

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。

D. 考察及び結論

1. 単回暴露試験

1) フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)

フタル酸ジエチルヘキシルは、バブリング法によって発生させ濃度測定を行った。しかし、文献値及び発生器内濃度の測定結果から、DEHPの蒸気圧は、目標の濃度が得られるほど高くないため、本研究班のガス体による動物への暴露試験のスキームには不相当と判断し、実験を中止した。

DEHPの蒸気圧が非常に低く、容易にガス化しないというこの結果は、一般の家庭内空気においてもDEHPガス濃度は高くないことを示唆し、平成13年度に環境省が実施した室内空気調査においてもDEHPの最大濃度は $3.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小濃度 $23\text{ng}/\text{m}^3$ と指針値 $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ よりかなり低い測定結果が得られている。

2) パラジクロルベンゼン(p-DCB)

パラジクロルベンゼンは、ガラスびんを用いた発生装置を製作し、これによりガスを発生させ、それを二段階希釈することで、目標に近い 0.032 、 0.100 、 0.344ppm という濃度を達成し、動物に暴露することができた。

動物飼育室の濃度は、 $1.14 \pm 0.24 \text{ppb}$ ($1.57 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、設定した暴露低濃度とは1桁低い値であった。p-DCBの一般環境大気での最大濃度は $14.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (環境省、2003)であり、動物室内における濃度はそれを下回り、一般家庭の室内空气中で検出される平均濃度 $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (国土交通省、2003)を大きく下回っていた。動物室あるいはチャンバー内へ大気中から導入する換気空気は、HEPAフィルターにより微細な粉塵や細菌を、活性炭フィルターにより多くの化学物質を除去するよう設計されている。従って、外気からのp-DCB

ガスの混入は極めて少ないものと思われ、また動物室内では一般家庭のような室内設備からのガスの発生もなく、対照群チャンバー及び動物室内の濃度は一般環境大気よりも低く保たれていた。

本実験においては、最低暴露濃度と対照群チャンバー及び動物室内のこれらガス濃度の差が1桁以上あることから、マウス器官の遺伝子発現解析実験に関して、大きな影響は与えないものと考えている。

室内汚染化学物質の中でも農薬等のような、多く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。昇華性化学物質の表面積を大きく、また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、CPFの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、L群では 0.051ppb と27%ほど低く、M群は 0.240ppb と20%ほど高いが、H群は 0.710ppb と目標濃度を達成し、用量段階のある濃度で動物に暴露することができた。

3) クロルピリフォス(CPF)

CPF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。これは飽和蒸気圧に達する時間がかかるためと考えられた。昇華法に代えて、温浴により過熱溶解させゴアテックチューブを用いてバブリングすること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、暴露を行った。

濃度の測定法は、捕集管法を選択した。この方法は捕集管内のカラムにチャンバー内空気を流し、捕集したCPFをアセトンで抽出し、これをガスマススペクトルで測定する方法で、「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する方法である。暴露濃度が 0.07ppb の極低濃度であり、この方法が最適と考えられた。

動物への暴露濃度は、0.051、0.240、0.710ppbが得られ、L群は27%ほど低く、M群は20%高いがH群はほぼ目標の濃度が得られた。

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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) 以下であり、今回の試験に対して環境からの影響はないと考えられた。

4) フェノブカルブ

クロルピリフォスのガス発生に使用した、温浴により加熱してバブリングによりガスを発生させる装置を用いガスを発生させた。分解物に関しては、不活性ガスとして窒素を用いてガスを発生させたが、分解物の生成を抑制することができず、実際に使用されている常温 (25°C) においても分解物が生成していることが判明し、これらの分解物は常にフェノブカルブと共存しているものと思われた。ヒトが室内で暴露されるのと同じ条件であることを鑑み、これらの分解物の除去は行わずに混合ガスとして暴露した。フェノブカルブの濃度として、L群は3.5ppbと目標より8%ほど低く、H群は48.5ppbと目標より28%高いが、M群は目標濃度12.0ppbを達成し、用量段階のある濃度で動物に暴露することができた。

フェノブカルブの濃度の測定法は、捕集管法を選択した。この方法は捕集管内のカラムにチャンバー内空気を流し、捕集したフェノブカルブをアセトンで抽出し、これをガスマスペクトルで測定する方法で、「シックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会」が推奨する方法である。暴露濃度が 3.8ppbの極低濃度であり、この方法が最適と考えられた。対照群チャンバー内濃度は、ガスマスの定量下限値の0.04ppb未満、室内濃度は0.07ppbと定量下限値付近の値であり、実験に影響を及ぼすような濃度ではなかった。

2. 7日間連続暴露試験

p-DCB、テトラデカン、CPF及びダイアジノンの1日6時間及び22時間、7日間連続暴露試験は日本バイオアッセイ研究センターに委託し行われた。いずれの試験も、チャンバー内の被験物質濃度は目標濃度をほぼ達成し、動

物にする暴露を実施した。

今後の試験において、室内汚染化学物質として指針値が示されている残り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よう継続して発生法の検討を続けている。

3. 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

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。

本研究は、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する。

国際化学物質安全性カード

<http://www.nihs.go.jp/ICSC/icssj-c/icss0271c.html>

化学物質等安全データシート

<http://www.j-shiyaku.or.jp/home/msds/>

Environmental Health Criteria 131

<http://www.nihs.go.jp/hse/ehc/sum1/ehc131.html>

製品安全データシート
http://www.jaish.gr.jp/anzen_fts/FTS_GHS_DET.aspx?joho_no=631

化学物質の初期リスク評価書
[http://www.safe.nite.go.jp/risk/files/pdf_hyoukasyo/272riskdoc.pdf#search='Bis\(2ethylhexyl\)phthalate'](http://www.safe.nite.go.jp/risk/files/pdf_hyoukasyo/272riskdoc.pdf#search='Bis(2ethylhexyl)phthalate')

JRC EUROPEAN COMMISSION, Institute for Health and Consumer Protection Toxicology and Chemical Substance (TCS), European Chemicals Bureau, I-21027 Ispra (VA) Italy.
[http://ecb.jrc.it/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/dehpsum042.pdf#search='Bis\(2ethylhexyl\)phthalate'](http://ecb.jrc.it/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/dehpsum042.pdf#search='Bis(2ethylhexyl)phthalate')

環境省、平成13年度室内空気調査
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1402/mat/mat03-2.pdf>

環境省、化学物質ファクトシート-2003年度版
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/04/dl/s0419-5el.pdf>

E. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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28日、東京

F. 知的財産権の出願・登録状況
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）
分担研究報告書

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
—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—

研究分担者 慶長直人
国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部 部長

研究協力者 松下育美 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部
土方美奈子 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部

研究要旨

化学物質の吸入曝露は、人体に有害な影響を与える場合があることが知られているが、そのメカニズムは十分に明らかにされていないため、その病態モデル系を確立することは、その対策に重要と考えられる。ヒトの肺は外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、このような状況に、吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が惹起される可能性がある。初年度は、各種ヒト気道上皮細胞株を用いて、細菌性リポ多糖ないし 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 *in vitro* での影響を検討し、最も正常の気道細胞に近いといわれる BEAS2B 細胞株を poly I:C (10 µg/ml) で 24 時間刺激後、ホルムアルデヒド(10 µM) を 3 時間添加することにより、IL-8 mRNA 発現量が有意に増強することを報告した。次年度、逆に、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、ホルムアルデヒド(1-10 µM) 添加 3 時間、その後 poly I:C (10 µg/ml) 12 時間刺激の系で相乗効果が認められた。しかしながら、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》に比べると、《ホルムアルデヒド⇒polyI:C》の系では、必ずしも再現性よく IL-8 の遺伝子発現増強効果あるいは、培養上清中の各種サイトカインの増加が認められなかった。最終年度は、これらの事象の上流にある、IL-8 遺伝子発現のシグナル伝達に関連するタンパクのリン酸化(ERK, p38, JNK)におよぼすホルムアルデヒドの効果について検討した。ホルムアルデヒドでは、JNK のリン酸化が亢進することが遺伝子発現増強に関連する可能性が示唆された。

- A. 研究目的
- | | |
|--|---|
| ヒトの肺は常に、外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、このような状況に、 | 吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が誘発される可能性がある。これまで、文献上、揮発性有毒物質であるホ |
|--|---|

ホルムアルデヒドの曝露により、気道上皮細胞系の炎症応答が増強される可能性が知られている。そこで、初年度は、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いて、ウイルス曝露を念頭に置いた 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 *in vitro* での影響を定量 RT-PCR で検出する系を確立した。また、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン類を、ELISA にて測定した。

一方、逆に、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、ホルムアルデヒドを添加してから、poly I:C 刺激を加える系についてもさまざまな条件検討を行ったが、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の方が、《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の系より、明らかに、インターロイキン 8 (IL-8) の遺伝子発現増強効果が認められた。最終年度は、これらの事象の上流にあるシグナル伝達に関するタンパクのリン酸化について検討を行ない、ホルムアルデヒドが確かに、シグナル伝達分子の活性化に影響を与えることを示した。

B. 研究方法

「刺激物質」

これまでの検討から、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 を刺激物質として選択した。自然免疫系が病原体（特にウイルス）を認識する際のレセプターの agonist として知られている。

「細胞」

これまでの検討から、ヒト気道上皮細胞

株の中で、最も、正常の細胞に近い応答性を維持している安定した株化細胞として、BEAS2B を用い、予備実験を行い、二年目以降、これを主体に検討を行った。

「培養および刺激」

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。

初年度の検討では、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 系により (Multi-Analyte ELISArray Kit : SABiosciences)、培養上清中の 12 種類のサイトカイン (IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1 α, MIP-1 β, IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin, TARK, MDC, GRO α) を同時測定した。

「シグナル伝達分子リン酸化検出のための western blotting」

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一次抗体 (p38MAPK,

ERK1/2 及び JNK) とともに 4℃、一晩振盪した。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)

この 3 年間では、個人に由来するヒト検体を用いておらず、公に入手される細胞株のみを用いている。

C. 研究結果

「モデルとなる細胞株の選択」

ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 及び肺胞上皮様細胞株 A549 を用い、LPS, Poly I:C の刺激下で培養、予備実験を行った結果、A549 に比べ、BEAS2B 細胞で、著しい刺激応答性が観察された。また、シックハウス症候群の主要症状のひとつに、喘息の誘発など気道炎症を疑わせる症状が認められることから、その *in vitro* モデルとして利用できる BEAS2B 細胞を以下の実験で用いた。

「ホルムアルデヒドの濃度と刺激条件の検討」

ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 細胞を用いた。Poly I:C (10 µg/ml) 存在下、24 時間後にホルムアルデヒド (1, 10 µM) 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》の系と、ホルムアルデヒド (1, 10 µM) 添加 3 時間後、ホルムアルデヒド曝露を継続し、Poly I:C (10 µg/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》を並行して検討を加えた。

すなわち、前者では、poly I:C などによる刺激 24 時間後にホルムアルデヒド (1 µM, 10 µM, 100 µM) を添加、3 時間後に細胞を回収、IL-8 の RT/PCR を実施し、濃度依存性を検討したところ、図 1 のごとく、Poly I:C (10 µg/ml) 存在下で、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 (図 1)。

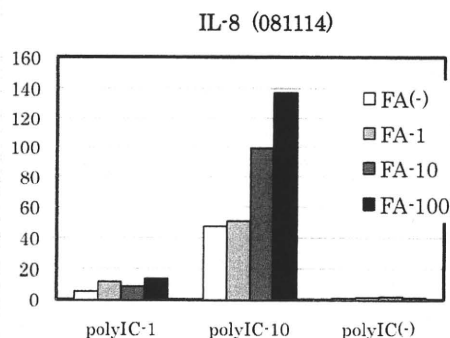


図 1 Poly I:C (1, 10 µg/ml) 存在下、ホルムアルデヒド (1 µM, 10 µM, 100 µM) 添加後、3 時間の IL-8 mRNA の定量的 RT-PCR による測定 (3 回の実験のうち、典型的な例を記載)。

逆に、ホルムアルデヒド (1, 10 µM) 添加 3 時間後、ホルムアルデヒド曝露を継続し、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《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の系では、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系に比較して、必ずしも再現性が良好でなかった。

「長期低濃度曝露」

低濃度で長期曝露した場合、短期高濃度曝露と比較して、より生理的な条件に近いものと思われるため、別の系として検討した。同様な条件の細胞に Poly I:C の刺激を

加えた 24 時間後に、低濃度ホルムアルデヒド (1 μ M, 10 μ M) を添加した培地 70 ml でフラスコ内を満たし、培養を継続し、8, 24 時間後に細胞を回収、RT/PCR による検討を行った。

しかしながら、この条件下では、IL-8, TLR-4 の二つの遺伝子とも、ホルムアルデヒド 10 μ M 以下で、明らかな遺伝子発現の変化は認められなかった。

「上清中のサイトカインの測定」

IL-8 mRNA の増強が認められた培養細胞上清を ELISA にて検討した。BEAS-2B 細胞では、Poly I:C 刺激後 IL-8, RANTES, MIP-1 α , IP-10, , GRO α の顕著な発現亢進が認められたが、このホルムアルデヒド短時間刺激条件下では、さらなる顕著なサイトカインの濃度差は生じなかった。

すなわち、上清中 IL-8 濃度の上昇は、軽度みられるが、再現性に乏しく、それ以外のサイトカイン、ケモカインについても、必ずしも傾向が一定しなかった。

「シグナル伝達分子のリン酸化」

IL-8 の遺伝子発現へ至る細胞内シグナル伝達分子への影響を見る目的で、p38MAPK, ERK1/2, JNK のリン酸化を 0, 15, 30, 60, 120 分まで Western blotting を用いて、poly I:C 刺激による各タンパクリン酸化を確認したところ、JNK のリン酸化が、いずれの条件下でも、ホルムアルデヒド添加により、亢進する傾向が認められた (図 2)。

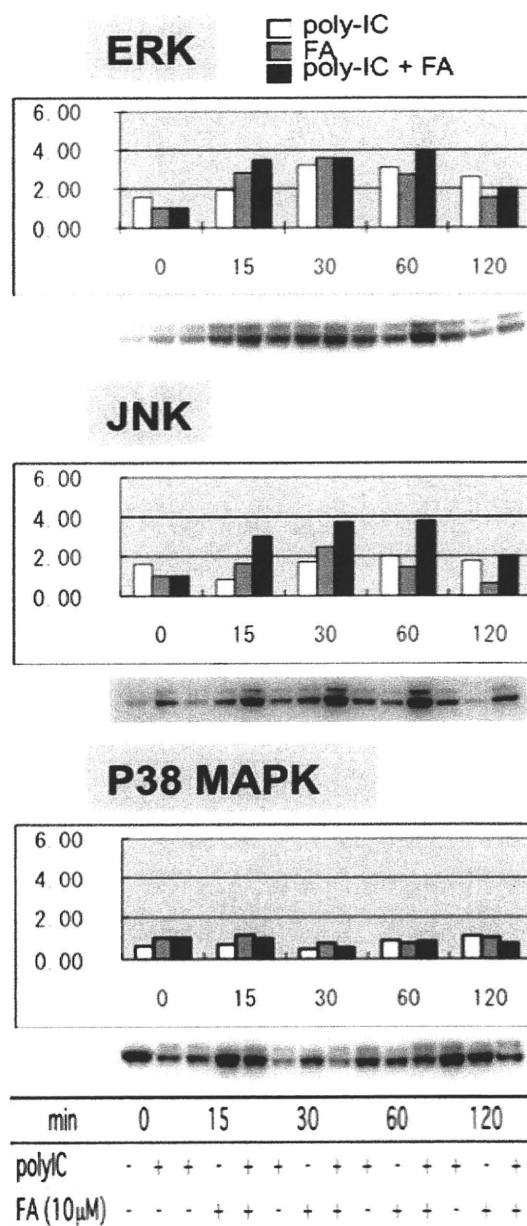


図 2 気道上皮細胞刺激時のシグナル伝達におけるホルムアルデヒドの増強効果の検討

《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系にて、ホルムアルデヒド (10 μ M) 添加後、0 分から 120 分まで、ERK, JNK, P38MAPK のリン酸化を western blotting により検出。グラフは 0 分を 1 としたときの相対値。poly I:C 単独に比べて、poly I:C+ホルムアルデヒド (15 分から 60 分) で、JNK のリン酸化の亢進が認められた。

D. 考察

経気道曝露モデルに対応した化学物質によるヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響について長期的には、

1. 培養ヒト気道上皮細胞に対する毒性化学物質の曝露系を確立する。

2. 毒性化学物質によるヒト気道上皮細胞を用いた遺伝子発現応答様式を解析して、吸入曝露モデルにより得られた遺伝子発現様式と比較検討する。

3. 遺伝子発現応答様式の対比から、ヒト気道上皮を用いた化学物質の最適な毒性評価系を明らかにする。

を目標に掲げている。

初年度、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 BEAS-2B 株により、確認したが、特に 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《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》、IL-8 mRNA 発現が誘導されることを確認した。次年度、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を検討し《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》、実験を繰り返したが、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るものと思われた。サイトカイン、ケモカイン濃度の測定の再現性の乏しさも同様の問題に起因するものと推測された。

動物吸入曝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、《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の方がより、生理的な系と思われるが、上記の点から、この系の再現性が困難であったため、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系を用いて、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、ホルムアルデヒドは、JNK のリン酸化を亢進して、遺伝子発現増強に関連する可能性が示唆された。直接 JNK が関与しているか否かについては、今後、阻害剤による検討などを計画している。

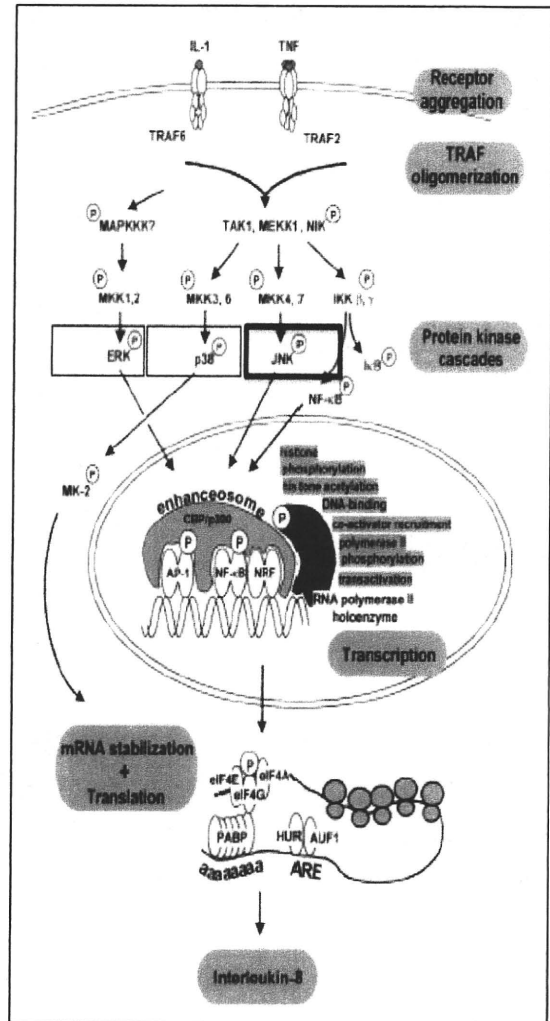


図3 IL-8 発現に関わるシグナル伝達経路 ERK, p38, JNK がそれぞれ関与する系が認められる (Hoffmann E, et al. J Leukoc Biol. 2002;72(5):847-55.)

E. 結論

ホルムアルデヒド曝露に、poly I:C を刺激したことによる、ヒト気道上皮細胞にお

ける炎症応答の相乗効果を、種々の条件下で検討した結果、ヒト気道上皮細胞株では、ホルムアルデヒドによるケモカインの遺伝子発現増強効果が認められた。《ホルムアルデヒド⇒polyI:C》の系では、非特異的遺伝子発現抑制効果と《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》で見られた遺伝子発現増強効果が複合しており、結果を複雑にしているものと思われた。

これらのホルムアルデヒドによる炎症性遺伝子発現増強効果については、シグナル伝達分子のリン酸化の検討により、JNK を介した系が関与して可能性が推測される。

今後、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》で見られた遺伝子発現増強効果について、さらに検討を進め、ホルムアルデヒド以外の化学物質の効果、IL-8 以外の遺伝子発現の変化についての網羅的解析、動物モデルとの対比などが課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

Shojima J, Tanaka G, Keicho N, et al.
Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection.
J Infect Dis 199 (11): 1707-1715, 2009.

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 candidate regions on chromosome 5q31 for tuberculosis. Genes Immun 11: 416-22, 2010.

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曝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.

G. 知的財産権の出願・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

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告

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

研究分担者 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长

研究要旨

本分担研究では、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る肺及び肝に於ける遺伝子発現変化を解析し、経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に寄与する知見を得ることを目的としている。平成20年度は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）、平成21年度はクロルピリフォス（指針値：0.07ppb、暴露目標値：0.07、0.20、0.70ppb）及び、平成22年度はダイアジノン（指針値0.02ppb、暴露目標値0.02、0.07および0.2ppb）の経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）をおこない、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22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）を検討し、マウス肺及び肝の網羅的遺伝子発現データを解析した。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、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドを除く被験物質の暴露時に認められた。Cyr61分子が変異或いは欠損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。

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。

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、ホルムアルデヒド、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お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。本分担研究では、先行研究の成果を踏まえ、上記13物質の内、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及びデータベース構築を推進する。平成20年度は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）、平成21年度はクロルピリフォス（指針値：0.07 ppb、暴露目標値：0.07、0.20、0.70 ppb）及び、平成22年度はダイアジノン（指針値0.02 ppb、

暴露目標値0.02、0.07および0.2 ppb）の経気道暴露（4用量、16群構成、各群3匹）をおこない、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）（＝労働暴露モデル）と22時間/日×7日間暴露（22、70、166、190時間後）（＝生活暴露モデル）を検討し、マウス肺及び肝の網羅的遺伝子発現データを解析した。

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晚浸漬し、RNase を不活化する。肝は 5mm 径の生検トレパンにより 3ヶ所を各々別チューブに採取した。肺は気管から RNA later を注入し、RNase の不活化を促した後、採取した。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが

付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

C. 研究結果及び考察

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) についてデータ解析を進めた。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)) に、経気道暴露 (4 用量にて、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) させた際の肺と肝を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。パラジクロルベンゼンの指針値は 0.04ppm で、暴露目標値は 0.04、0.12、0.40ppm、テトラデカンの指針値は 0.04ppm、暴露目標値は 0.04、0.12、0.40ppm、クロルピリフォスの指針値は 0.07ppb、暴露目標値は 0.07、0.20、0.70ppb 及び、ダイアジノンの指針値は 0.02ppb、暴露目標値 0.02、0.07 および 0.2ppb である。ダイアジノンの 2 時間単回暴露実験、及びフェノブカルブの 2 時間単回暴露実験、6 時間/日×7 日間暴露及び、22 時間/日×7 日間暴露については現在計画中であるが今後検討予定である。得られた肺及び肝について、我々が開発した 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 マイクロアレイはアフィメトリクス社の 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 を生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。また、シグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

以下、各被験物質について解析結果の概要を記載する。

C-1: パラジクロルベンゼン極低濃度経気道

暴露時の遺伝子発現変動解析：

22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変動が、肝ではミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現変動が認められた。前者は酸化ストレス応答、後者はミトコンドリアの脱共役作用の結果、細胞内 ATP の減少や酸化ストレスが引き起される可能性が示唆された。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ストレス応答遺伝子の発現誘導が、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。

C-2: テトラデカン極低濃度経気道暴露時の遺伝子発現変動解析：

いずれの暴露プロトコルに於いても、現時点では肺及び肝障害と関連する遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。肝では、反復暴露により発現誘導が減弱する遺伝子がいくつか(Adk:adenosine kinase, Arf6:ADP-ribosylation factor 6等)認められた。

C-3: クロルピリフォス極低濃度経気道暴露時の遺伝子発現変動解析：

6時間/日×7日間暴露時、肺では炎症に関与する遺伝子(Cxcr4、IL1 β 遺伝子)の発現増加が認められたが、肝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。

22時間/日×7日間暴露時、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かった。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(cysteine rich protein 61)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、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(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、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。

肝ではミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現変動がミトコンドリアの脱共役作用の結果、細胞内 ATP の減少や酸化ストレスが引き起される可能性が示唆された。

C-4: 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：

6時間暴露時では肺及び肝共に、リンパ球やマクロファージが関与する炎症に関わるオーファン受容体Nr4a1遺伝子や様々なCD分子等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かった。平成21年度検討した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ため、ダイアジノン暴露時での発現を検討したところ、クロルピリフォス暴露時同様、Cyr61 遺伝子の発現誘導が、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。

C-5: 先行 3 年間研究ならびに本研究の解析結果から明らかとなった事:

本吸入トキシコゲノミクス研究では、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる、ホルムアルデヒド、トルエンなどの 13 物質の内、気化できなかったフタル酸ジ-n-ブチル及びフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの 2 物質を除き、全ての物質について、室内指針値レベルという極低用量での吸入暴露実験を検討し、肺、肝の遺伝子発現変動解析を検討した。その結果、以下の事が明らかとなった。

- 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付けら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。

上記 1) の典型例として、パラジクロルベンゼンの 22 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変動が

顕著であるのに対し、肝ではミトコンドリア電子伝達系の遺伝子の発現変動が顕著であること、が挙げられる。

上記 2) の典型例として、反復暴露により弱くなる場合では、キシレン暴露での肺における Hmox1 遺伝子及びテトラデカン暴露での肝における Arf6 遺伝子等が挙げられ、他方強くなる場合では、パラジクロルベンゼン暴露での肺における Gpx2、Aox1 遺伝子等が挙げられる。

上記 3) の典型例は、ホルムアルデヒドの吸入暴露により、肺よりも肝において発現増加する Mod1 遺伝子等が挙げられる。

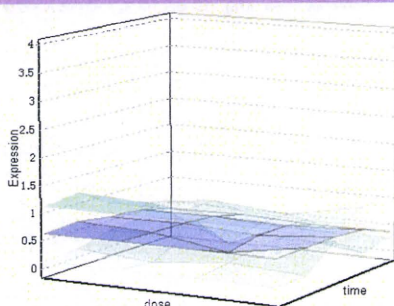
上記 4) のカテゴリーのうち、肺防御系に関わる候補分子として、C-3、C-4 部においても記載した Cyr61 遺伝子が挙げられる。Cyr61 遺伝子の発現は、トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカン、パラジクロルベンゼン、クロルピロフォス、ダイアジノンの長時間・反復暴露(22 時間/日×7 日間暴露)により強く誘導される傾向にあった。他方、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドではこの傾向を示さなかった。このうち、クロルピロフォス暴露時の Cyr61 遺伝子の発現変動を図 1 に示す。

図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。具体的には、縦軸(Z 軸)に絶対値化した(細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準

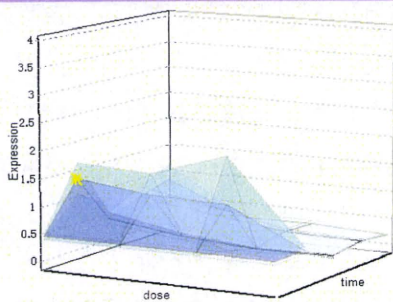
偏差(SD)平面(薄い色)を示す。



A: 2時間単回暴露



B: 6時間/日×7日間暴露



C: 22時間/日×7日間暴露

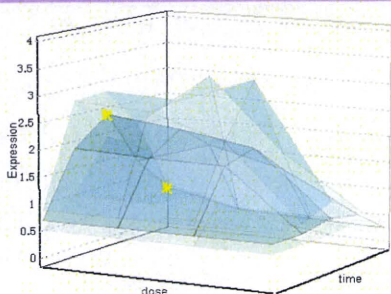


図1 クロルピリフォス極低用量吸入暴露時の肺における Cyr61 (cysteine rich protein 61)の遺伝子発現変動

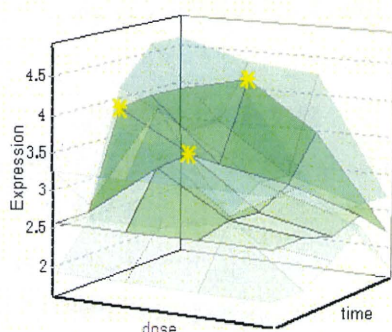
クロルピリフォスを極低用量(0, 0.07, 0.20, 0.70ppb)下で吸入暴露した。A: 2時間単回暴露(2, 4, 8, 24時間後)、B: 6時間/日×7日間暴露(6, 22, 70, 166時間後)及びC: 22時間/日×7日間暴露(22, 70, 166, 190時間後)。溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に★を付した。

上記 4) のカテゴリーのうち、ストレス応答系は、酸化的ストレス関連遺伝子及び、サイトカイン・ケモカイン等炎症に関係する遺伝子であり、前者の典型例は、キシレンあるいはパラジクロルベンゼン暴露の際の肺における発現プロファイルであり、後者の典型例は、クロルピリフォスあるいはダイアジノン(いずれも有機リン系殺虫剤)の肺における発現プロファイルであった。

上記 4) のカテゴリーのうち、遺伝子欠失マウスの情報に裏付けられた肺機能に関係するものの典型例は、ホルムアルデヒドの7日間暴露により肺において発現誘導が認められた Thbs1 [thrombospondin 1] 遺伝子が挙げられる。この遺伝子の遺伝子欠失マウスは4週齢より、好中球やマクロファージの浸潤を伴う急性の器質化肺炎が生じ死亡することが報告されている(Lawler J et al, J Clin Invest 101: 982-992, 1998)。したがって、Thbs1 は肺の形成・維持に必須の分子と考えられる。

上記 4) のカテゴリーのうち、該日リズム系の典型例は、ホルムアルデヒド[0.03, 0.10, 0.30ppm]の22時間/日×7日間暴露により、肺・肝両方において発現増加する Dbp、Nr1d2(Rev-erb-beta)及びNr1d1 遺伝子、また発現減少する Per1 及び Arntl(Bmal1)が挙げられる。Nr1d2 についての発現変動を図 2 に示す。

A: 肺



B: 肝

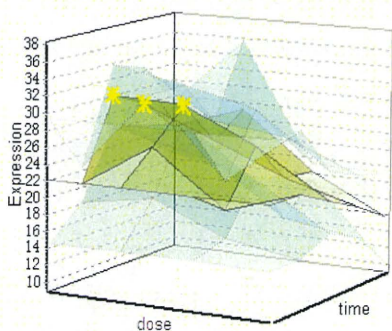


図 2 ホルムアルデヒド極低用量吸入暴露時の肺(A)及び肝(B)における Nr1d2 の遺伝子発現変動

マウスにホルムアルデヒドを極低用量(0, 0.03, 0.10, 0.30ppm)下で 22 時間/日×7 日間吸入暴露した。溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこないP 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に★を付した。

このことは、ホルムアルデヒドの低用量の吸入暴露により、生体の概日リズムが乱れる可能性を示唆している。ま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する。

D. 結論

本分担研究では、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る肺及び肝に於ける遺伝子発現変化を解析し、経気道暴露による毒性評価手法の開発、高度化に寄与する知見を得ることを目的としている。平成 20 年度は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)、平成 21 年度はクロルピリフォス(指針値:0.07ppb、暴露目標値:0.07、0.20、0.70ppb)及び、平成 22 年度はダイアジノン(指針値 0.02ppb、暴露目標値 0.02、0.07 および 0.2ppb)の経気道暴露(4 用量、16 群構成、

各群 3 匹)をおこない、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) (= 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) を検討し、マウス肺及び肝の網羅的遺伝子発現データを解析した。

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、長時間反復暴露時に強く誘導される現象は、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドを除く被験物質の暴露時に認められた。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、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(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、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。

他方、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、該日リズムに関係す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。

このように、シックハウス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、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。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、in situ hybridization (ISH)

等により高精度に解析する必要があるもの
と考える。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
のと考える。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。

E. 研究発表

1. 書籍等

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、
中津則之、高木篤也、種村健太郎、小川幸
男、児玉幸夫、関田清司、Percellome
Project、遺伝子医学MOOK10、DNA チップ/
マイクロアレイ臨床応用の実際、油谷浩幸
編集、株式会社メディカルドウ、p363-371、
2008年6月30日

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐
勝秀、小川幸男、関田清司、トキシコ
ゲノミクスの大規模高精度データベー
スの構築と解析、非臨床試験ーガイド
ラインへの対応と新しい試みー 野村
護、堀井郁夫、吉田武美 編集、株式会
社エル・アイ・シー、p561-568、2008
年9月30日

2. 論文発表

Saegusa Y, Woo GH, Fujimoto H, Inoue
K, Takahashi M, Hirose M, Igarashi K,
Kanno J, Mitsumori K, Nishikawa A,
Shibutani M., Gene Expression
Profiling and Cellular Distribution
of Molecules with Altered Expression
in the Hippocampal CA1 Region after
Developmental Exposure to
Anti-Thyroid Agents in Rats. J Vet
Med Sci. 2010 Feb;72(2):187-95

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki KI,
Kanno J, Saga Y., NANOS2 interacts
with the CCR4-NOT deadenylation
complex and leads to suppression of
specific RNAs., Proc Natl Acad Sci U
S A. 2010 23;107(8):3594-9.

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
1alpha (MIP1alpha) 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

Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R,
Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe
K, Niikura K, Takeshima H, Ando T,
Igarashi K, Kanno J, Ushijima T,

Suzuki T, Narita M., Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus*. 2010 Mar 15. [Epub ahead of print]

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.

Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Sasaki T, Niikura K, Narita M, Miyashita K, Imai S, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T, Suzuki T, Narita M., Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging., *Synapse*. 2010 Aug;64(8):611-6.

Ikegami D, Narita M, Imai S, Miyashita K, Tamura R, Narita M, Takagi S, Yokomizo A, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Kuzumaki N, Ushijima T, Suzuki T., Epigenetic modulation at the CCR2 gene correlates with the maintenance of behavioral sensitization to methamphetamine., *Addict Biol*. 2010

Jul;15(3):358-61.

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*. 2010 Dec 1. [Epub ahead of print]

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.

Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments.

Environmetrics 2009; 20:1-13.

3. 学会発表

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Hirotugu 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

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 (2010. 6. 16) (沖縄)、口演

北嶋 聡、菅野 純、Percellome 発生トキシコゲノミクスの進捗、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会 (2010. 6. 16) (沖縄)、口演

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、松上 稔子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析-幼若期雄マウスへのイボテン酸投与による脳高次機能障害について-、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会 (2010. 6. 18) (沖縄)、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome トキシコゲノミクスの抗がん剤研究への応用、第 69 回日本癌学会学術総会 (2010. 9. 24) (大阪) 口演

Natalia Polouliakh, Jun Kanno, Yukiko Matsuoka, Ken-Ichi Aisaki, Richard Nock, Frank Nielsen, Keigo Oka, Satoshi Kitajima and Hiroaki Kitano, Discovery of Gene Network Regulated by the Toxicity Equivalent Factor of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF) chemicals. the 11th International Conference on System Biology (2010. 10. 11) (Edinburgh, UK), Poster

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