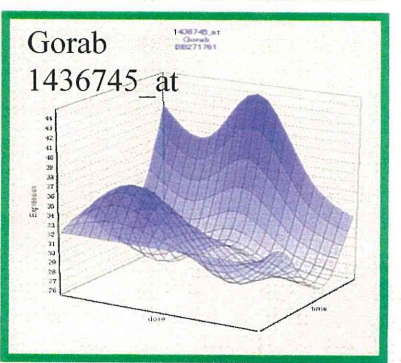
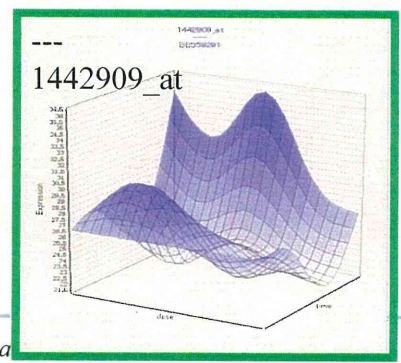
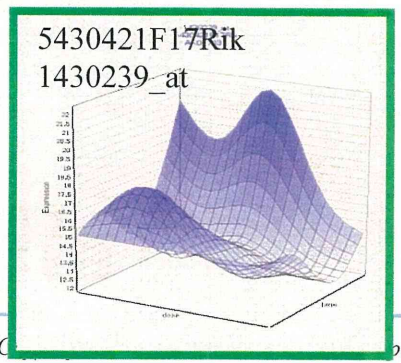
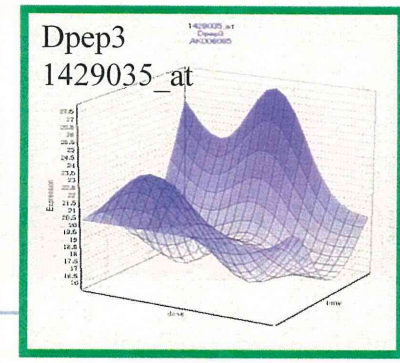
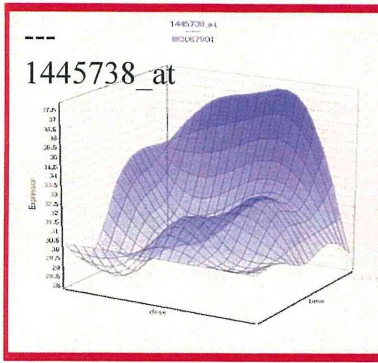
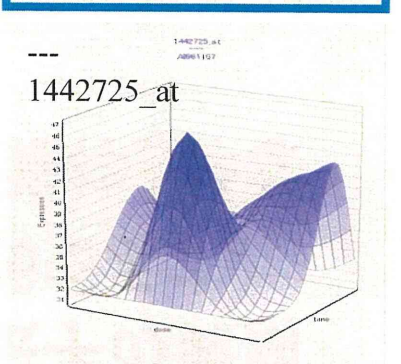
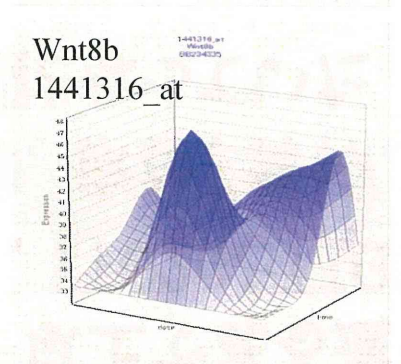
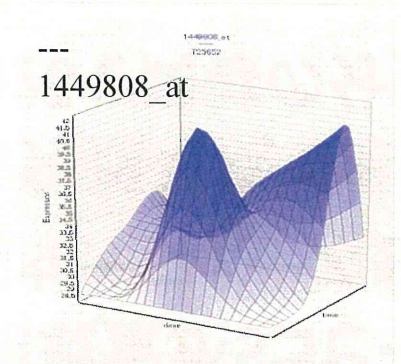
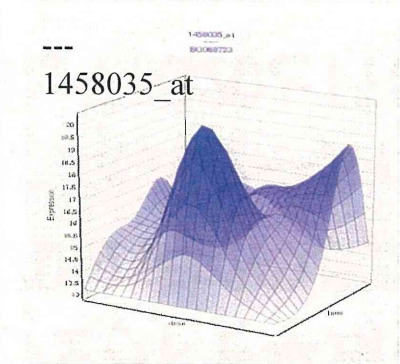
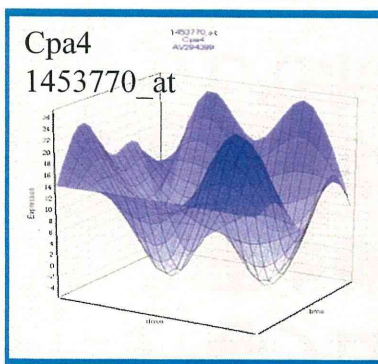
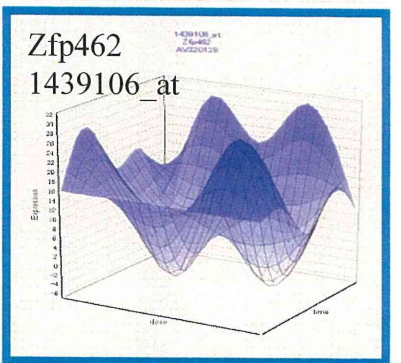
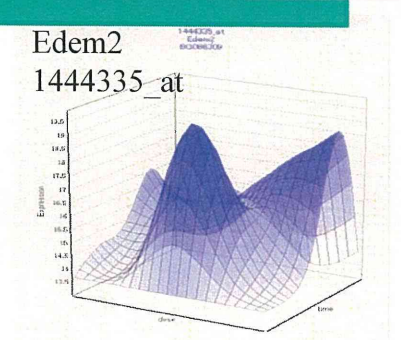
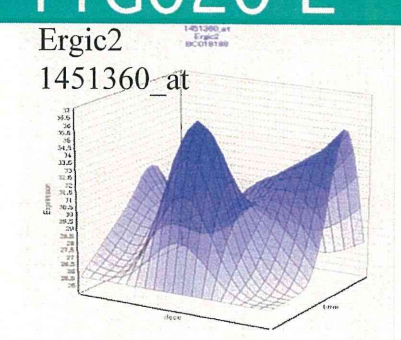
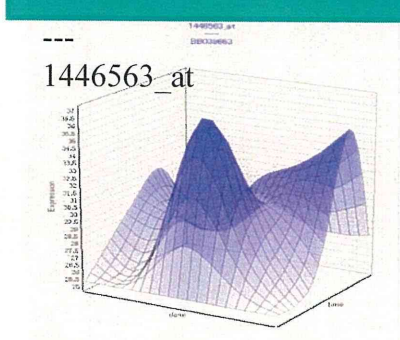
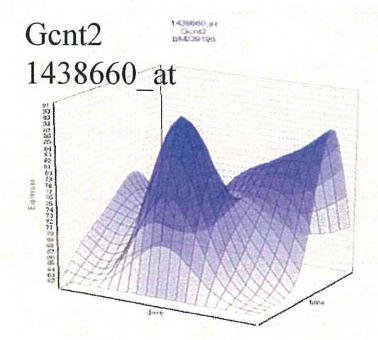
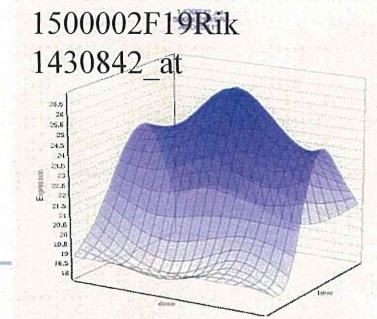
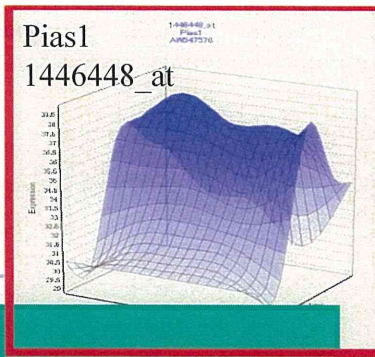
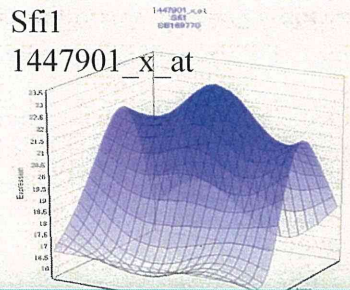
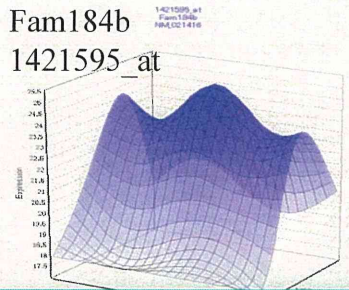
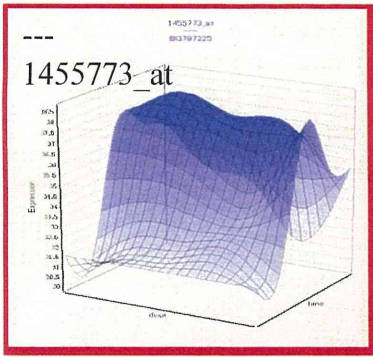
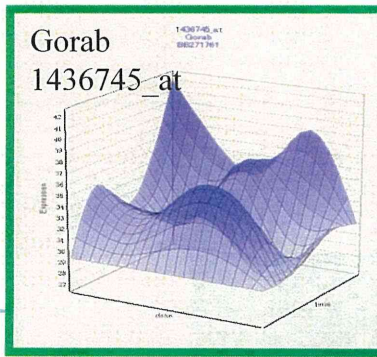
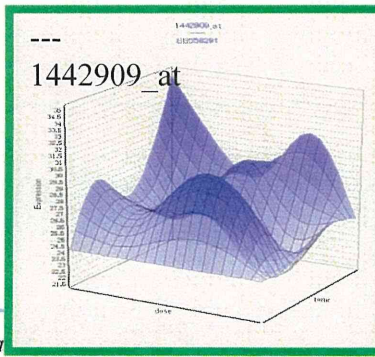
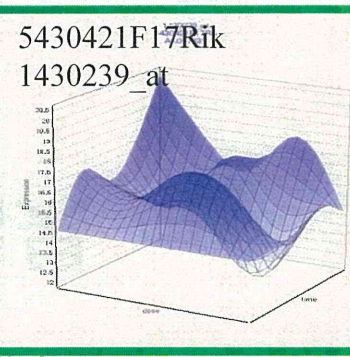
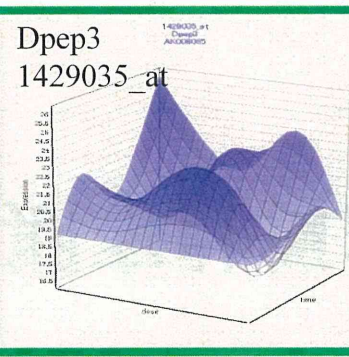
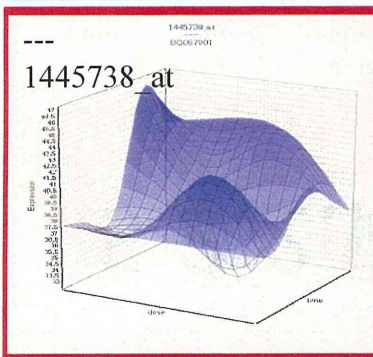
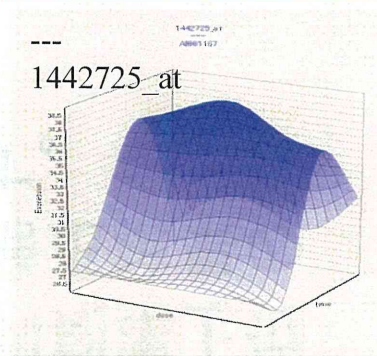
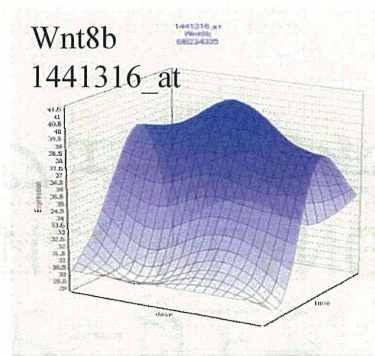
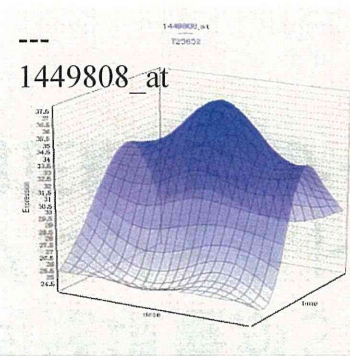
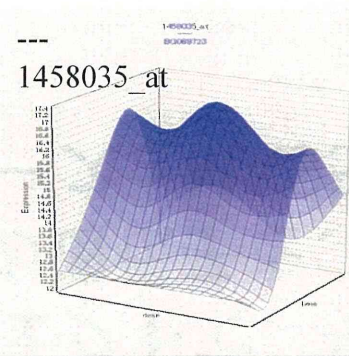
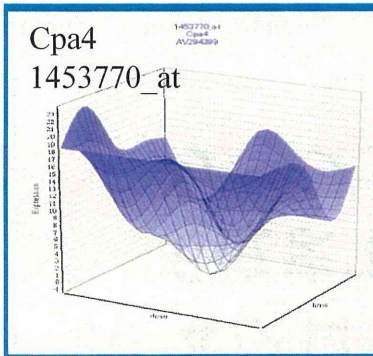
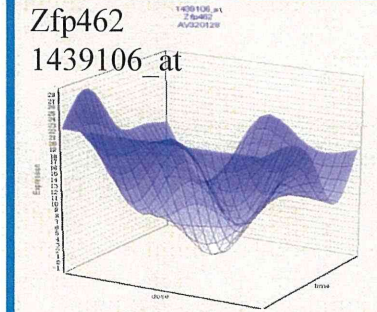
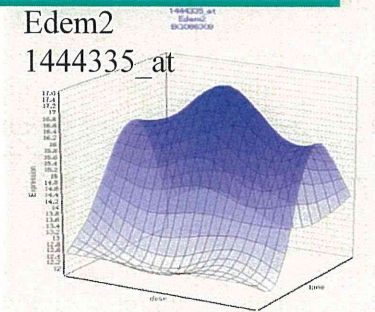
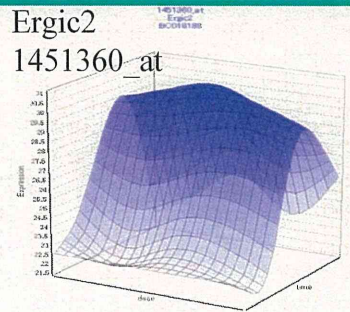
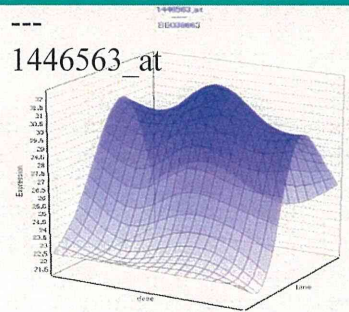
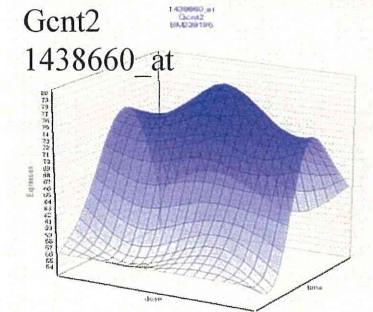


TTG020-L





TTG026-L

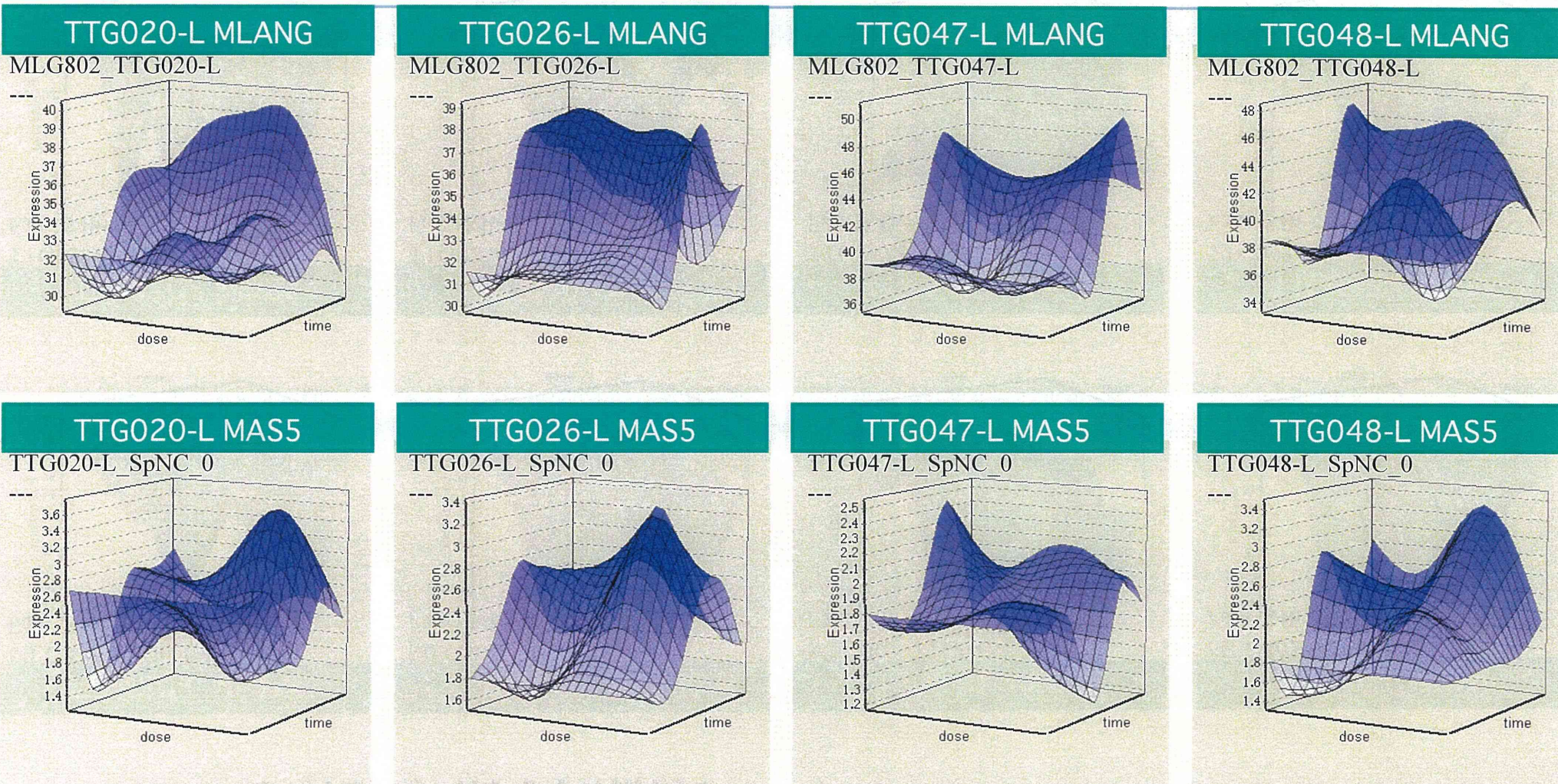


## 5.2.2.同期率計算結果

---

- ・ 4プロジェクトで、平均発現量が5コピー以上で、同期率上位6位までの遺伝子を、プロジェクト毎に、MLANG補正結果のサーフェースとMAS5補正結果のサーフェースを示す。

# 5.2.2.同期率計算結果



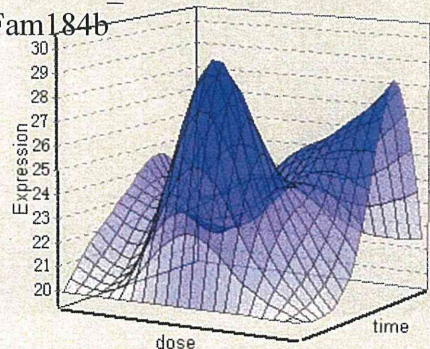
MLANGの補正結果とMAS5の補正結果とでは、形状が大きく異なり、発現レベルも異なる結果となっていた。

# 5.2.2.同期率計算結果

TTG020-L MLANG

MLG802\_TTG020-L

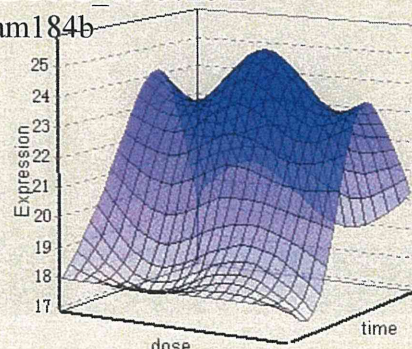
Fam184b



TTG026-L MLANG

MLG802\_TTG026-L

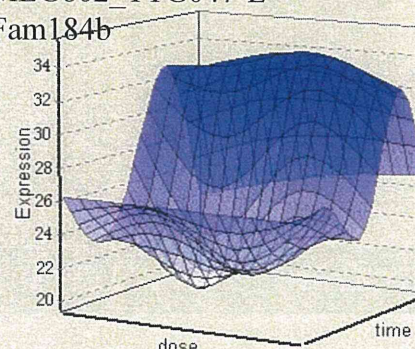
Fam184b



TTG047-L MLANG

MLG802\_TTG047-L

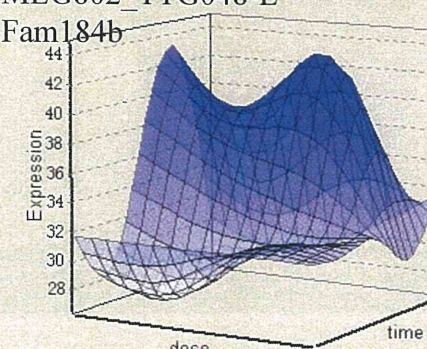
Fam184b



TTG048-L MLANG

MLG802\_TTG048-L

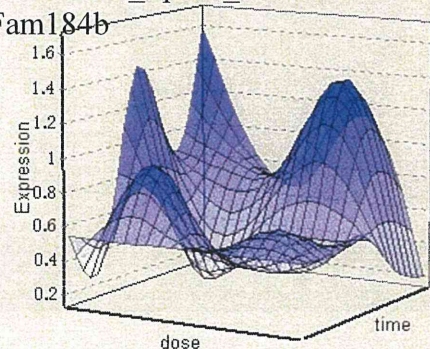
Fam184b



TTG020-L MAS5

TTG020-L\_SpNC\_0

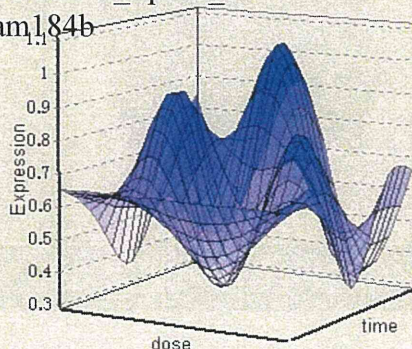
Fam184b



TTG026-L MAS5

TTG026-L\_SpNC\_0

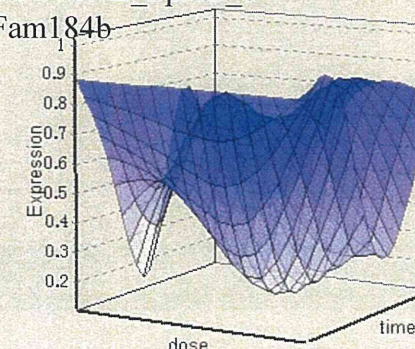
Fam184b



TTG047-L MAS5

TTG047-L\_SpNC\_0

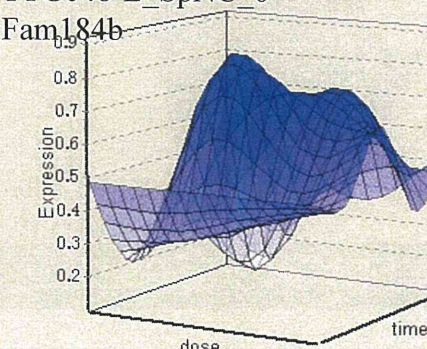
Fam184b



TTG048-L MAS5

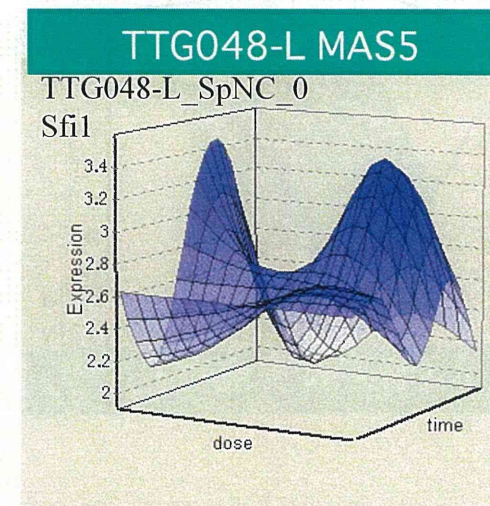
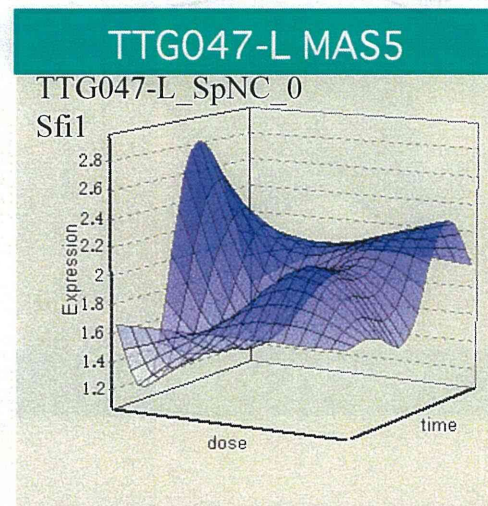
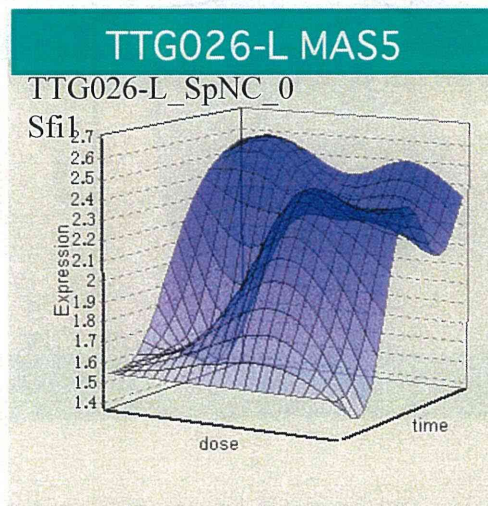
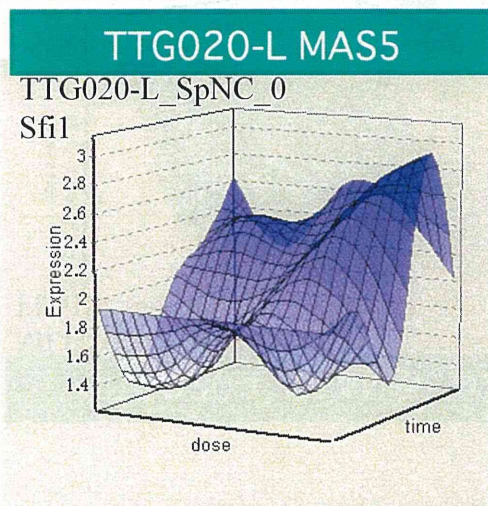
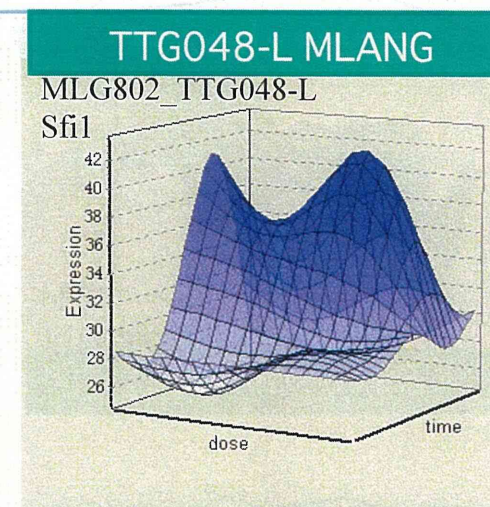
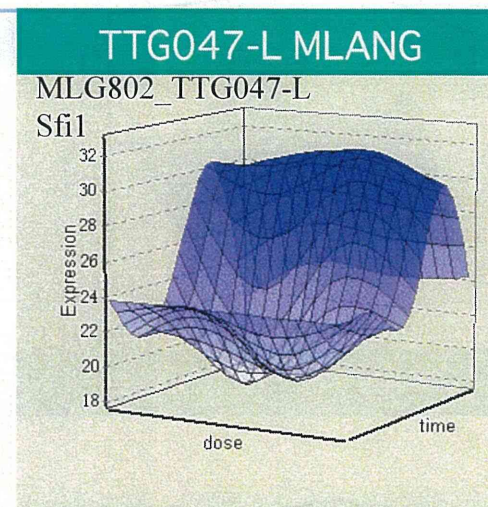
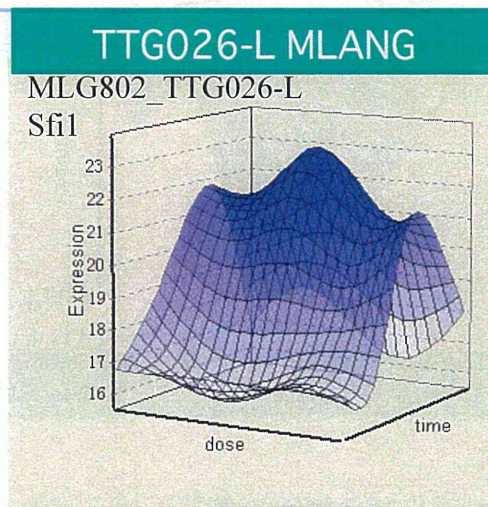
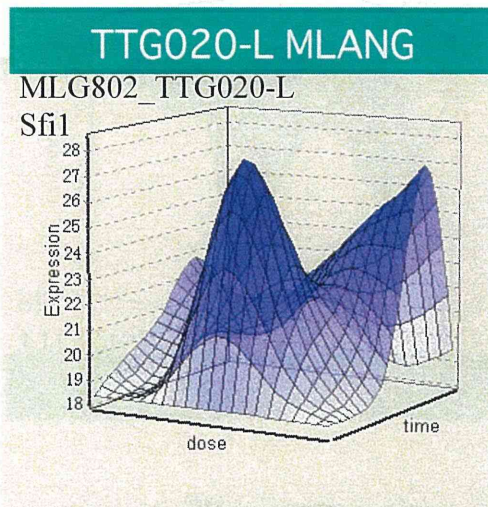
TTG048-L\_SpNC\_0

Fam184b



MLANGの補正結果とMAS5の補正結果とは、形状が大きく異なり、発現レベルも異なる結果となっていた。

# 5.2.2.同期率計算結果

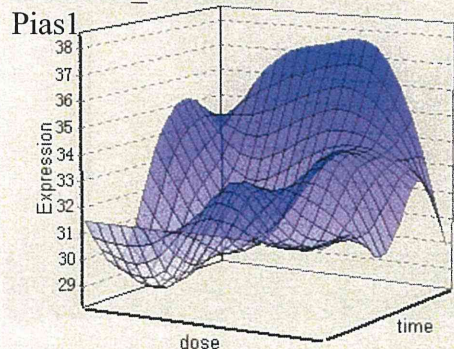


MLANGの補正結果とMAS5の補正結果とでは、形状が大きく異なり、発現レベルも異なる結果となっていた。

# 5.2.2.同期率計算結果

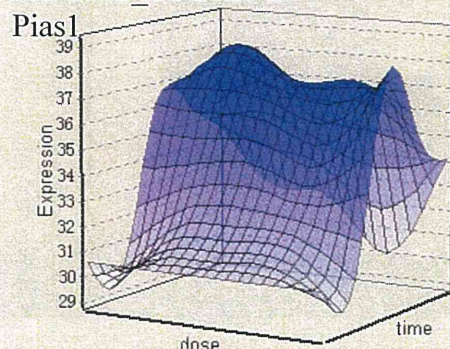
TTG020-L MLANG

MLG802\_TTG020-L



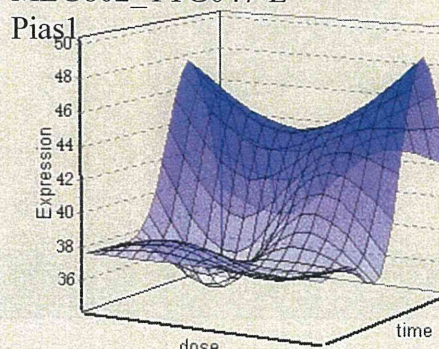
TTG026-L MLANG

MLG802\_TTG026-L



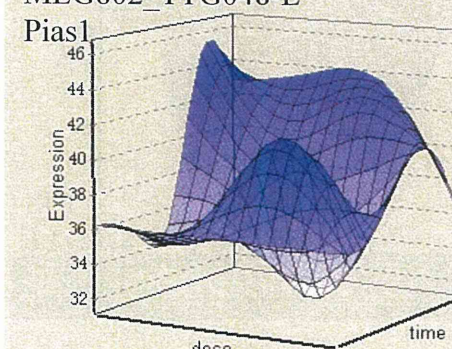
TTG047-L MLANG

MLG802\_TTG047-L



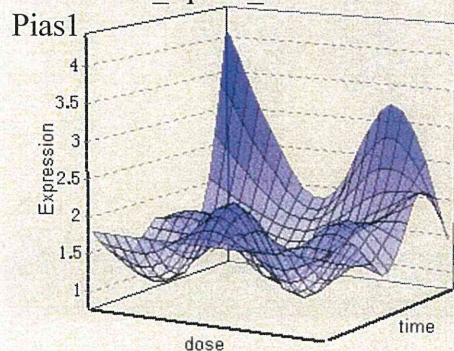
TTG048-L MLANG

MLG802\_TTG048-L



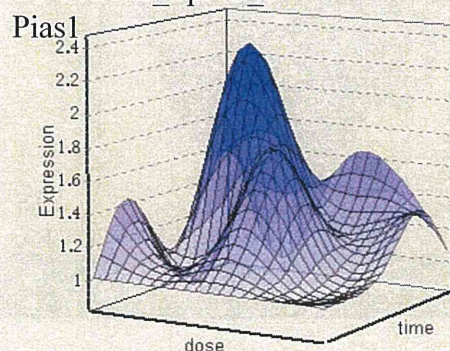
TTG020-L MAS5

TTG020-L\_SpNC\_0



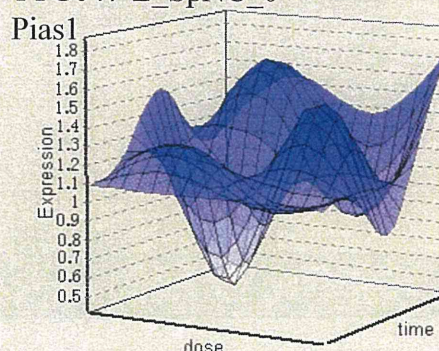
TTG026-L MAS5

TTG026-L\_SpNC\_0



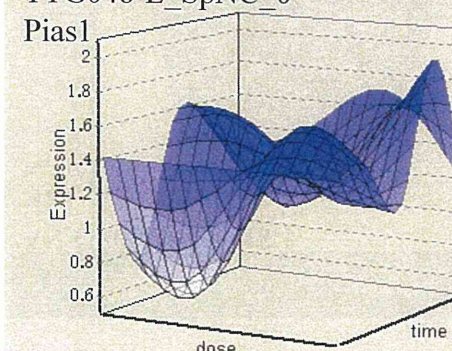
TTG047-L MAS5

TTG047-L\_SpNC\_0



TTG048-L MAS5

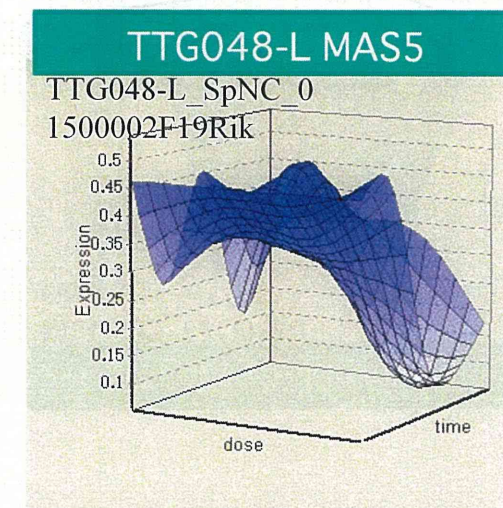
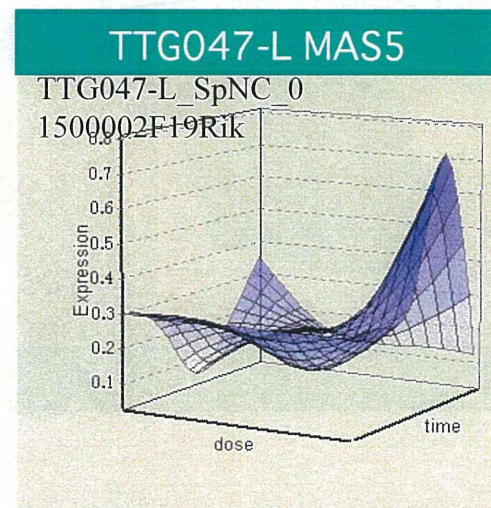
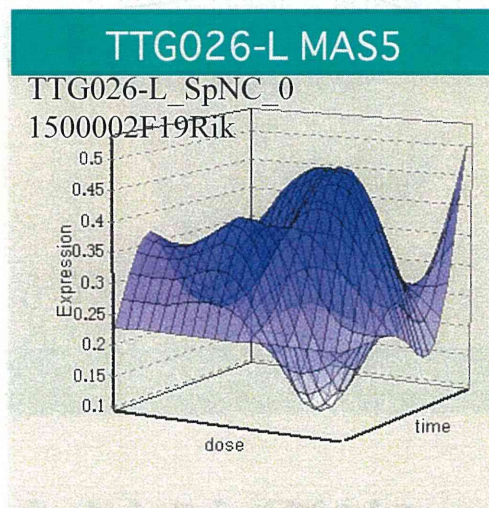
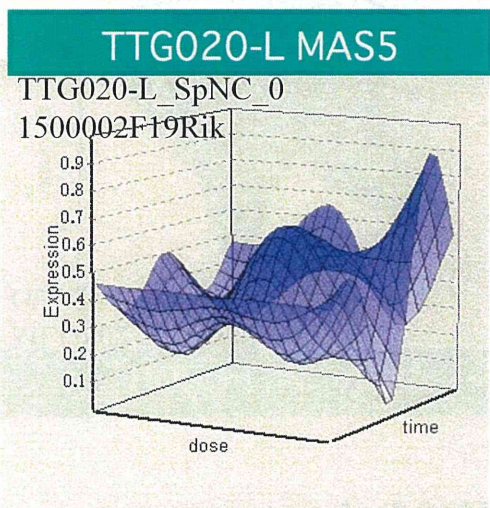
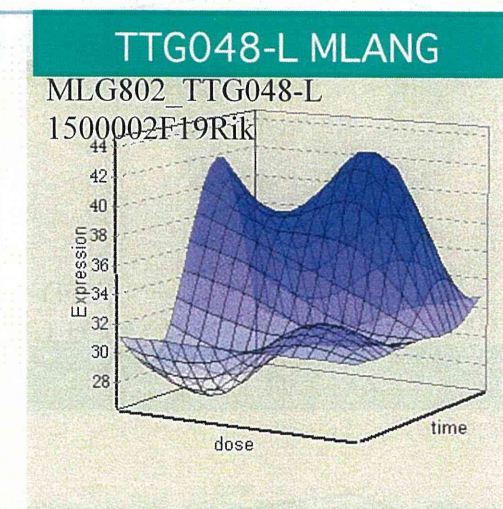
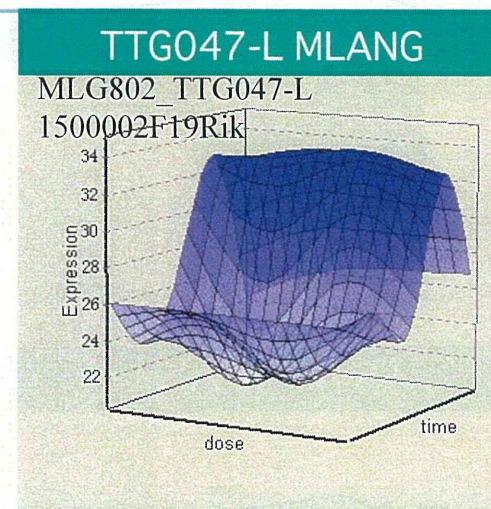
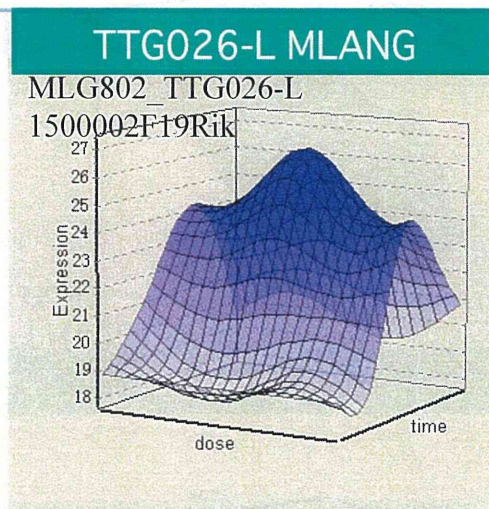
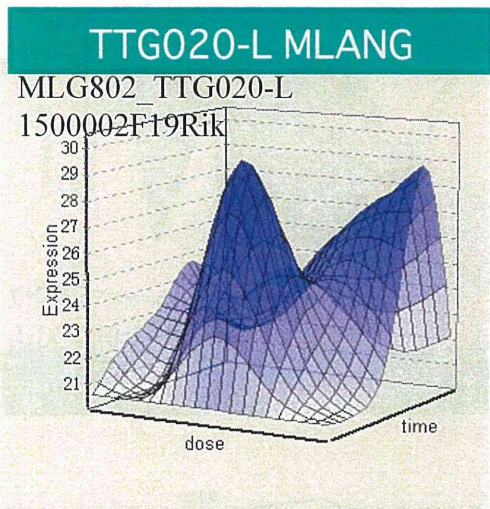
TTG048-L\_SpNC\_0



MLANGの補正結果とMAS5の補正結果とでは、形状が大きく異なり、発現レベルも異なる結果となっていた。

# 5.2.2.同期率計算結果

-185-



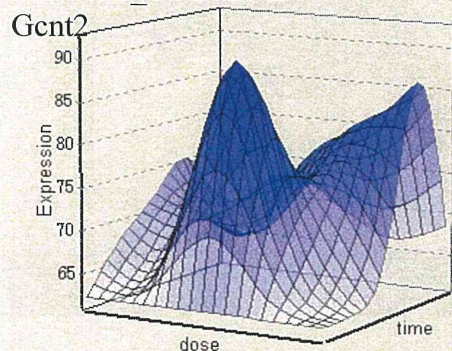
MLANGの補正結果とMAS5の補正結果とでは、形状が大きく異なり、発現レベルも異なる結果となっていた。



# 5.2.2.同期率計算結果

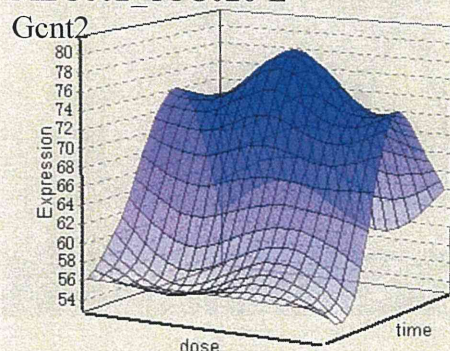
TTG020-L MLANG

MLG802\_TTG020-L



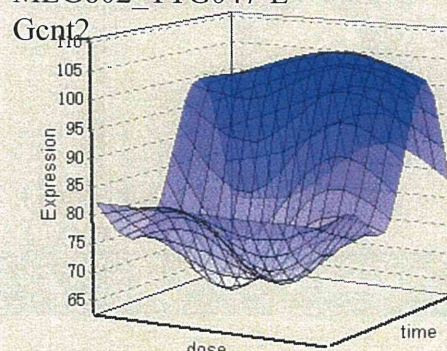
TTG026-L MLANG

MLG802\_TTG026-L



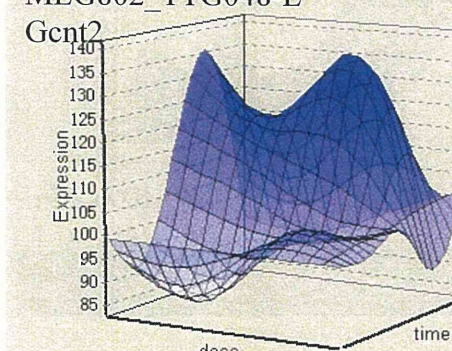
TTG047-L MLANG

MLG802\_TTG047-L



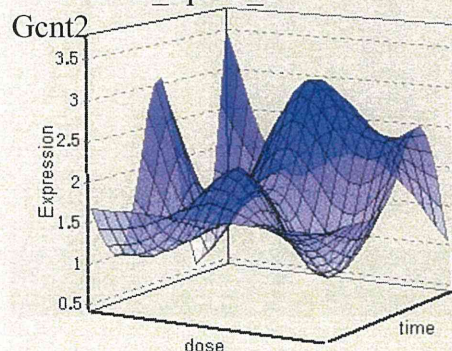
TTG048-L MLANG

MLG802\_TTG048-L



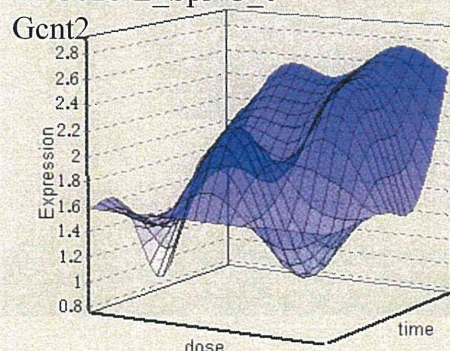
TTG020-L MAS5

TTG020-L\_SpNC\_0



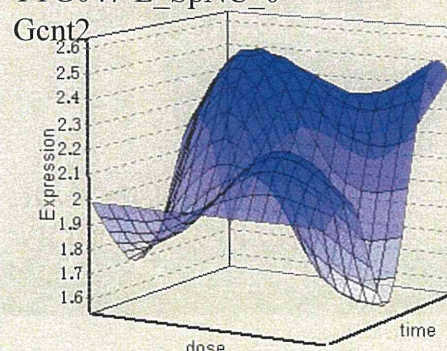
TTG026-L MAS5

TTG026-L\_SpNC\_0



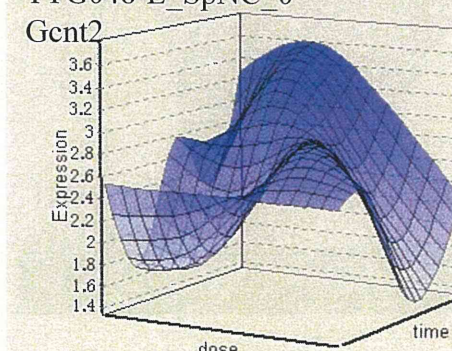
TTG047-L MAS5

TTG047-L\_SpNC\_0



TTG048-L MAS5

TTG048-L\_SpNC\_0



MLANGの補正結果とMAS5の補正結果とでは、形状が大きく異なり、発現レベルも異なる結果となっていた。

## 5.3.同期率計算のまとめ

---

- ・ 同期率計算は、化合物ごとに反応パターンが異なっていたとしても、反応が似ている遺伝子同士を見つけ出すことを目的として作成された。
- ・ 今回は、MLANG補正において発生した数値計算上のクロスハイブリダイゼーションも検出することができた。
- ・ MLANG補正手法は、飽和による影響や他のRNAによるクロスハイブリダイゼーションを補正できる。しかし、数値計算上の擬似的なクロスハイブリダイゼーションが発生する場合がある。同期率計算は、このような状況を的確に見つけ出すことにも応用できることが分かった。これを用いて、MLANG補正の高精度化を図る。

平成23年度 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—  
分担研究報告

分担研究課題 「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」

研究分担者 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  
研究協力者 相磯 成敏 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部  
齋藤 美佐江 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部  
酒井 俊男 酒井電子顕微鏡応用研究所

#### 研究要旨

本研究の目的は、「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気化性物質について、極低濃度下での比較的長期暴露（28日間）後の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による気化性物質の有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データに基づく有害性の予見性を確認することにある。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での微細な毒性兆候の把握を研究課題とした。毒性試験での病理組織学的検索は、対照群と投与群間、あるいは投与群間での形態学的変化の比較検討に立脚しており、対照群と各投与群で同じ部位を比較する必要がある。病理組織学的検索と透過型電子顕微鏡（TEM）検索を連携させた“大型試料作製による光顕—電顕連携検索方法(酒井法)”を応用することで、肺の特定部位の超微細形態学的変化の高精度解析が可能となる。本年度は大型試料作製による光顕—電顕連携検索に耐え得るマウス肺組織の固定、切り出し方法を確立し、極低濃度ホルムアルデヒドの28日間暴露試験に応用した。HE染色標本によるスクリーニングで、TEMによる高精度解析に十分対応できる固定が行われたことを確認し、目下、TEM検索に向けた試料作製を進めている。全身諸臓器に一般的な病理組織学的検索で毒性影響を認めなかった。

#### A. 研究目的

近年、生活環境中化学物質の極低濃度室内汚染が喘息やシックハウス症候群、アトピー性皮膚炎などの起因子として浮上してきている。

先行研究（厚生労働省科研費・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気化性物質について指針値レベルの極低濃度（ホルムアルデヒドを0.08 ppm、室内濃度指針値）を考慮した濃度でのマウス吸入毒性試験（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ところ、病態の惹起或いは生体防御の変動を示唆する影響が高感度に捕捉された。しかし、ppbオーダーでの7日間の極低濃度連続暴露では、光学顕微鏡による病理組織学的検索では形態学的変化を検出することができなかった。化学物質の有害性評価では、一般に光学顕微鏡を用いた病理組織学検査で形態学的に認識される毒性所見をエンドポイントとして無毒性量が決められる。光学顕微鏡による病理組織学的検索では形態学的変化を検出することができなくても、遺伝子レベルで変動が生じる肺について毒性を示唆する何等かの超微細形態学的変化が検出されれば、遺伝子発現の変動から肺毒性を予測できる可能性がでてくる。

本分担研究の目的は、「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気化性物質について、極低濃度下での比較的長期暴露(28日間)後のマウス肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による気化性物質の有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データに基づく有害性の予測性を確認することにある。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での微細な毒性兆候の把握を分担研究課題とした。

肺の毒性兆候を透過型電子顕微鏡(TEM)で検索するには、肺の細気管支、肺胞管、肺胞、肺胸膜など臓器の特定部位に検索部位を絞り込んだ上で、対照群と投与群間で超微細形態変化の比較が必要となる。一般に行われている肺のTEM検索法は、組織・臓器を1mm<sup>3</sup>程度の大きさに細切してサンプリング・固定した材料をエポキシ樹脂に包埋、超薄切した試料を観察するもので、病変、特に腫瘍組織の鑑別診断等には有効なツールとして利用されているが、肺の細

気管支、肺胞管、肺胞、肺胸膜など臓器の特定部位に絞り込んで対照群と投与群間で超微細形態変化を比較・検索することは極めて困難である。しかも、光学顕微鏡で認識した部位をTEMで検索することは全く不可能である。しかし、病理組織学的検索とTEM検索を連携させた“大型試料作製による光顕—電顕連携検索方法(酒井法)”を応用することにより、光学顕微鏡で絞り込んだ肺の特定の部位について超微細形態学的変化を対照群と投与群の間で高精度な比較を行うことが可能となる。

この方法はエポキシ樹脂包埋した大型の厚切り標本から標的とする部位を光学顕微鏡下で取り出し、それをエポキシ樹脂に再包埋、超薄切片を作製してTEMによる検索をおこなうものである。今年度は、第一番目に、今後三カ年に渡る研究の基盤作りとして“大型試料作製による光顕—電顕連携検索方法”に耐え得るマウスの肺組織の固定、切り出し手法の確立を目指した。第二番目に、第一番目の目的として確立した方法を極低濃度ホルムアルデヒドのマウス28日間吸入暴露試験に応用し、TEM検索性試料作製を進めた。第三番目には上記の試験での脳、肝、脾、腎、胸腺について一般的な病理組織学的検索を実施して、呼吸器以外の臓器でのホルムアルデヒドの影響を把握することを意図した。

## B. 研究方法

今年度は、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 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、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  $\mu\text{m}$ ）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ミクロトームで厚さ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。10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した肝、腎、脾、脳、胸腺及び心臓について、常法によりパラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製、病理組織学的に検索をおこなった。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。

## C. 研究結果

C-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。暴露期間中の体重

及び摂餌量についてそれぞれ表1及び表2に示す。体重は対照群と比較し、1 ppm 投与群（高用量群）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 ppm 投与群（高用量群）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-2：臓器重量

各臓器の絶対・相対重量を表3に示す。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：超微細形態学的検索

図2に本分担研究で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・エオジン染色標本の高倍率撮影写真、図3に常法により作製した肺の病理組織標本の高倍率撮影写真を示した。図2では図3に比べて線毛上皮細胞、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見られなかった。本分担研究で作製した肺の光顕用スクリーニングサンプルは全て図3に示した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。図4に1.0 ppm 暴露群の肺、図5に対照群の肺を示した。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た。

#### C-4：病理組織学的検索

病理組織学的検査結果を表4に示す。検索した肺、脳、肝、腎、脾及び心臓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。

#### D. 結論

ホルムアルデヒドを、室内濃度指針値（0.08 ppm）を考慮した濃度でマウスに極低濃度（0.1、0.3及び1.0ppm）を28日間全身吸入暴露した。その結果、暴露期間中、一般状態の変化は認められなかった。体重と摂餌量には一過性の減少が認められることがあったが、暴露最終日である28日目にはいずれの暴露群でも対照群と比較して有意な差は認められなかった。臓器重量に暴露の影響はみとめられなかった。極低濃度ホルムアルデヒドを28日間吸入暴露したマウスの肺を今回開発した手法で固定した結果、スクリーニング用に切り出した肺のHE染色標本から十分TEMによる高精度解析に使用できるレベルの固定がおこなわれていることが確認できた。目下、TEM検索に向けた肺の試料作製を進めており、平成24年度前半をめどにTEMによる解析を終了する。病理組織学的検索で肺、脳、肝、腎、脾、胸腺及び心臓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。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

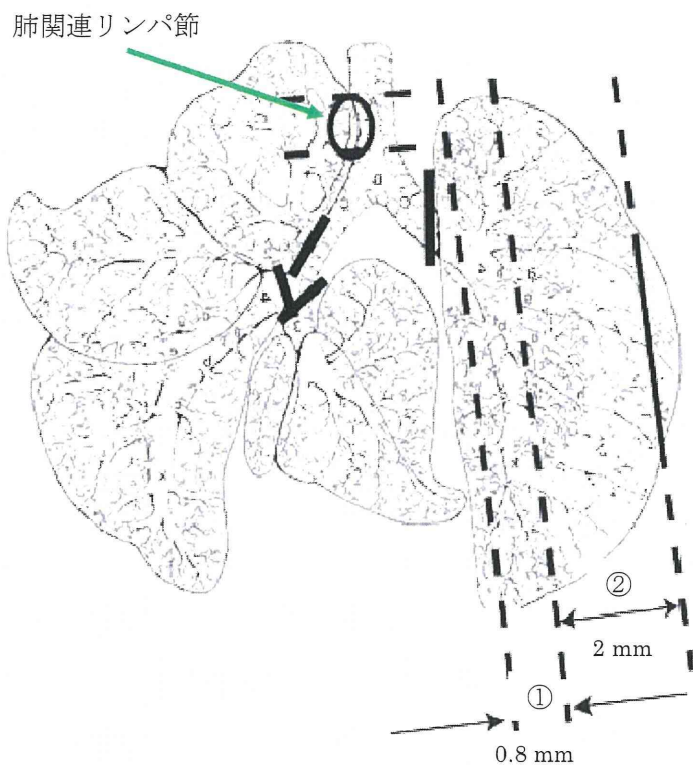


図 1. 肺の切り出し



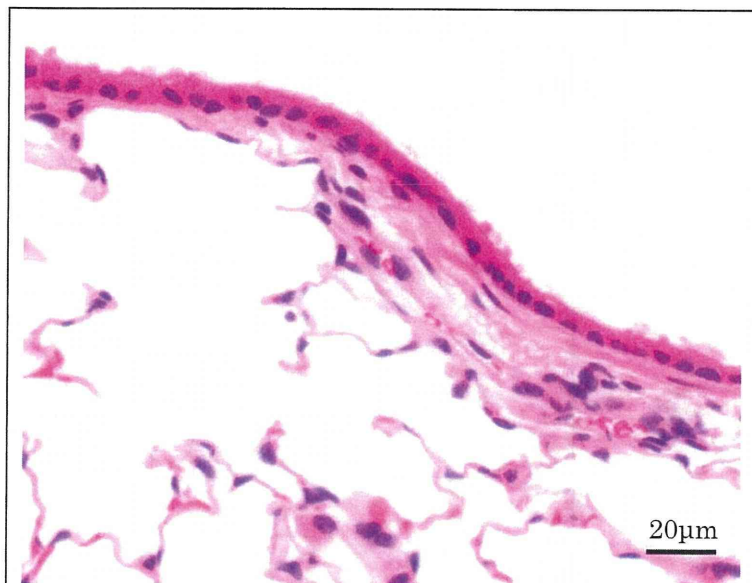


図 2. 肺、ヘマトキシリン・エオジン染色  
ホルムアルデヒド 1.0ppm 暴露群

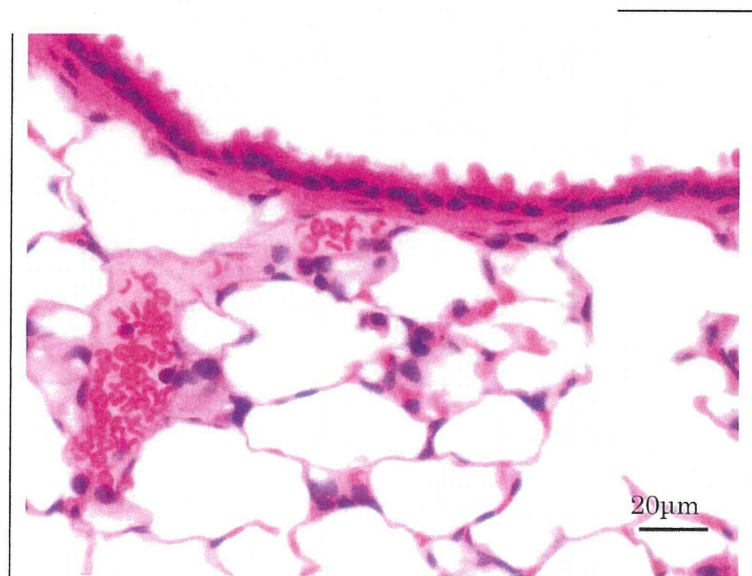


図 3. 肺、ヘマトキシリン・エオジン染色  
対照群

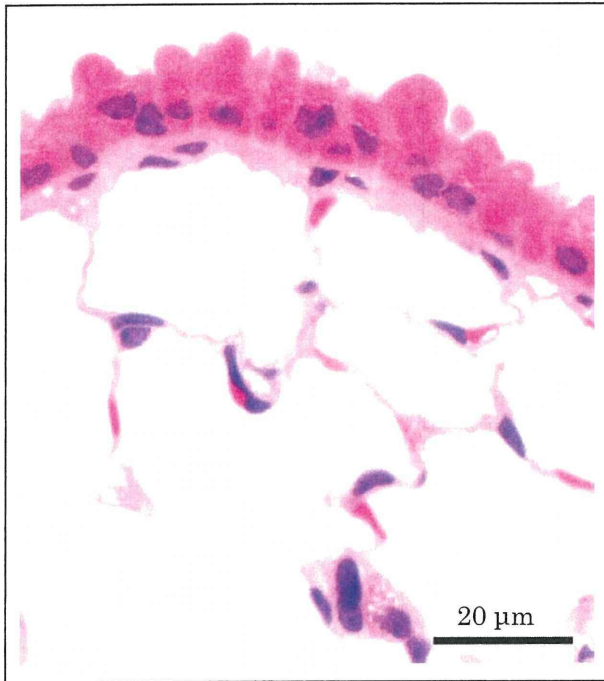
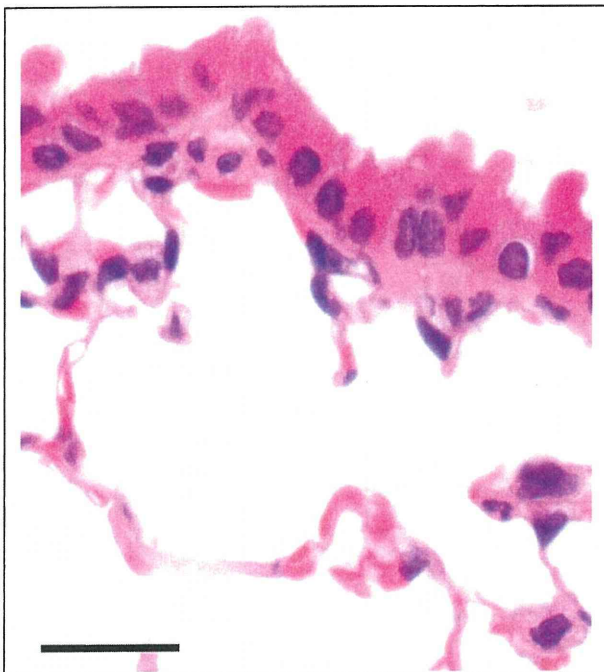


図 4. 本分担研究、対照群の肺、顕微鏡用スクリーニングサンプル  
ヘマトキシリン・エオジン染色



20 μm

図 5. 常法により作製した対照群の肺の病理組織標本、  
ヘマトキシリン・エオジン染色

表1 体重推移 (ホルムアルデヒド:22時間/日×28日間)

Exp. Group	Number of animals	Exposure		
		0	4	7 (day)
Control	6	25.4 ± 0.6	25.2 ± 0.9	25.7 ± 1.3
0.1 ppm	6	25.4 ± 0.6	25.2 ± 0.7	24.8 ± 0.9
0.3 ppm	6	25.4 ± 0.5	24.5 ± 0.5	24.8 ± 0.6
1.0 ppm	6	25.1 ± 0.6	24.7 ± 0.5	24.4 ± 0.6

Exp. Group	Number of animals	Exposure		
		11	14	18 (day)
Control	6	25.3 ± 0.8	26.0 ± 0.7	26.0 ± 0.6
0.1 ppm	6	25.0 ± 0.6	25.0 ± 1.0	25.5 ± 0.7
0.3 ppm	6	24.9 ± 0.5	25.2 ± 0.5 *	25.6 ± 0.4
1.0 ppm	6	24.5 ± 0.4	24.7 ± 0.6 **	25.1 ± 0.5 *

Exp. Group	Number of animals	Exposure		
		21	25	28 (day)
Control	6	26.3 ± 0.8	27.2 ± 0.6	27.5 ± 1.0
0.1 ppm	6	25.7 ± 0.9	26.4 ± 0.6	27.2 ± 0.5
0.3 ppm	6	26.0 ± 0.7	26.6 ± 0.9	27.0 ± 1.1
1.0 ppm	6	25.7 ± 0.5	25.8 ± 0.8 **	26.5 ± 0.7

平均値±標準偏差 (\* P<0.05, \*\* P<0.01)

表2 摂餌量推移 (ホルムアルデヒド:22時間/日×28日間)

Exp. Group	Number of animals	Exposure		
		4	7	11 (day)
Control	6	4.4 ± 0.3	3.7 ± 0.4	3.9 ± 0.2
0.1 ppm	6	4.4 ± 0.4	3.4 ± 0.2	3.8 ± 0.2
0.3 ppm	6	4.0 ± 0.2 *	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.2
1.0 ppm	6	4.3 ± 0.2	3.1 ± 0.3 **	3.4 ± 0.2 **

Exp. Group	Number of animals	Exposure		
		14	18	21 (day)
Control	6	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.1	3.4 ± 0.3
0.1 ppm	6	3.3 ± 0.3	4.0 ± 0.2	3.3 ± 0.3
0.3 ppm	6	3.3 ± 0.3	4.1 ± 0.2	3.4 ± 0.2
1.0 ppm	6	3.1 ± 0.3	3.7 ± 0.2 *	3.0 ± 0.2 *

Exp. Group	Number of animals	Exposure	
		25	28 (day)
Control	6	4.0 ± 0.2	3.3 ± 0.2
0.1 ppm	6	4.1 ± 0.1	3.4 ± 0.2
0.3 ppm	6	4.0 ± 0.2	3.5 ± 0.7
1.0 ppm	6	3.6 ± 0.3	3.1 ± 0.2

平均値±標準偏差 (\* P<0.05, \*\* P<0.01)