや非発現のデータから分離することが可能になると考えられ、網羅的遺伝子発現解析技術による気化性化学物質リスク評価において、格段の高感度化・高精度化の実現が期待される。

C-2: 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、フェノブカルブ(指針値 3.8ppb、暴露目標値 3.8、12.0 及び 38.0ppb) 及びにダイアジノン(指針値 0.02ppb、暴露目標値 0.02、0.07 および 0.2 ppb) つきデータ解析した。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、フェノブカルブの 2 時間単回暴露(2、4、8、24 時間後)、ダイアジノンの 6 時間/日×7 日間暴露(6、22、70、166 時間後)及び 2 2 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。以下に両化合物について、2 時間単回暴露、6 時間/日×7 日間暴露及び 2 2 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-2-1:ダイアジノン極低濃度経気道暴露時の遺伝子発現変動解析:

以下に、6 時間/日×7 日間暴露と 2 2 時間/日×7 日間暴露、それぞれについて、肺と肝における解析結果を示す。

C-2-1-1:ダイアジノン[6 時間/日×7 日間暴露]の「肺」にお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 731 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。リンパ球やマクロファージが関与する炎症に関係すると考えられる、Nr4a1、Cxcr4、CD52、CD37、Ly6e 及び Tnfsf10 等の遺伝子の有意な発現増加が認められたが、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。したがって、肺において炎症に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。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 2,675 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 98 ps が見いだされた。現時点で有害影響に係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。また 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なかった。

C-2-1-2:ダイアジノン[6 時間/日×7 日間暴露]の「肝」にお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 1,045 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 109 ps が見いだされた。リンパ球やマクロファージが関与する炎症に係すると考えられる、Nr4a1、Il1b、Cxcl12、Cd276 及び Cd9912 等の遺伝子の有意な発現増加が認められたが、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。したがって、肝において炎症に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。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 2,262 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 222 ps が見いだされた。現時点で有害影響に係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは見いだせなかった。また 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なかった。

C-2-1-3:ダイアジノン[22時間/日×7日間暴露]の「肺」にお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2,641 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92 psが見いだされた。現時点で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は見いだせなかった。また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。

昨年度研究のクロルピリフォス暴露時の解析の際、代償的に吸入暴露影響を軽減するメカニズムが存在することが示唆され、関与する分子としてCyr61遺伝子が見いだされた。このことを踏まえ、ダイアジノン暴露時のCyr61遺伝子の発現変動を検討したところ、クロルピリフォス暴露時同様、Cyr61遺伝子の発現増加が6時間よりも22時間暴露時の方が持続的に、また有意な増加が認められた。興味深い事に、このCyr61遺伝子の発現増加が、22時間×7日間暴露時に強く誘導される現象は、先行研究ならびに本研究にて検討した物質の内、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカン、パラジクロロベンゼン、クロルピリフォス及びダイアジノンにて観察されたが、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの場合は認められなかった。Cyr61が機能不全を来す状況においては、肺の毒性症状が経時的に増悪する可能性が考えられ、このことは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。

他方、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして1,145 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47 psが見いだされた。

現時点で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は見いだせなかった。また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なかった。

C-2-1-4:ダイアジノン[22時間/日×7日間暴露]の「肝」にお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838 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144 psが見いだされた。現時点で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は見いだせなかった。また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なかった。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして2,589 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。現時点で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は見いだせなかった。また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なかった。

C-2-2:フェノブカルブ極低濃度経気道暴露時の遺伝子発現変動解析:

以下に、2時間単回暴露について、肺と肝における解析結果を示す。

C-2-2-1:フェノブカルブ[2時間単回暴露]の「肺」にお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929 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26 psが見いだされた。現時

点で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は見いだせなかった。また 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なかった。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして1,329 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8 ps が見いだされた。現時点で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は見いだせなかった。また 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なかった。

C-2-2-2: フェノブカルブ[2時間単回暴露]の「肝」にお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2,002 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85 ps が見いだされた。酸化ストレスに関係すると考えられる、Sod1、Sod2、Prdx1、Prdx6、Txn11、Ephx1、Ephx2、Gpx4 及び Gsta3 等の遺伝子の有意な発現増加(いずれも暴露24時間後)が認められ、IPA による検索でもこのシグナルネットワークが抽出されてきた。したがって、肝において酸化ストレスが誘発されている事が示唆された。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして1,677 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16 ps が見いだされた。現時点で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は見いだせなかった。また 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なかった。

C-2-3: 発現遺伝子の組織内局在を発現コピー数の定量化と共に解析する ISH 技術の開発:

発現遺伝子の組織内局在を発現コピー数の定量化と共に解析する ISH 技術の開発に向けて、セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)及び(株)ベリタスとの共同委託研究を実施した。セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)との共同研究により、1,000 mg/kg サリドマイド単回経口投与の際(採取時間:投与2、4、8、24時間後、1群3匹、計24匹)の肺切片(組織固定条件:4°C、4時間)について、陽性対照遺伝子 Uteroglobin と2遺伝子(p21(Cdkn1a)及び Zbtb16)について ISH を実施した。その結果、全ての遺伝子について、定量性をもつての染色に成功し、マイクロアレイ測定値に比例して Uteroglobin では4時間時に、p21 では2、4時間時に誘導が認められ、Zbtb16 は誘導が認められなかった。Uteroglobin は終末細気管支上皮のみに発現していた。したがって、本 ISH 技術は発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにすることが可能であることが確認された。この ISH 技法は厳密な組織固定条件(温度・時間等)を要求することから、重要な事例の検出には再実験を実施することで対応することとし、定量的局在確認の方策が確立された。しかし、過去に採取した検体に適応する際には適用が困難であるため、組織固定条件がより柔軟なプロトコルを有する ISH 技術を有する(株)ベリタスとの共同研究を行った。確認試験としてラット腎切片を用いて、陽性対照遺伝子 AQP2 遺伝子について ISH を実施したところ、集合管周囲細胞における特異的な発現を検出することが出来、

Percellome 解析により見出された発現変動遺伝子の組織内局在を明らかにするのに適した実用的な技術であることが確認された。吸入暴露した際のマウス肺について本技術を適用する事により、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにすることが可能であると考えられる。

C-3: 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:

シックハウス症候群の主要症状のひとつに、喘息の誘発など気道炎症を疑わせる症状が認められることから、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 細胞を用いた。初年度（平成 20 年度）は、Poly I:C (10 μ g/ml) 存在下、24 時間後にホルムアルデヒド (1, 10 μ M) を添加、一定時間後 (mRNA 発現は 3 時間後) に細胞を回収し、解析する《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系について、昨年度（平成 21 年度）は、ホルムアルデヒド (1, 10 μ M) 添加 3 時間後、ホルムアルデヒド暴露を継続しつつ、Poly I:C (10 μ g/ml) の存在下、一定時間後 (mRNA 発現は 12 時間後) に細胞を回収する《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》について検討を加えた。

《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系では、ホルムアルデヒド 10 μ M 以上で、IL-8 mRNA の発現増強が観察されたが、《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の系では、結果の再現性が良好でなかった。この理由の可能性として、おそらくホルムアルデヒドによる炎症応答増強効果と、細胞障害による直接の非特異的抑制効果の強弱により、ばらつきのある結果が得られたためと考えられた。

動物吸入暴露モデルとの対応を考えると、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》より

も、《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の方がより適した系と思われるが、この系の再現性の困難さより断念し、今年度（平成 22 年度）は《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系で、ホルムアルデヒドの増強効果がいかなる刺激伝達系を介しているものかどうかを検討した。その結果、IL-8 遺伝子発現に関わると報告されている ERK, p38, JNK のリン酸化のうち、JNK のリン酸化を亢進しており、これが遺伝子発現増強に寄与する可能性が強く示唆された。

D. 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。

これまで検討してきたバブリングによる発生法では、蒸気の発生を安定させるために恒温槽の温度を室温より高い条件で行ってきた（加熱バブリング法）。しかし、今年度検討した有機リン系殺虫剤ダイアジノンの場合は、加熱した条件下では安定した低濃度のガス発生が困難であったため、条件検討の結果、10℃に冷却し、ゴアテックスチューブを用いてバブリングする冷却バブ

リング法を採用し、目標とするガス濃度を安定して得ることができた。したがって物質及び目標とする濃度によっては、安定したガス発生を得るためには、原体を加熱せず、逆に冷却した方がよい場合が明らかとなった。

フェノバルブのシックハウスレベルの極低用量暴露に於いて、2時間単回暴露時、肺では顕著な発現変動を示す遺伝子は認められなかったが、肝では多くの酸化ストレス関連遺伝子の発現増加が観察され、肝において酸化ストレスが誘発されている事が示唆され、反復暴露により酸化ストレスによる細胞障害が顕在化する可能性が示唆された。上記した通り、分析用の高純度製品を単一ロットで調達すること難しかったため、7日間暴露実験は検討できなかったが、今後、長期暴露による実験が必要と考える。

ダイアジノンの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体反応検出手法として活用できることが示された。加えて、昨年度のクロルピリフォス暴露時の解析の際、代償的に吸入暴露影響を軽減するメカニズムが存在することが示唆され、関与する分子として Cyr61 遺伝子が見いだされたが、今年度研究でのダイアジノン暴露時でも同様に、Cyr61 遺伝子の発現増加が、6時間よりも22時間暴露時の方が持続的に、また有意に認められた。興味深い事に、この Cyr61 遺伝子の発現増加が22時間

×7日間暴露時に強く誘導される現象は、先行研究ならびに本研究にて検討した物質の内、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカン、パラジクロロベンゼン、クロルピリフォス及びダイアジノンにて観察されたが、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの場合は認められないことを見いだした。Cyr61 が機能不全を来す状況においては、肺の毒性症状が経時的に増悪する可能性が考えられ、このことは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。

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研究を(株)NTT データに委託し、その結果、MLANG 補正後のデータを用いても異常中断することなくクラスタリング処理できるようになり、さらに従来は判別の難しかった非発現遺伝子群("ZERO"発現群)を特定・抽出することにも成功した。これにより、シックハウスレベルの極低濃度暴露実験において存在が予測される、真の微少変動を呈する遺伝子を、ノイズや非発現のデータから分離することが可能になると考えられ、網羅的遺伝子発現解析技術による気化性化学物質リスク評価において、格段の高感度化・高精度化の実現が期待される。

また、発現コピー数の定量化とともに発現遺伝子の組織内局在を明らかにするために、セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)及び(株)ベリタスとのISH解析の技術開発に関する共同研究を実施した結果、Percellome解析により見出された発現変動遺伝子の組織内局在を明らかにするのに適した実用的な技術基盤が整備できた。さらに、遺伝子発現変動の組織内局在が明らか

に存在することを確認したことから、ISHから得る情報によって解析内容の格段の高精度化が期待される。

このように、シックハウスレベルの極低濃度暴露に於いても、網羅的遺伝子発現解析手法により、生体反応を観測することが可能であることから、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明らかとなった。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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsuyama M, Miura Y, Kiwamoto T, Moriya A, Kokuho N, Shimizu K, Otsuka S, Hijikata M, Keicho N, Hayashihara K, Saito T. A case of familial pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Internal Med* 49 (10): 949-53, 2010.

Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Promjai J, Yanai H, Nishida N, Matsushita I, Ohashi J, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Manosuthi W, Kantipong P, Sawanpanyalert P, Keicho N, Khusmith S, Tokunaga K. Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis. *Genes Immun* 11: 416-22, 2010.

Yoshida T, Sekine T, Aisaki K, Mikami T, Kanno J, Okayasu I., *CITED2* is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid., *J Gastroenterol* 2011 46(3): 339-49.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus., *Biol Reprod.* 2011 84(4):734-42.

Atsushi Baba, Fumiaki Ohtake, Yosuke Okuno, Kenichi Yokota, Maiko Okada, Yuuki Imai, Min Ni, Clifford A Meyer, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno, Myles Brown, and Shigeaki Kato, Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex, *Nature Cell Biology*, accepted 2011.3

菅野 純、Percellome トキシコゲノミクスの進捗、*医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社* Vol.236 no.12, p1125-1126, 2011

Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A, Saga Y., The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite. *Development.* 2010 May;137(9):1515-22.

Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats, *Industrial Health*, 2010, 48: 783-795.

Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sasaki, T., Koda, S. and Fukushima, S.: Translocation of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats, *Industrial Health*, 2011, 48, in press

Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.

Nagano, K., Gotoh, K., Kasai, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N., Eitaki, Y., Yamada, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Two- and 13-week Inhalation Toxicities of Indium-Tin Oxide and Indium Oxide in Rats, *Journal of Occupational Health*, 2011: in press.

Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M.,

Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats, *Industrial Health*, 2010, 48: 452-459.

Take, M., Yamamoto, S., Ohnishi, M., Matsumoto, M., Nagano, K., Hirota, T., Fukushima, S: Chloroform distribution and accumulation by combined inhalation plus oral exposure routes in rats. *J of Environmental Science and Health Part A*, 2010, 45: 1616-1624.

Umeda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima S.: Inhalation carcinogenicity and toxicity of 1,2-dichloropropane in rats. *Inhalation Toxicology*, 2010, 22: 1116-1126.

2. 学会発表

松下育美, 土方美奈子, 伊藤秀幸, 慶長直人. 微生物関連物質の低濃度暴露下でヒト気道上皮細胞の炎症応答に化学物質であるホルムアルデヒドが与える影響についての検討. : 第50回日本呼吸器学会総会, 4月23日-25日, 京都, 2010.

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Hiroto Asano, Kinichi Nakashima, Glucocorticoid induces expression of astrocyte marker GFAP mRNA in mouse neural stem cells. 14th International Congress of Endocrinology, 2010.3.29, Kyoto, poster