

201035001B

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 20 年度～22 年度 総合研究報告書

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 20 年度～22 年度 総合研究報告書

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 20 年度～22 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告書

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

(資料) 1. 委託研究報告書: マウスを用いた極低濃度暴露試験 15

2. 委託研究報告書: 発現データ補正のための係数最適化研究 207

3. 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 243

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
 慶長 直人 261

5. 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 267

6. 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 279

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 321

III. 研究成果の刊行物・別刷 323

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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-

平成 20 年度～22 年度 総合研究報告書

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

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、人にお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(厚労科研・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、同検討会が室内指針値として掲げる極低濃度付近での吸入暴露実験を実施し、肺及び肝の網羅的遺伝子発現変動データの蓄積(一化合物につき、単回暴露、及び、職場或いは家庭を想定した反復暴露の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)を行った。その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、上記13物質の内、昇華性或は難揮発性の化学物質の極低濃度吸入暴露実験の実施と網羅的遺伝子発現変動解析、データベース構築を推進する。加えて、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。また、Percellome 標準化手法を用いて、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、血液を介した全身影響、嗅覚等を介した神経影響等を包括的に評価する基盤を整備する。平成20年度は、パラジクロルベンゼンとテトラデカン、平成21年度はクロルピリフォス、平成22年度はダイアジノンとフェノブカルブについて、吸入暴露に向けた技術開発(長野)、極低濃度での吸入暴露実験(小川)、及び遺伝子発現変動解析(菅野)、ヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* 実験(慶長)を検討した。その結果、先行3年間の解析結果と

あわせ、以下の事が明らかとなった。すなわち、1) 吸入暴露時、肺と肝の遺伝子発現は異なったプロファイルを示すことが多いこと、2) 遺伝子の発現応答は、反復暴露により、弱くなる場合と強くなる場合があること、3) 吸入暴露により肺よりも肝が、経口暴露により肝よりも肺が敏感に反応する場合があること、4) 反応した遺伝子の主なカテゴリーは、肺防御系[候補分子 Cyr61]、ストレス応答系、遺伝子欠失マウスの情報に裏づけされた肺機能に関係するもの及び、該日リズム系であること、である。肺防御系と考えられる Cyr61 遺伝子の発現が、長時間反復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、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。加えて、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)ベリタスとの定量的 *in situ* hybridization 解析の技術開発に関する共同研究を実施した。これらにより、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、人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* 実験系の有用性が明らかとなったことから、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

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・病理検査部・副所長(兼)病理検査部長

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、人にお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確立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吸入暴露実験を実施し、肺及び肝の網羅的遺伝子発現変動データの蓄積(一化合物につき、単回暴露、及び、職場或いは家庭を想定した反復暴露の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、そのインフォマティクス解析を実施した。その結果、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或は難揮発性の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。

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或は難揮発性の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定量的 *in situ* hybridization (ISH) 技術の開発に向けて、平成 20~22 年度にわたり、セレスター・レキシコ・サイエンシズ (株) 及び(株)ベリタスとの共同研究を実施した。具体的には前者とは、1,000 mg/kg サリドマイド単回経口投与の際の肺切片 (組織固定条件: 4℃、4 時間) について、陽性対照遺伝子と 2 遺伝子についての ISH を実施し、後者ではラット腎切片を用いて、組織固定条件がより柔軟なプロトコールである ISH を、陽性対照遺伝子について実施する。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 20 年度はパラジクロルベンゼン (Paradichlorobenzene、分子量: 147、CAS No.: 106-46-7、純度: 98.0%以上、和光純薬工業) とテトラデカン (n-Tetradecane、分子量: 198.39、CAS No.: 629-59-4、純度: 99.0%以上、和光純薬工業)、平成 21 年度はクロルピリフォス (Chlorpyrifos、分子量: 350.6、CAS No.: 2921-88-2、純度: 98.0%、Tronto Research Chemicals Inc.) 及び、平成 22 年度はダイアジノン (Diazinon; 分子量: 304.35、Cas No.: 333-41-5、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) を対象とし、室内濃度指針値 (パラジクロルベンゼンとテトラデカンは 40 ppb、クロルピリフォスは 0.07ppb、

ダイアジノンは 0.02ppb、フェノブカルブは 3.8 ppb) を考慮した濃度でマウスに吸入暴露し検討した。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 100 g 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、ダイアジノンは 6 及び 22 時間の 7 日間暴露について検討することとした。

テトラデカンの暴露実験と遺伝子発現データ取得は、先行研究の最終年度 (平成 19 年度) 内に行われているが、その後の詳細な解析結果は本研究報告書にて記載することとした。

以下に 3 年間の計画の概要を示す。

吸入暴露実験: 雄性マウスを対象とした吸入暴露試験 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) を 2 時間の単回暴露 (2、4、8 及び 24 時間後に観測)、6 時間 x 7 日間反復暴露 (6、22、70、166 時間後に観測) (= 労働暴露モデル) 及び、2 2 時間 x 7 日間反復暴露 (22、70、166、190 時間後に観測) (= 生活暴露モデル) の 3 種類のプロトコールにより実施する (小川)。

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 を使用する (菅野)。

評価システムの構築: 4 用量、4 時点の遺伝子発現情報をすでに開発済みの Percellome 法及び波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、インフォ

マティクス構築を進める（菅野）。

暴露システムの開発と改良: 先行3年の研究で用いた吸入暴露施設を、昇華性物質による極低濃度暴露が可能なシステムへ改良する（長野）。

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、ヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* 暴露解析実験を実施する（慶長）。具体的には、ヒト気道系上皮細胞に外来微生物由来物質 LPS あるいは Poly I:C と吸入化学物質ホルムアルデヒドを加え、ケモカイン、サイトカインの遺伝子、タンパク発現、シグナル伝達系への影響を、定量的 RT/PCR、ELISA、あるいは Western blotting により検討した。

（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. 結果

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（長野）:

平成20年度は、パラジクロルベンゼンは固体を加熱・昇華させる方法、テトラデカンは加熱融解バブリング法により気化させる方法により、両者とも40、120及び400ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。平成21年度は、クロルピリフォスを微細な気泡でバブリングし少量のクロルピリフォスを安定して気化させる加熱・バブリング法を考案し、0.07、0.21及び0.7ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。平成22年度は、ダイアジノンを低温（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）にて微細な気泡でバブリングし、少量のダイアジノンを安定して気化させる方式により、0.02、0.07 および0.2ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。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。加えてフェノブカルブを加熱バブリング法により気化させる方法を考案し、3.8、12.0及び38.0ppbの目標濃度で吸入暴露する方法を開発した。

C-2. 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）:

平成20年度は、昇華性化学物質パラジクロルベンゼン（指針値0.04ppm、暴露目標値0.04、0.12、0.40ppm）とテトラデカン（指針値0.04ppm、暴露目標値0.04、0.12、0.40ppm）について、平成21年度は、昇華性化学物質クロルピリフォス（指針値:0.07ppb、暴露目標値:0.07、0.20、0.70ppb）について、平成22年度は有機リン系殺虫剤ダイアジノン（指針値0.02ppb、暴露目標値0.02、0.07および0.2ppb）とカーバメート系殺虫剤フェノブカルブ（指針値3.8ppb、暴露目標値3.8、12.0及び38.0ppb）について、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）

及び2 2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。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。

加えて、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、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。

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 (菅野) :

平成20 年度は、昇華性化学物質パラジクロルベンゼンとテトラデカンについて、平成21 年度は、昇華性化学物質クロルピリフォスについて、平成22 年度はダイアジノンとフェノブカルブについて検討した。各物質を12 週齢の雄性C57BL/6J マウス(日本チャールスリバー)(パラジクロルベンゼンとテトラデカンの際はC57BL/6CrSlc(日本エスエルシー))マウスに経気道暴露(4 用量、16 群構成、各群3 匹)させ、両物質につき、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)及び、2 2 時間/日×7 日間暴露(22、

70、166、190 時間後)して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。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。

解析の結果、平成20 年度の検討化学物質であるパラジクロルベンゼンとテトラデカンについて、パラジクロルベンゼンでは2 2 時間/日×7 日間暴露時、肺ではグルタチオン関連遺伝子の発現増加が、肝ではミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現増加が認められた。前者は酸化的ストレス応答、後者はミトコンドリアの脱共役作用の結果、細胞内 ATP の減少や酸化的ストレスが引き起こされる事が示唆された。したがって、同じ化学物質でも暴露時間が異なると遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなった。また肺に於けるグルタチオンペルオキシダーゼをはじめとする酸化的ストレス応答遺伝子の発現誘導が、2 時間、6 時間暴露よりも22 時間暴露時の方が強いことを見いだした。他方テトラデカンでは、いずれの暴露プロトコールに於いても、現時点では肺及び肝の障害と関連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。肝では、反復暴露により発現誘導が減弱する遺伝子(Adk:adenosine kinase, Arf6:ADP-ribosylation factor 6 等)認められた。

平成21 年度の検討化学物質であるクロルピリフォスについては、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2時間、6時間暴露よりも22時間暴露時の方が少ない事が明らかとなった。解析を進めた結果、22時間暴露時の方が発現変動を示す遺伝子数が少ない理由として、特定の遺伝子の発現が増加し、代償的にクロルピリフォス暴露影響を軽減するメカニズムが存在する可能性が考えられた。肺において、その候補分子 Cyr61 が見いだされた。肺では障害に関わる遺伝子の顕著な変動は認められなかったが、この Cyr61 遺伝子のみ顕著な発現変動が認められた。Cyr61 遺伝子の発現は、2時間暴露の際には有意な変動が認められないという特性があった。Cyr61 分子の過剰発現が、高酸素による肺上皮細胞の細胞死を抑制するという報告(Jin Yら、Am J Respir Cell Mol Biol 33: 297-302, 2005)を見いだしたことから、この 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。

平成22年度の検討化学物質であるダイアジノン及びフェノブカルブについては、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。ダイアジノンについては、0.02 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た。6時間暴露時では肺及び肝共に、オーファン受容体 Nr4a1 遺伝子や様々な CD 分子等、リンパ球やマクロファージが関与する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。

平成22年度のもう一つの検討化学物質であるフェノブカルブについては、2時間単回暴露時、肺では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。他方、肝では酸化ストレスに関係する遺伝子の発現増加が認められ、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た。

加えて先行3年間の解析結果とあわせ、以下の事が明らかとなった。すなわち、1) 吸入暴露時、肺と肝の遺伝子発現は異なったプロファイルを示すことが多いこと、2) 遺伝子の発現応答は、反復暴露により、弱くなる場合と強くなる場合があること、3) 吸入暴露により肺よりも肝が、経口暴露により肝よりも肺が敏感に反応する場合があること、4) 反応した遺伝子の主なカテゴリーは、肺防御系[候補分子 Cyr61]、ストレス応答系、遺伝子欠失マウスの情報に裏づけされた肺機能に関係するもの及び、該リズム系であること、である。

また、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℃、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、定量性をもった染色に成功し、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おこなった。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、Percollome 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。

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（慶長）：

平成 20 年度は、ヒト気道上皮細胞株を用いて、細菌性リポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)ないし Poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホルムアルデヒド添加による影響を検討した。細胞株の選択のための予備検討として、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 及びヒト肺胞様癌化細胞株 A549 について、LPS, Poly I:C の刺激下で比較検討を行った。その結果、A549 に比べ BEAS2B 細胞では、著しい刺激応答性が観察された。シックハウス症候群の主要症状のひとつに喘息の誘発があることから、気道系の上皮細胞のモデルである BEAS2B 細胞を使用することとした。

BEAS2B 細胞に LPS あるいは Poly I:C 刺激 24 時間後にホルムアルデヒド(1 mM, 10 mM, 100 mM)を添加し、3 時間後に細胞を回収し、IL-8 の RT/PCR を実施したところ、ウイルス感染を想定した Poly I:C (10 µg/ml)存在下で、ホルムアルデヒド 10 mM 以上で、特に好中球の遊走に関わるケモカインである IL-8 の mRNA の発現亢進が観察された。したがって、ホルマリン単独では効果が微弱であるが、外来微生物由来物質との複合効果が認められることを明らかにした。

平成 21 年度は、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 量などを検討した結果、再現性のある結果が得られなかった。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。

平成 22 年度は、再現性が良い結果が得られる、ヒト気道系上皮細胞 (BEAS2B 細胞) に、外来微生物由来物質である LPS あるいは Poly I:C 適用下でホルムアルデヒドを加え、その際のホルムアルデヒドによるサイトカイン遺伝子の発現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 のリン酸化が亢進しており、これが遺伝子発現増強に寄与することが示唆された。

D. 考察

以上の通り、平成 20、21 及び 22 年度の 3 年間にわたり、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、パラジクロルベンゼン、テトラデカン、クロルピリフォス、ダイアジノン及びフェノブカルブについて、極低濃度、例えばクロルピリフォスでは 0.07 ppb、ダイアジノンでは 0.02 ppb という条件にて、マウスに全身暴露する方法の開発を行い、実際にマウスに吸入暴露することができた。したがって、極低濃度下でマウスに吸入暴露する技術が、ガス状物質に加え、さらに昇華性又は難揮発性の化学物質についても蓄積された。

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、実際に肺に於いて多数の遺伝子の発現変動が観察され、同時に肝に於いても多くの遺伝子の発現変動が認められることが明らかとなった。パラジクロルベンゼンでは、肺に於けるグルタチオンペルオキシダーゼをはじめとする酸化ストレス応答遺伝子の発現誘導が、2 時間、6 時間暴露よりも 22 時

間暴露時の方が強いなど、実際に有害性を示唆するプロファイルを得ることが出来た。また、同じ化学物質でも暴露時間が異なると遺伝子発現プロファイルが異なることも明らかとなった。クロルピリフォスでは、2 時間、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かったが、この理由として、特定の遺伝子が発現増加し、代償的にクロルピリフォス暴露影響を軽減する可能性が考えられた。解析の結果、この候補分子 Cyr61 を見いだすことができた。2 時間暴露時では Cyr61 遺伝子の有意な発現変動が認められなかったが、このことは上記の可能性を支持しているものとする。

加えて先行 3 年間の解析結果とあわせ、以下の事が明らかとなった。すなわち、1) 吸入暴露時、肺と肝の遺伝子発現は異なったプロファイルを示すことが多いこと、2) 遺伝子の発現応答は、反復暴露により、弱くなる場合と強くなる場合があること、3) 吸入暴露により肺よりも肝が、経口暴露により肝よりも肺が敏感に反応する場合があること、4) 反応した遺伝子の主なカテゴリーは、肺防御系[候補分子 Cyr61]、ストレス応答系、遺伝子欠失マウスの情報に裏づけされた肺機能に関係するもの及び、該日リズム系であること、である。

特に上記 4) のうち肺防御系に関し、これに関与すると考えられる Cyr61 遺伝子の発現が、長時間反復暴露 (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 分子の過剰発現が、高酸素による肺上皮細胞の細胞死を抑制するという報告(Jin Yら、Am J Respir Cell Mol Biol 33: 297-302, 2005)を見いだしたことから、Cyr61 が機能不全を来す状況においては、肺の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(Mo FE ら、Mol Cell Biol 22: 8709-8720, 2002)、肺における Cyr61 遺伝子の機能解析のためには、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。

また上記 4) の該日リズム系に関し、ホルムアルデヒドの低用量の吸入暴露により、肺・肝両方において、該日リズムに係る遺伝子の発現変動が認められたことから、ホルムアルデヒド暴露により生体の概日リズムが乱れる可能性が示唆された。概日リズムが乱れることは、シックハウス症候群において、通常の検査からは病因が特定されず、これまで毒性学的な解析が困難であった倦怠感・疲労感等の「不定愁訴」に関連してい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。今後、ホルムアルデヒド吸入暴露時の、該日リズムへの影響ならびに遺伝子発現の脳を含む多臓器連関について検証する必要があるものと考えられる。

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。

さらに、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定量的 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、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、本研究結果は、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を示すものであった。

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た *in vitro* 実験系を本研究に於いて新規に導入した。平成 20、21 及び 22 年度の検討により、培養ヒト気道上皮細胞に対して、化学物質単独では効果が微弱であるが、外来微生物由来物質、特にウイルス感染を想定した poly I:C の低濃度暴露により、好中球の遊走に関わるケモカインである IL-8 の mRNA の発現亢進が観察

され、この相乗効果に関与するシグナル伝達は JNK のリン酸化であることが示唆された。このことは、この *in vitro* 実験系が、ヒト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意義深いものとする。

E. 結論

このように、昇華性又は難揮発性の化学物質を含め、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、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。そこには、該当遺伝子のノックアウトマウスが発症する肺病変や、化学物質に対する防御機構の発動の可能性と関与する候補遺伝子を見いだす等、長期暴露時の吸入毒性予測に示唆を与える情報が含まれている。またヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の実験系により人への外挿性の向上を計ることが可能となった。

今後は、本分担研究にて得た遺伝子発現データが予測する肺の形態変化、標的細胞について、実際に極低濃度暴露時の肺影響を電子顕微鏡、ISH 等により高精度に解析する必要があるものとする。加えて、肺・肝に対する本手法を中枢神経系に適用することにより、これまで毒性学的な解析が困難であった、シックハウス症候群に於ける倦怠感・疲労感等の「不定愁訴」を定量的評価の対象とすべく、その分子実態を把握する必要がある

ものとする。こうした検討を通して、シックハウス症候群を考慮した極低濃度域を含む暴露濃度での有害性を、肺のみならず中枢影響を包含し見落としなく検出できる新評価体系の確立が期待され、また近年の技術革新の加速に伴い急増する「新規物質」の吸入毒性評価への対応の強化が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, Tsuda H., Involvement of macrophage inflammation protein 1{alpha} (MIP1{alpha}) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying., *Carcinogenesis*. 2010 May;31(5):927-35.

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

- Renne, R., Brix, A., Harkema, J., Herbert, R., Kittel, B., Lewis, D., March, T., Nagano, K., Pino, M., Rittinghausen, S., Rosenbruch, M., Tellier, P., Wohrmann, T.: Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicologic Pathology*, 2009, 37: 5S-73S.
- 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: 2547-56, 2009.
- 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*, 2009 110(2): 293-306
- 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.
- Kanno J., Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects". *J Toxicol Sci.* 2009; 34 Suppl 2:SP199-200.
- 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.* 2009;34 Suppl 2:SP279-86. Review.
- 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.*, 2009, 34: 53-63.
- Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.* 2008, 33:105-16.
- Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H, Nishizawa, T., Nagano, K. and Fukushima, S.: Thirteen-week inhalation toxicity of

1,4-dioxane in rats, *Inhalation Toxicology*, 2008 20: 961-971.

2. 学会発表 (抜粋)

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.

菅野 純、インフォマティクス局面にある Percellome トキシコゲノミクスの食品・食品添加物への適用、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会 (沖縄)、2010 年 6 月.

相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、久保田久代、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：ラットに単回気管内投与した多層カーボンナノチューブの気管支周囲リンパ組織と縦隔部リンパ節への移行と病理組織変化、2010 年、第 83 回日本産業衛生学会

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、2009 年、第 82 回日本産業衛生学会

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

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

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 の吸入暴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

Polouliakh N, Matsuoka Y, Ghosh S, Nock R, Nielsen F, Kitajima S, Takagi A, Aisaki K. I, Kanno J, Kitano H, Signaling network in Mouse Embryonic Stem Cells The 9th International Conference on Systems Biology, Aug. 22-28, 2008, Sweden

五十嵐 勝秀、小川 幸男、笠井 辰也、長野 嘉介、北嶋 聡、相崎 健一、菅野 純、シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化の Percellome 解析、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

Hang NTL, Ishizuka N, Keicho N, Hong LT, Tam DB, Thu VTX, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Sakurada S, Lien LT. Improving the level of proficiency in a newly introduced interferon-gamma release assay for tuberculosis: an experience in Vietnam. In: 第 48 回日本呼吸器学会総会, 6 月 15-17 日, 神戸, 2008.

菅野 純、トキシコゲノミクス (Percellome Project) を基盤とした分子毒性学の展開の試み、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスに

よる毒性評価法の高精細化、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月
五十嵐勝秀、小川幸男、笠井辰也、長野嘉介、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純、シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化の Percellome 解析、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

高信健司、竹内哲也、奥田裕計、長野嘉介、福島昭治：アクリル酸エステル吸入暴露によるラットの生殖能力や児に及ぼす影響、第 81 回日本産業衛生学会、2008 年
長野嘉介、梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、相磯成敏、福島昭治：気管内投与による新たな毒性評価：全身暴露による吸入毒性の評価、第 24 回日本毒性病理学会、2008 年

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

菅野 純（研究分担者）：

- (1) 特許第 3995099 号、2007 年 8 月 10 日登録、高次元データを塊に分割する装置
- (2) 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) パラジクロロベンゼン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)

試験番号：0713

CAS No. 106-46-7

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