

201133019A

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を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、
及び中枢神経影響を包含する新評価体系の開発—

(H23-化学-一般-001)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 24(2012)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を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、
及び中枢神経影響を包含する新評価体系の開発—

(H23-化学-一般-001)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 24(2012)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を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、
及び中枢神経影響を包含する新評価体系の開発—

(H23-化学-一般-001)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 24 (2012) 年 3 月

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 ーシックハウス症候群を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、及び 中枢神経影響を包含する新評価体系の開発ー	
	北嶋 聡	・・・・・・ 1
II.	分担研究報告書	
1.	シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露実験の実施	
	北嶋 聡	・・・・・・ 17
2.	人への外挿にかかわる臨床的解析、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ー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ー	
	慶長 直人	・・・・・・ 97
3.	吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、 インフォマティクス解析	
	菅野 純	・・・・・・ 103
4.	化学物質の極低濃度下での長期暴露による毒性確認に関する研究	
	大西 誠	・・・・・・ 189
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・ 201
IV.	研究成果の刊行物・別刷	・・・・・・ 203

I . 総括研究報告

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を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、及び
中枢神経影響を包含する新評価体系の開発—

研究代表者 北嶋 聡

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

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群の指針濃度をはるかに超える高濃度であることから、動物試験からの毒性情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。この点に対し先行研究では、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質について指針値レベルでの吸入毒性試験（1～7 日間）を実施し、遺伝子発現変動を肺及び肝について網羅的に観測し、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響が高感度に捕捉された。この成果を踏まえ本研究の目的は、第一に、極低濃度下での比較的長期暴露（7～28 日間）後の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データの予見性を確認することにある。第二に、シックハウス症候群等において通常の検査からは病因が特定されない「不定愁訴」の分子実態を把握することにある。

本研究では、シックハウス問題に関する検討会が掲げるホルマリンを含む 13 物質を対象に、先行研究にて確立した極低濃度下の吸入暴露条件、及び肺と肝における遺伝子発現経時データベースを基に、長期間の吸入暴露後の電子顕微鏡による高精度な形態観察を行うとともに、肺・肝に加えて脳を対象臓器として、網羅的遺伝子発現プロファイルを取得し、多臓器連関の解析及びデータベース化を行う。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。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。シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露実験の実施と研究の総括（北嶋）、人への外挿にかかわる臨床的解析、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）、吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、インフォマティクス解析（菅野）、化学物質の極低濃度下での長期暴露による毒性確認に関する研究（大西）。

今年度（平成 23 年度）北嶋は、ホルムアルデヒド（指針値: 0.08 ppm）について極低濃度下（0、0.1、0.3 及び 1.0 ppm）での経気道暴露を、第一の目的に向けて、22 時間/日 x 28 日間反復暴露のプロトコール、また第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である 6 時間/日 x 7 日間反復暴露（＝労働暴露モデル）と 22 時間/日 x 7 日間反復暴露（＝生活暴露モデル）の 2 種類のプロトコールにより、ホルムアルデヒド液を

バブリングし気化させる方法により実施した。その結果、いずれのプロトコールにおいても、目標暴露濃度に近似した値にて、ホルムアルデヒドをマウスに安定して経気道暴露する事が出来た。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、ホルムアルデヒドにつき 6 時間/日×7 日間反復（6、22、70 及び 166 時間後に観測）、及び 22 時間/日×7 日間反復（22、70、166 及び 190 時間後に観測）経気道暴露の際のマウス脳・肺・肝の mRNA につき遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果、6 時間反復暴露時では顕著に認められないが、22 時間/日 x7 日間反復暴露の際の海馬において、暴露期間中、神経活動の指標となる初期応答遺伝子（Immediate early gene: IEG）（Arc、Nr4a1、Fos、Junb 及び Egr4 遺伝子等）の発現が強く抑制されたことから、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。この抑制により、記憶をはじめとする情動認知行動異常が誘発される可能性が高く、この事がシックハウス症候群で認められる不定愁訴と関係している可能性が考えられ、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。解析の精度向上と効率化のために、(株) NTT データにマイクロアレイデータ解析技術開発研究を業務委託した。大西は、透過型電子顕微鏡を用い、網羅的に超微細形態学的検索ができる独自の手法の予備検討をおこない、この手法を用いて、ホルムアルデヒドを 22 時間/日 x28 日間反復経気道暴露後のマウス肺について超微細形態学的検索を実施した。予備検討に手間取り検索に時間を要したが、すでに検索をすすめており、平成 24 年度前半をめぐり解析を終了する。慶長は、最も正常の気道細胞に近いといわれるヒト気道上皮細胞株（BEAS2B 細胞）を用いる *in vitro* 解析系により、先行研究で見いだした微生物関連物質（polyI:C）とホルムアルデヒドとの IL-8 遺伝子の発現増強作用について、各種リン酸化酵素阻害剤を用い、この発現増強過程に JNK 分子を介するシグナルが関与することを見いだした。この事はこの *in vitro* 解析系が、人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考えられる。

以上のごとく、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、脳サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により化学物質の経気道暴露によって生じる中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。また 22 時間反復暴露の際、海馬での神経活動の抑制が示唆された事は「不定愁訴」の分子実態の一端を明らかにしたものと考えられる。加えて、ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の解析系にて、微生物関連物質（polyI:C）とホルムアルデヒドとの複合影響の分子機序の一端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。本研究の成果を通して、近年の技術革新の加速に伴い急増する「新規物質」の吸入毒性評価に際し中枢影響を含むかたちで、極低濃度での有害性を見逃しなく検出できるようになることが期待される。

研究分担者

北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長
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
毒性部 部長
大西 誠 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 試験管理部 室長

A. 研究目的

日常生活で暴露される様々な化学物質の毒性評価は、実験動物における毒性所見を人に外挿することで実施されている。しかし、気化性化学物質の経気道暴露による毒性については、シックハウス症候群の如く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甚だしく、現行の吸入毒性試験での毒性指標（器質的障害）を、人へ外挿することには大きな困難が伴う事例が指摘されてきた。この問題に対し、先行研究（厚生労働省・化学物質リスク研究事業）では、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げるホルマリンを含む 13 の気化性物質について指針値レベルの極低濃度での吸入毒性試験（1～7 日間）を実施し、遺伝子発現変動を肺及び肝について網羅的に観測した結果、指針値レベルにおいて肺及び肝に有意な遺伝子発現変動が高感度に検出され、反応した遺伝子は、1) Cyr61 をはじめとする肺防御系に関わる毒性標的候補、2) 酸化ストレス等のストレス応答系、3) 当該遺伝子の欠失マウスが肺炎等により死亡するといった肺機能に深く関わるもの、及び 4) 概日リズムに関わるものであった。これらは、毒性の基礎と考えられる病態の惹起或いは生体防御

の発動を高感度に確実に捉えているものと考えられた。動物実験から人へ外挿が困難という課題が、本トキシコゲノミクス手法により克服されることが明らかとなった。

この成果を踏まえ本研究の目的は、第一に、極低濃度下での比較的長期暴露（7～28 日間）後の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データの予見性を確認することにある。第二に、シックハウス症候群等において通常の検査からは病因が特定されない「不定愁訴」の分子実態を把握することにある。この為に、肺・肝に加え中枢神経のトキシコゲノミクス解析を実施し、惹起される反応を抽出し、超微形態解析等の標的の絞り込みを行う。さらに、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。

本研究により、先行研究「シックハウス症候群レベルの暴露を考慮した吸入毒性評価系に関する研究」では検討の対象外とした比較的長期の暴露時の形質変化を観測する事が期待される。すなわち、1) 暴露期間が短い（1～7 日間）際の肺及び肝に発現が誘導された遺伝子と、比較的長期暴露による形質変化の関係から、有害性が形態学的に実証されること、2) 中枢神経系での遺伝子発現変動を検討することにより、人のシックハウス症候群において中心的な位置を占める「不定愁訴」の実態を把握・評価し得ること、である。上記 1) については、より長く暴露し、超微形態学的検索を含む高精度な観察により実証できるものとする。2) については、「不定愁訴」の本態解明に向け、肺・肝に加え中枢神経のトキシコゲノミクス解析を実施し、先行研究での評価系を、中枢影響評価と多臓器連関を包含するかたちに発展させることとし

た。本研究では特に後者の「不定愁訴」あるいは「脳機能所見」について、規制決定の際の毒性情報として採用可能なものとするためのバリデーションに耐える評価系を提案する。これらの事項を通して、近年の技術革新の加速に伴い急増する「新規物質」の吸入毒性評価に際し中枢影響を含むかたちで、極低濃度での有害性を見逃しなく検出できるようになることが期待される。

B. 研究方法

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 物質を主対象に、雄性マウスに極低濃度経気道暴露を、第一の目的に向けて、22 時間/日 x 28 日間反復暴露のプロトコル、また第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である 6 時間/日 x 7 日間反復暴露 (= 労働暴露モデル) と 22 時間/日 x 7 日間反復暴露 (= 生活暴露モデル) の 2 種類のプロトコルにより実施する。22 時間/日 x 28 日間反復暴露時の肺については、透過型電子顕微鏡を用い、網羅的に超微細形態学的検索を実施する。6 時間/日 x 7 日間反復暴露及び 22 時間/日 x 7 日間反復暴露の際の、肺、肝、海馬を含む脳 4 部位の組織について網羅的遺伝子発現プロファイルを取得、解析をおこないデータベース化する。加えて、ヒト気道上皮細胞系を用いた *in vitro* 解析系にて毒性応答メカニズムを検索し、あわせてヒトへの外挿性の向上を計る。

今年度 (平成 23 年度) は、ホルムアルデヒドを対象とし、室内濃度指針値 (0.08 ppm) 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 : シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露実験の実施

今年度は、ホルムアルデヒド (指針値: 0.08 ppm) を対象とした極低濃度下 (0、0.1、0.3 及び 1.0 ppm) での経気道暴露を、雄性 C57BL/6J マウス (12 週齢、日本チャールス・リバー) に、22 時間/日 x 28 日間反復暴露 (4 用量、4 群構成、各群 6 匹)、及び 6 時間/日 x 7 日間反復暴露と 22 時間/日 x 7 日間反復暴露 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) の計 3 種類のプロトコルにて実施した。

被験物質をホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量: 30.03、CAS No.: 50-00-0) とし、試薬としてホルムアルデヒド液 (カタログ番号: 064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度 37.3% [メタノール 7.4% 含有、ギ酸含量 0.04% 以下]、和光純薬工業) を使用した。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 0.08 ppm であることから、これを参照し、公比 $\sqrt{10}$ で 0.1、0.3 及び 1.0 ppm を目標値とした。ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ホルムアルデヒド水溶液をバブリングし気化させる方法によりおこなった。濃度検知は、捕集管 (LpDNPH H30、カタログ番号: 505323、スペルコ社) を用いる方法で測定した。

B-2 : 吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、インフォマティクス解析

今年度は、ホルムアルデヒド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、6 時間/日 x 7 日間暴露 (6、22、70 及び 166 時間後) と 22 時間/日 x 7 日間暴露 (22、70、166 及び 190 時間後) (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) を検討し、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、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、0、0.1、0.3及び1.0 ppmである。肺における解析及び6時間/日×7日間反復暴露の際の肝における解析に関しては、サンプリングをすでに終了しており、今後できるだけ速やかに、網羅的に遺伝子発現変動解析を検討する。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、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*検定によりおこない、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-3：化学物質の極低濃度下での長期暴露による毒性確認に関する研究

本年度は、被験物質をホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量：30.03、CAS No.：50-00-0) とし、試薬としてホルムアルデヒド液（カタログ番号：064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度 37.3% [メタノール 7.4%含有、ギ酸含量 0.04%以下]、和光純薬工業）を使用した。雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）に1群8匹、4用量（0、0.1、0.3及び1.0 ppm）にて

（暴露開始時 8 週齢）、22 時間/日×28 日間反復全身吸入暴露（午後 0 時から翌日 10 時まで暴露）を実施し、その際の肺について、電子顕微鏡を用いた高精度な解析を検討した。解剖は、暴露 28 日目の 10 時 30 分より開始し、1 匹あたり 5 分間でサンプリングをおこなった。

マウスは、吸入暴露用のステンレス製金網ケージにて個別飼育し、室温 24±1℃、湿度 55±5%、12 時間点灯（8:00～20:00）の環境下で、固形飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業）と水道水（フィルターろ過した後、紫外線照射）を自由に摂取させて吸入暴露を実施した。一般状態の観察は毎日行い、体重及び摂餌量を、馴化期間（2 週間）中は週 1 回、暴露期間中は週 2 回、測定した。マウスの解剖に際しては、ネンブタール（製品名：ソムノペンチル、製造元：共立製薬株式会社）の 15 倍希釈液（生理食塩水、用事調整）を 10 ml/kg の投与容量にて腹腔内投与することによる麻酔下で、腋窩動・静脈の切断により放血致死させた。

採取臓器は、肺、肝、腎、脾、脳、心及び胸腺とし、肝、腎、脾、脳及び心について重量を測定した。病理組織学検索用に採取した肝、腎、脾、脳、心及び胸腺は、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン包埋後薄切により得た標本について、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、形態学的変化を光学顕微鏡により検査した。

肺については、TEM による超微細形態学的検索に向け、気管の断端から左右の肺内に 2%パラホルムアルデヒドにグルタルアルデヒドを 0.5%添加した固定液を注入し、生理的に肺が拡張した時と同様になる状態で固定した。左肺と右肺を肺門部で気管支から切り離し、左肺と右肺を上述の固

定液に浸漬した。肺胞内に残存した気泡による固定不良を避けるため、肺に残存した気泡を真空デシケータで脱気処理を行った後、さらに1週間の浸漬固定をおこなった。

TEMによる超微細形態学的検索には、グルタルアルデヒド添加パラホルムアルデヒドで固定した左肺を主気管支の走行に沿った図1①の位置で0.8mm幅の肺の全切断サンプルを切り出し、脱水、オスミウム固定の後、エポキシ樹脂に包埋した。試料を包埋したエポキシ樹脂ブロックから肺全切断面のセミシン切片(厚さ1 μ m)を作製してスライドガラスに貼付、トルイジンブルー染色を施して肺内気管支、肺胞管、肺胞までを連続して気道系を追うことができる試料を作製した。この切片を鏡検して電顕検索部位の絞り込みを行い、電顕検索の標的とする部分をスライドガラスから剥がし取ってエポキシ樹脂に再包埋する。この樹脂包埋試料からウルトラマイクロームで厚さ100nmの超薄切片を作製してTEM観察に供する。

また、光顕用スクリーニングサンプルとして図1②の位置で2mm幅の肺の全切断サンプルを切り出し、常法に従ってパラフィン包埋ブロックを作製、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。このヘマトキシリン・エオジン染色標本は、TEM試料作製するにあたって試料の固定状態の良否等の判断材料としたほか、病理組織学的検索をおこなって電顕検索の参考に供する。肺関連リンパ節については、左肺とともに病理組織学的検索とTEM検索を連携させた検索を行う。左肺の残余と右肺は、追加検索に備えてリン酸緩衝中性ホルマリン固定液中に浸漬した状態で保存した。

統計処理については、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た。

B-4:人への外挿にかかわる臨床的解析、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、微生物関連物質(polyI:C)存在下、ホルムアルデヒドによるIL-8 mRNA発現増強効果の分子機序に迫るため、IL-8遺伝子発現に関わるとされるp38MAPK、ERK1/2及びJNKの3つの主要なシグナル伝達系に対する各種リン酸化阻害剤の効果を検討した。

「刺激物質」は、外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、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として知られる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 \times 10⁵ cells/flask)、90% confluentで、Poly I:C (10 μ g/ml)存在下、24時間後にホルムアルデヒド(10 μ M)を添加3時間後に細胞を回収した。「遺伝子発現解析のRT-PCR」では、細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCRを実施した。発現遺伝子IL-8、RANTESなどのmRNA発現レベルを測定した。

「シグナル伝達分子リン酸化検出のためのwestern blotting」は、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 μ g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二次抗体 (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。「IL-8遺伝子シグナル伝達系に関する阻害剤の添加実験」に際しては、BEAS2B細胞株を培養、Poly I:C (10 μg/ml)存在下、24時間刺激後に、シグナル伝達分子p38MAPK、ERK1/2 及びJNK各々の阻害剤SB203580、U0126及びSP600125(各10 μM)を添加して1時間プレインキュベートした。その後、ホルムアルデヒド (10 μM)を加え、一定時間後(リン酸化検出用には、0、15、30min後、mRNA発現は3時間後)に細胞を回収し、解析した。

(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の配慮を十分行い、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: シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露実験の実施

今年度は、ホルムアルデヒド (指針値: 0.08 ppm) を対象とした極低濃度下 (0、0.1、0.3及び1.0 ppm) での経気道暴露を、雄性C57BL/6Jマウスに、22時間/日×28

日間反復暴露、6時間/日×7日間反復暴露及び22時間/日×7日間反復暴露の計3種類のプロトコールにて実施した。

C-1-1: 6時間/日×7日間反復及び22時間/日×7日間反復実験の場合

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

先行研究で開発されたホルムアルデヒドのガス発生・暴露条件を参考とし、目標吸入暴露濃度である0.1、0.3および1.0 ppmに濃度の制御に向けて、ホルムアルデヒド蒸気の発生装置へ送るバブリングのための発生空気とキャリアー空気の流量、恒温槽の温度の設定条件を決定するために、設定条件を修正しながら試運転を行った。一次希釈空気の流量は20 L/分とした。また、一次希釈したホルムアルデヒド蒸気の各濃度の吸入チャンバーへの供給量は、目標濃度の比に合わせ、0.1 ppm暴露群が1.7 L/分、0.3 ppm暴露群が5.2 L/分、1.0 ppm暴露群が17 L/分とした。吸入チャンバーへの新鮮空気の供給量は、換気回数が15-17回/時を確保できるように各吸入チャンバーとも212 L/分とした。発生空気の流量を0.50 L/分、キャリアー空気の流量を0.50 L/分、恒温槽の温度を5℃、ホルムアルデヒド蒸気の再加熱温度を25℃とし、動物をチャンバー内に挿入し暴露運転を行った。また、吸入チャンバー内のホルムアルデヒドの濃度測定に向けて、目標吸入暴露濃度0.1、0.3および1.0 ppmで、6時間および22時間の暴露を行い、被験物質の捕集方法および捕集管の前処理及び分析条件を検討した。なお、捕集管への採気時間は、暴露全時間にわたる6時間

または22時間とした。各濃度とも6時間および22時間採気の両者で捕集管2本目へのホルムアルデヒドの移行は認められず、破過はなかった。

以上の予備検討の結果を踏まえ、6時間の暴露運転では、目標吸入暴露濃度0.1、0.3及び1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値（以下、平均値±標準偏差）はそれぞれ、0.102±0.005（0.098～0.112 ppm）（目標濃度に対し102%）、0.308±0.024（0.266～0.344 ppm）（目標濃度に対し103%）及び1.060±0.061（1.007～1.173 ppm）（目標濃度に対し106%）となり、他方22時間の運転の場合では、目標吸入暴露濃度0.1、0.3および1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値はそれぞれ、0.101±0.003（0.096～0.104 ppm）（目標濃度に対し101%）、0.301±0.021（0.278～0.330 ppm）（目標濃度に対し100%）および1.028±0.050（0.973～1.120 ppm）（目標濃度に対し103%）になり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた。従って、冷却バブリング法によって、ホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08 ppmを考慮した0.1、0.3および1.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できたものとする。

C-1-2: 22時間/日 x 28日間反復実験の場合

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

先行研究で開発されたホルムアルデヒドのガス発生・暴露条件を踏まえて、所有するバブリングによる発生装置を用いてガスを発生する方法を採用し、35℃に

加温した発生装置内タンクへホルムアルデヒド液を希釈して入れ、これに発生空気を送りバブリングによりガスを発生させ、このガスを希釈空気により希釈を加え、横層流型チャンバー内へ空調（温度：25±2℃、湿度：55±5%）され活性炭を通した清浄な換気空気によりさらに希釈し、目的横槽流チャンバー内にサーキュレーターを設置し、内部空気を強力に攪拌することにより、マウス被毛へのガス吸着による濃度の不均一を解消した。

予備検討をへて最終的に発生流量を4.0L/分とし、供給流量はチャンバー内のホルムアルデヒド濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度1.0ppmに対して2.92～4.50L/分、0.3ppmには0.82～1.18L/分、0.1ppmには0.29～0.40L/分とし、一次希釈流量40L/分及びチャンバー換気流量650L/分で希釈し暴露した。

その結果、目標吸入暴露濃度0.1、0.3及び1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値（以下、平均値±標準偏差）はそれぞれ、0.094±0.021（0.048～0.126 ppm）、0.290±0.074（0.139～0.361 ppm）、0.987±0.242（0.503～1.302 ppm）と、目標濃度に対しそれぞれ94%、97%、99%となり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた。従って、加熱バブリング法によって、ホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08 ppmを考慮した0.1、0.3および1.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できたものとする。

C-2: 吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、インフォマティクス解析

本年度は、ホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量：30.03、Cas No. : 50-00-0)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)に経気道暴露 (4用量にて、6時間/日×7日間反復暴露 [6、22、70、166時間後に観測]と 22時間/日×7日間反復暴露 [22、70、166、190時間後に観測])させた際の脳、肺及び肝を採取して網羅的に遺伝子発現変動を解析した。ホルムアルデヒドの指針値は0.08 ppm、暴露目標値は0.1、0.3、1.0 ppmである。得られた脳、肺、肝サンプルについて、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。以下に、6時間/日×7日間反復暴露と 22時間/日×7日間反復暴露、それぞれについて解析結果を示す。

C-2-1-1:ホルムアルデヒド極低濃度[6時間/日×7日間]反復暴露時の遺伝子発現変動解析

以下に、海馬、肺及び肝における解析結果を示す。

C-2-1-1: ホルムアルデヒド[6時間/日×7日間] 反復暴露時の「海馬」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 1,236 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 190 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なかった。また現時点において神経系の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認められなかった。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 5,152 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

のとして 115 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なかった。ま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認められなかった

C-2-2-2: ホルムアルデヒド[6時間/日×7日間] 反復暴露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析

すでに暴露及びサンプリングを終了しており、今年度中に、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

C-2-1-3: ホルムアルデヒド[6時間/日×7日間] 反復暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析：

すでに暴露及びサンプリングを終了しており、今年度中に、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

C-2-1-2:ホルムアルデヒド極低濃度[22時間/日×7日間]反復暴露時の遺伝子発現変動解析

以下に、海馬、肺及び肝における解析結果を示す。

C-2-2-1: ホルムアルデヒド[22時間/日×7日間] 反復暴露時の「海馬」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 6,099 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 346 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、K⁺チャネル関連遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Kcnk3、Kcnk7、Kcnq1、Kcnab1、Kcnv1 及び Kcnma1 遺伝子の発現増加が認められた。K⁺チャネルの活性化は、神経

細胞の膜の過分極による膜電位の低下が生じることから、海馬における神経伝達の抑制が示唆された。しかし、上記の通り、各 K⁺チャネル関連遺伝子の発現増加が認められた暴露後の時間が、それぞれ異なるため、この作用は強いものではない可能性が示唆され、今後の検討を要するものと考えられる。その他の神経系の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認められなかった。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 1,127 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 28 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なかったが、神経活動の指標となる初期応答遺伝子 (Immediate early gene: IEG) の顕著な発現減少が認められ、またそれぞれ同様な発現パターンを示した。具体的には、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Klf2 及び Ier2 遺伝子の発現減少が認められた。興味深い事に、暴露休止 24 時間後である投与 190 時間後には逆に、これらの IEG の遺伝子の発現の増加が認められた。このことから、ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間]の極低濃度経気道暴露により、海馬において暴露期間中は神経活動が抑制される事が示唆され、また暴露休止後少なくとも 24 時間後には、逆に神経活動が活性化することが示唆された。いずれの IEG の遺伝子も同一の発現パターンを示した事から、同一の分子機序により発現が制御される可能性が示唆された。

この点、Saha ら (Nat Neurosci 14(7): 848-856, 2011) は、ラット初代培養神経細胞を用いて、IEG の遺伝子の発現は、Pol II に結合する 4 つのサブユニット(NELF-A、NELF-B、NELF-C/D 及び NELF-E)の複合

体である Negative elongation factor (NELF) によって制御されると報告している。しかし本解析結果では、この NELF のサブユニットの各遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。したがって、NELF の発現変動を伴わずに、その機能が抑制された結果、IEG の遺伝子の発現減少が誘発された可能性が考えられる。

次いで、これらの IEG の遺伝子の発現変動について、[6 時間/日×7 日間]反復暴露時のものと [22 時間/日×7 日間]反復暴露時のものとを比較・検討した。その結果上記した IEG の遺伝子は、[22 時間/日×7 日間]反復暴露の際には、暴露期間中は顕著に発現が抑制されているが、[6 時間/日×7 日間]反復暴露の際には、顕著な発現抑制が認められないことから、IEG の遺伝子の発現抑制は一日あたりの暴露時間に依存することが明らかとなった。

C-2-2-2: ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間] 反復暴露時の「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 572 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。特定のシグナルネットワークとして概日リズム関連遺伝子が認められ、この結果は IPA による検索でも Circadian Rhythm Signaling として抽出されてきた。具体的には Cry1、Clock、Arntl 及び Npas2 遺伝子の発現増加 (投与 70 時間後、高用量) が認められた。また暴露休止 24 時間後である投与 190 時間後には、高用量で発現増加傾向が認められた。

したがって、ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間] 反復暴露により、肝における

概日リズムが乱れが、肝機能に対する影響として現れる可能性が弱いながらも示唆された。今後、より詳細な検討を要するものとする。なお、薬物代謝酵素及び輸送体蛋白（トランスポーター）に関わる遺伝子の顕著な発現増加は認められなかった。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 3,179 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 44 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なかった。ま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認められなかった。

C-2-2-3: ホルムアルデヒド[2 2 時間/日 × 7 日間] 反復暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析

すでに暴露及びサンプリングを終了しており、今年度中に、網羅的遺伝子発現変動解析を検討する予定である。

C-2-3: 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

解析の精度向上と効率化のために、(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業務委託を実施した。昨年度までに開発したマイクロアレイデータ補正技術 (MLANG、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技術) の開発を(株)NTT データと共に、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基本技術を確立した。このデータ補正技術を、遺伝子発現誘導に基づく化学物質の分類技術、及び同期して発現する遺伝子の抽出技術に適用して、解析結果の精度を従来法と比較、評価

した。その結果、従来抽出できなかった特殊な挙動を示す遺伝子群を発見した。さらに MLANG の補正パラメータ設定アルゴリズムを改良したところ、MLANG の計算結果の精度や安定性が向上することを確認した。

C-3 : 化学物質の極低濃度下での長期暴露による毒性確認に関する研究

今年度は、ホルムアルデヒド (指針値: 0.08 ppm) を対象とし、極低濃度下 (0、0.1、0.3 及び 1.0 ppm)、22 時間/日×28 日間反復吸入暴露したマウス肺における超微形態学的検索を検討した。

C-3-1: 暴露期間中の一般状態の変化、体重及び摂餌量

暴露期間中、全ての暴露群において一般状態の変化は認められなかった。体重は対照群と比較し、1.0 ppm 投与群において暴露 14、18 及び 25 日目に、また 0.3 ppm 投与群において暴露 14 日目に一過性に、有意に減少したが、暴露最終日である 28 日目にはいずれの暴露群でも有意な差は認められなかった。摂餌量は、対照群と比較し、1.0 ppm 投与群において暴露 7、11、18 及び 21 日目に、また 0.3 ppm 投与群において暴露 4 日目に一過性に、有意に減少したが、暴露最終日である 28 日目にはいずれの暴露群でも有意な差は認められなかった。

C-3-2: 臓器重量

各臓器の絶対・相対重量は、全ての暴露群について対照群と比較し、有意な差は認められなかった。

C-3-3: 超微細形態学的検索

常法により作製した肺の病理組織標本に

比べて、本手法により電顕検索用に固定した肺組織から光顕用スクリーニングサンプルとして作製したヘマトキシリン・エオジン染色標本では、線毛上皮細胞、クララ細胞、II型肺胞上皮細胞などの肺の各組織が瑞々しい状態で良く保存されており、アーティファクトはほとんど認められなかった。作製した肺の光顕用スクリーニングサンプルは全て固定による修飾はなく、良質な状態であった。このことから、今回確立した肺組織の固定方法を採用することによって高品質の電顕用サンプルを安定して得ることができることが示され、現在、TEM試料の作製を進めている段階である。1.0 ppm暴露群では細気管支上皮が対照群よりも幾分扁平となっている。この程度の変化は病理組織学的には一般に毒性変化として取り上げるものではないが、TEMによる超微細形態検索候補と考えられる。予備検討に手間取り時間を要したが、平成24年度前半をめどに超微細形態学的検索を終了する。

C-3-4: 病理組織学的検索

病理組織学的検索をした肺、脳、肝、腎、脾及び心にはホルムアルデヒドの暴露の影響は認められなかった。

C-4: 人への外挿にかかわる臨床的解析、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、最も正常の気道細胞に近いといわれるヒト気道上皮細胞株 (BEAS2B 細胞) を用いる *in vitro* 解析系により、先行研究で見いだした微生物関連物質 (poly I:C) とホルムアルデヒドとの IL-8 遺伝子の発現増強作用について、さらにその機序に迫るため、IL-8 遺伝子発現に関わるとされる p38MAPK、ERK1/2 及び JNK の3つの主

要なシグナル伝達系に対する各種阻害剤の効果を検討した。

その結果、いずれの阻害剤においても、IL-8 mRNA の発現の抑制が観察されたが、特に p38MAPK、ERK1/2 の阻害剤の効果は大きく、JNK の阻害剤の効果は部分的であったが認められた。一方、阻害剤によるシグナル伝達分子のリン酸化阻害効果は、特に ERK1/2 で著明に認められたが、JNK では部分的であった。

ホルムアルデヒドによる増強効果が観察された JNK の系をさらに検討するため、poly I:C による刺激 24 時間後に、JNK 阻害剤をさらに高濃度 (2、10 及び 20 μ M) 添加して、その後ホルムアルデヒドを加えて、3 時間後に細胞を回収、阻害剤による IL-8 mRNA の発現を検討したところ、IL-8 の遺伝子発現は、阻害剤の濃度依存的に減少したが、やはり高濃度でも抑制効果は部分的であった。JNK のリン酸化も十分なリン酸化の抑制には至らなかった。

好中球性炎症荷関連の深い IL-8 に対して、好酸球性炎症に関係の深い RANTES の遺伝子発現を同一の系で検討したところ、RANTES はホルムアルデヒドにより、むしろ遺伝子発現が抑制されていた。

以上の事から、poly I:C (10 μ g/ml) 存在下で 24 時間刺激後、ホルムアルデヒド (10 μ M) 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系において、IL-8 遺伝子発現に関わると報告されている ERK、p38 及び 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、IL-8 遺伝子発現増強に関連する可能性が示唆された。

D. 結論

本研究の遂行によって期待される成果

として、先行研究「シックハウス症候群レベルの暴露を考慮した吸入毒性評価系に関する研究」では検討の対象外とした比較的長期の暴露時の形質変化を観測する事が挙げられる。すなわち、1) 暴露期間が短い(1~7日間)際の肺及び肝に発現が誘導された遺伝子と、比較的長期暴露による形質変化の関係から、有害性が形態学的に実証されること、2) 中枢神経系での遺伝子発現変動を検討することにより、人のシックハウス症候群において中心的な位置を占める「不定愁訴」の実態を把握・評価し得ること、である。上記1)については、より長く暴露し、超微形態学的検索を含む高精度な観察により実証できるものとする。2)については、「不定愁訴」の本態解明に向け、肺・肝に加え中枢神経のトキシコゲノミクス解析を実施し、先行研究での評価系を、中枢影響評価と多臓器連関を包含するかたちで発展させることとした。本研究では特に後者の「不定愁訴」あるいは「脳機能所見」について、規制決定の際の毒性情報として採用可能なものとするためのバリデーションに耐える評価系を提案する。本研究の成果を通して、近年の技術革新の加速に伴い急増する「新規物質」の吸入毒性評価に際し中枢影響を含むかたちで、極低濃度での有害性を見逃しなく検出できるようになることが期待される。

今年度(平成23年度)は、ホルムアルデヒド(指針値: 0.08 ppm)について極低濃度下(0、0.1、0.3及び1.0 ppm)での経気道暴露を、第一の目的に向けて、22時間/日 x 28日間反復暴露のプロトコール、また第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である6時間/日 x 7日間反復暴露(=労働暴露モデル)と22時間/日 x 7日間反復暴露(=生活暴露モデル)の2種類の

プロトコールにより、ホルムアルデヒド液をバブリングし気化させる方法により実施した。その結果、いずれのプロトコールにおいても、目標暴露濃度に近似した値にて、ホルムアルデヒドをマウスに安定して経気道暴露する事が出来た。

第二の目的に向けて、ホルムアルデヒドにつき6時間/日 x 7日間反復(6、22、70及び166時間後に観測)、及び22時間/日 x 7日間反復(22、70、166及び190時間後に観測)経気道暴露の際のマウス脳・肺・肝の mRNA につき遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果、6時間反復暴露時では顕著に認められないが、22時間 x 7日間反復暴露の際の海馬において、暴露期間中、神経活動の指標となる初期応答遺伝子(Immediate early gene: IEG) (Arc, Nr4a1、Fos, Junb 及び Egr4 遺伝子等)の発現が強く抑制されたことから、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。この抑制により、記憶をはじめとする情動認知行動異常が誘発される可能性が高く、この事がシックハウス症候群で認められる不定愁訴と関係している可能性が考えられ、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。

解析の精度向上と効率化のために、(株)NTT データにマイクロアレイデータ解析技術開発研究を業務委託した。昨年度までに開発したマイクロアレイデータ補正技術(MLANG)を、遺伝子発現誘導に基づく化学物質の分類技術(化学物質クラスタリング)及び、同期して発現する遺伝子の抽出技術(同期遺伝子抽出)へ適用し、従来抽出できなかった特殊な挙動を示す遺伝子群を発見した。さらに MLANG の補正パラメータ設定アルゴリズムを改良したところ、MLANG の計算結果の精度や安定性

が向上することを確認した。

第一の目的に向け、長期暴露後（22 時間/日 x 28 日間反復）の肺について、超微細形態学的検索を実施中である。予備検討に手間取り検索に時間を要したが、すでに検索をすすめており、平成 24 年度前半をめどに解析を終了する。さらに、ヒト気道上皮細胞株 (BEAS2B 細胞) を用いる *in vitro* 解析系により、先行研究で見いだした微生物関連物質 (polyI:C) とホルムアルデヒドとの IL-8 遺伝子の発現増強作用について、各種リン酸化酵素阻害剤を用い、この発現増強過程に JNK 分子を介するシグナルが関与することを見いだした。この事はこの *in vitro* 解析系が、人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。

以上のごとく、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、脳サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により化学物質の経気道暴露によって生じる中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。また、22 時間/日反復暴露の際、海馬での神経活動の抑制が示唆された事は「不定愁訴」の分子実態の一端を明らかにしたものとする。加えて、ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の解析系にて、微生物関連物質 (polyI:C) とホルムアルデヒドとの複合影響の分子機序の一端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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1-1) 書籍等

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Kiyoshi Sekita, Atsuya Takagi and Satoshi Kitajima

Chapter11 Application of Percellome Toxicogenomics to Food Safety Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food, 2011, 184-198. Editor(s): Ingemar Pongratz, Linda Bergander, Royal Society of Chemistry. ISBN: 978-1-84973-297-0, DOI:10.1039/9781849732970-00184

Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno

15 STANDARDIZATION OF GENE-EXPRESSION INFORMATION FOR THE SAFETY EVALUATION: ACTIVITIES IN JAPAN

Applications of Toxicogenomics in Safety Evaluation and Risk Assessment, 2011 323-329

Darrell R. Boverhof (Editor), B. Bhaskar Gollapudi (Editor), John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-44982-0

1-2) 学術雑誌

Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Yuhji Taquahashi, Noriko Moriyama, Eriko Ikeno, Nae Matsuda, Yumiko Saga, Bruce Blumberg, and Jun Kanno

Development of Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain sequence. J Toxicol Sci 37: 373-380, 2012.

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S.,
GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*. 2011 Nov 27.
doi: 10.1038/nature10656.

Fujimoto N, Kitamura S, Kanno J., Androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94: Involvement of estrogen receptors., *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):301-6.

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 Mar;46(3):339-49.

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, 53: 51-63.

Nagano, K., Nishizawa, T., Eitaki, Y., Ohnishi, M., Noguchi, T., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary Toxicity in Mice by 2- and 13-week Inhalation Exposures to Indium-tin Oxide and Indium Oxide Aerosols, *Journal of Occupational Health*, 2011, 53, 234-239.

Hang NT, Lien LT, Kobayashi N, Shimbo T,

Sakurada S, Thuong PH, Hong LT, Tam DB, Hijikata M, Matsushita I, Hung NV, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon-gamma release assay for tuberculosis. *PLoS One* 6 (8): e23806, 2011.

Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Hang N, Lien L, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis* 11: 71, 2011.

2. 学会発表

北嶋 聡、小川幸男、長野嘉介、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、安彦行人、山本雅也、菅野 純

Percellome 法によるシックハウス症候群レベルの極低濃度暴露下での吸入トキシコゲノミクス [第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会]2011 年 7 月

種村健太郎、五十嵐 勝秀、松上稔子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純

ヒト型リガンド結合ドメインノックイン PXR マウスの遺伝子発現応答特性 [第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー] 2011 年 7 月

五十嵐 勝秀、北嶋 聡、相崎 健一、菅野 純
ヒト型 PXR 生理的発現マウス系の全身臓器トランスクリプトーム解析[第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会]2011 年 7 月

相崎 健一、五十嵐 勝秀、種村 健太郎、