

201236009A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 25(2013)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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 25(2013)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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 25 (2013) 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 —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—	
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 11
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 —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—	
慶長 直人 91
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 97
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 107
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 125
IV. 研究成果の刊行物・別刷 127

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 24 年度 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)

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

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、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と実験動物で検出可能な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は困難である事が指摘されてきた。この点に対し先行研究「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」（厚労科研費・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」が掲げる物質について、器質的变化が誘発される以前の段階（時間的及び濃度的に）での遺伝発現変動を網羅的に評価可能な Percellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。

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（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、多臓器関連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。

計画通り、平成 24 年度はキシレン（指針値：0.2 ppm）について目標通りに極低濃度下（キシレン：0、0.2、0.7、2.0 ppm）での 6 時間/日 x 7 日間反復、及び 22 時間/日 x 7 日間マウス反復吸入暴露実験を実施し（北嶋）、経時的に採取した海馬を含む臓器サンプルの遺伝子発現変動を網羅的に解析した（菅野）。昨年度検討し

たホルムアルデヒド暴露の際と同様に、22 時間/日 x 7 日間反復暴露時の海馬において、神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) (Arc, Nr4a1, Fos, Junb, Egr4 遺伝子等) の発現が強く抑制され、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。また、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、暴露が中断されると神経活動が過剰となるリバウンドが起こる事が示唆された。他方、6 時間/日 x 7 日間反復暴露の場合では、この抑制は一過性であり暴露期間中に回復していた。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、脳組織の網羅的遺伝子発現解析手法により、その中枢神経に対する影響を予測することが可能である事が明らかとなった。この暴露条件下で海馬の神経活動の抑制所見は、シックハウス症候群の「不定愁訴」の分子実態の一端を明らかにしたものと考える。並行して、キシレン 22 時間/日 x 28 日間暴露時の肺の電子顕微鏡による形態解析を進めている (大西)。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、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、平成 24 年度は、分泌される多数の生理活性因子の同時定量を行い、両者の複合効果について検討している (慶長)。以上、ほぼ計画通りに進捗している。

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。

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、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と実験動物で検出可能な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は困難である事が指摘されてきた。この点に対し先行研究「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」(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」が掲げる物質について、器質的变化が誘発される以前の段階(時間的及び濃度的に)での遺伝発現変動を網羅的に評価可能な Percellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。

この成果を踏まえ、本研究の目的は、第一に、極低濃度の比較的長期暴露時 (28 日間) の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、この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倦怠感・疲労感等の「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、その後の超微形態解析等の標的の絞り込みを行う。

本研究により、1) 先行研究では検討対象外とした形質変化を比較的長期の曝露の際に観測する事が期待される。短い(1-7日間)曝露により発現が誘導された遺伝子と、比較的長期の曝露による肺の形質変化の関係、即ち形態学的に有害性が実証される事、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、が期待される。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

「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、先行研究にて確立した極低濃度下の吸入曝露条件、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、本研究では、長期間の吸入曝露後の電子顕微鏡等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。独自開発にな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て行く。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曝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)、吸入曝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曝露による毒性確認に関する研究(大西)。

平成24年度はキシレン(指針値:0.2ppm)について、室内濃度指針値を考慮した極低濃度下でマウスに吸入曝露し検討した。以下に実験方法の概要を示す。

トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験:

12週齢の雄性C57BL/6Jマウスを対象とした吸入曝露試験(4用量、16群構成、各群3匹)を、先行研究での曝露条件である6時間/日x7日間反復曝露(=労働曝露モデル)、及び22時間/日x7日間反復曝露(=生活曝露モデル)の2種類のプロトコールにより実施する。採取組織は先行研究時の肺・肝に加え、脳4部位(海馬、皮質、脳幹、小脳)とする。キシレンは先行研究と同じく、位置異性体であるo-、m-及びp-体の混合キシレン(それぞれ23.1、38.0及び16.8%[構造異性体エチルベンゼン13.2%含有]、和光純薬工業)を使用した。ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、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、捕集管を用いる方法で測定した。

評価システムの構築: 雄性マウスに経気道的に、6時間/日x7日間反復曝露(6、22、70、166時間後に観測)、及び22時間/日x7日間反復曝露(22、70、166、190時間後に観測)(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。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報をすでに開発済みの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、脳・肺・肝の多臓器連関の解析及びインフォマティクス構築を進めた。

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 を使用した。

形態観察のための極低濃度暴露下での長期暴露実験：雄性マウスを対象とした 28 日間の反復全身吸入暴露実験（1 日あたり 22 時間暴露）（4 用量、4 群構成、各群 6 匹）を実施し、その際の肺について、透過型電子顕微鏡（TEM）による超微細形態学的検索をおこなった。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、気道（肺内気管支～終末細気管支）から肺泡まで連続して追うことができるよう、主気管支の走行に沿った位置で 0.8mm 幅の肺の全割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。セミシン切片（厚さ 1 μm ）を作製・鏡検して電顕検索部位の絞り込みを行い、標的とする部分につきウルトラマイクロトームで厚さ 100nm の超薄切片を作製して TEM 観察に供した。

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、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いる *in vitro* 暴露解析実験を実施した。「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。複合影響実験では、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 $\mu\text{g/ml}$ ）存在下、24 時間後にホルムアルデヒド（10 μM ）を添加 3 時間後に細胞を回収し、遺伝子発現解析のための RT-PCR 及びシグナル伝達分子リン酸化検出のための western blotting に供した。培養上清に分泌される生理活性物質については、Bio-Plex サスペンションアレイシステム（BIO-RAD 社）を用い、27 種類のサイトカイン等の因子を選択し同時測定を行なった。

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

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（北嶋）：

平成 24 年度はキシレン（指針値：0.2 ppm）について、目標通りに極低濃度下（0、0.2、0.7、2.0 ppm）での、肺の形態観察の為の 22 時間/日 \times 28 日間反復（4 用量、4 群構成、各群 6 匹）、及びトキシコゲノミクスの為の 6 時間/日 \times 7 日間反復と 22 時間/日 \times 7 日間マウス反復吸入暴露実験（4 用量、16 群構成、各群 3 匹）を実施した。いずれの場合も、目標濃度に対し 97～102% の濃度で暴露できた。

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（菅野）：

平成 24 年度はキシレン（指針値：0.2 ppm）を対象とした極低濃度下（0、0.2、0.7、2.0 ppm）、雄性マウスに吸入暴露（4 用量にて、6 時間/日 \times 7 日間反復暴露 [6、22、70、166 時間後に観測] と 22 時間/日 \times 7 日間反復暴露 [22、70、166、190 時間後に観測]）させ、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。

解析の結果、「海馬」において[22時間/日 x 7日間]反復暴露時に、驚く事に昨年度検討したホルムアルデヒド吸入暴露の場合と同様に、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、それぞれ経時的に同様な発現パターンを示しながら低用量群、すなわち指針値レベルの濃度でも認められた。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。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る場合が多く、また6時間x7日間反復暴露の場合では、このIEGの抑制は一過性であり暴露期間中に回復していた(6時間暴露の16時間後には回復)。これもホルムアルデヒド吸入暴露の場合と同様であった。一方「肝」では、酸化ストレス、アポトーシスを含め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。「肺」については解析中であり、平成24年度内に終了予定である。

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(大西):

平成24年度はキシレン(指針値:0.2ppm)を対象とし、極低濃度下(0、0.2、0.7、2.0ppm)、22時間/日x28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。予備検討に手間取り技術基盤の確立に時間を要したが確立でき、平成24年12月に暴露が終了し、得られた肺サンプルについて解析を開始した。

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(慶長):

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、平成24年度はさらに、分泌される多数の生理活性因子の同時定量を行い検討している。

D. 考察

以上の通り、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、平成24年度はキシレン(指針値:0.2ppm)について、目標通りに極低濃度下(0、0.2、0.7、2.0ppm)での、肺の形態観察のための22時間/日x28日間反復、及びトキシコゲノミクスのための6時間/日x7日間反復と22時間/日x7日間マウス反復吸入暴露実験を実施した。

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、昨年度検討したホルムアルデヒド、及び今年度検討したキシレン両物質ともに、[22時間/日x7日間]反復暴露では暴露期間中、神経活動の指標となるIEGの発現が強く抑制され、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。いずれのIEGの遺伝子も経時的に同様な発現パターンを示したことから、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の遺伝子の発現は皆、Po1 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為、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。また、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、暴露が中断されると神経活動が過剰となるリバウンドが起こる事が示唆された。一方、6 時間/日暴露の 16 時間後には IEG の発現減少は回復が認められるものの、両物質ともに、少なくとも 6 時間暴露により IEG の発現抑制が誘発されることが明らかとなった。

したがって、ホルムアルデヒド、キシレン双方ともに、指針値レベルの極低濃度の暴露により、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。この機序として、化学構造上、両化学物質は異なっている事から、同一の標的分子を介する可能性は低いものと考ええるが、異なった標的分子に作用したとしても最終的には共通する因子により、IEG の発現減少が誘発される可能性が考えられた。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。

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考ええる。

E. 結論

このように、シックハウスレベルの極低濃度暴露により、ホルムアルデヒド、キシレン共に、生活暴露モデルである 22 時間/日 x 7 日間反復暴露により、神経活動の指標となる

IEG (Arc, Nr4a1, Fos, Junb, Egr4 遺伝子等) の発現が強く抑制され、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。すなわち、シックハウスレベルの極低濃度暴露に於いて、脳組織の網羅的遺伝子発現解析手法により、その中枢神経に対する影響を予測することが可能である事が明らかとなった。この暴露条件下で海馬の神経活動の抑制所見は、本研究の第二の目的であるシックハウス症候群の「不定愁訴」の分子実態の一端を明らかにしたものと考える。第一の目的に向けた 28 日間暴露時の肺の電子顕微鏡による形態解析は遅れているが、平成 24 年度内には解析が終了する見込みであり、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ができるものと考ええる。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。平成 25 年度も引き続き、シックハウス症候群に関わる化学物質について検討し、得られた成果をさらに補強する。

これらの検討を通して、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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.
- Asano K, Tryka E, Cho JS, Keicho N. Macrolide therapy in chronic inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2012: 692352., 2012.
- Hijikata M, Shojima J, Matsushita I, Tokunaga K, Ohashi J, Hang NTL, Horie T, Sakurada S, Hoang NP, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. *Hum Genet* 131 (5): 675-682, 2012.
- Keicho N, Matsushita I, Tanaka T, Shimbo T, Hang NT, Sakurada S, Kobayashi N, Hijikata M, Thuong PH, Lien LT. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: markers of metabolism and inflammation. *PLoS One* 7 (6): e38703, 2012.
- Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens* 79 (3): 190-197, 2012.
- Noguchi S, Hamano E, Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Nagase T, Keicho N. Differential effects of a common splice site polymorphism on the generation of OAS1 variants in human bronchial epithelial cells. *Hum Immunol* 74 (3): 395-401, 2013.
- Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Nagase T, Keicho N. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics* 65 (2): 107-114., 2013.
- Sakurada S, Hang NT, Ishizuka N, Toyota E, Hung LD, Chuc PT, Lien LT, Thuong PH, Bich PT, Keicho N, Kobayashi N. Inter-rater agreement in the assessment of abnormal chest X-ray findings for tuberculosis between two Asian countries. *BMC Infect Dis* 12 (1): 31, 2012.
- Sapkota BR, Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Ieki R, Kobayashi N, Toyota E, Nagai H, Kurashima A, Tokunaga K, Keicho N. Association of SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms with pulmonary Mycobacterium avium complex (MAC) infection. *Hum immunol* 73 (5): 529-536, 2012.
- Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y. (2012) Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase. *Diabetes*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]
- Abe S, Kurata M, Suzuki S, Yamamoto K, Aisaki K, Kanno J, Kitagawa M. (2012) Minichromosome maintenance 2 bound with

retroviral Gp70 is localized to cytoplasm and enhances DNA-damage-induced apoptosis. PLoS One. 7(6):e40129.

Swedenborg E, Kotka M, Seifert M, Kanno J, Pongratz I, Rüegg J. (2012) The aryl hydrocarbon receptor ligands 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3-methylcholanthrene regulate distinct genetic networks. Mol Cell Endocrinol.; 362(1-2):39-47. doi: 10.1016/j.mce.2012.05.006

Fujimoto H, Woo GH, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M. (2012) Increased cellular distribution of vimentin and Ret in the cingulum induced by developmental hypothyroidism in rat offspring maternally exposed to anti-thyroid agents. Reprod Toxicol. 34(1):93-100.

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

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、菅野 純、食品の安全性確認に向けた Percellome トキシコゲノミクスの適用-香料エストラゴールの場合-、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012. 7. 17)

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Katsuhide IGARASHI and Jun KANNO, Application of Percellome Toxicogenomics approach to food safety in case of a flavor, estragole, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012. 7. 20) Sendai, Symposium

種村健太郎、古川佑介、大塚まき、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、佐藤英明、菅野純、発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢影響解析-幼弱期マウスへのイボテン酸投与による成熟期の脳高次機能障害について-、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012. 7. 17)

北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一、菅野 純、Percellome 網羅的定量的トキシコゲノミクス、平成 24 年度公益社団法人日本実験動物学会 維持会員懇談会 (2012. 11. 16)

Hijikata M, Yen NTB, Hang NTL, Hong NT, Sakurada S, Lan gN, Kobayashi N, Dung NH, Keicho N. Immune gene expression levels in the peripheral blood from patients with multidrug-resistant tuberculosis and their association with treatment outcome. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2011, Feb 12, 2012, Kobe, Japan, 2012.

Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Kaburagi Y, Kobayashi N, Keicho N. Study of biomarker in patients with active tuberculosis by peptidome analysis. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2011, Feb 12, 2012, Kobe, Japan, 2012.

松下育美、土方美奈子、伊藤秀幸、慶長直人ヒト気道上皮細胞系による微生物関連物質の低濃度曝露下でのホルムアルデヒド毒性応答メカニズムに関する検討. 第 52 回日本呼吸器学会, 4 月 20-22 日, 神戸, 2012

Hijikata M, Hang NTL, Yen NTB, Hong NT, Sakurada S, Lan NN, Kobayashi N, Dung NH, Keicho N. Association between Immune Gene Expression Levels in the Whole Blood from Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis and Their Treatment Outcome. In: 第 52 回日本呼吸器学会総会, 4 月 20 日-22 日, 神戸, 2012.

Jun Kanno, Modernization and Harmonization of Toxicology; an Approach by Percellome Toxicogenomics, 2012 Global Summit on Regulatory Science - Modernizing Toxicology (2012. 5. 11) Hangzhou, People's Republic of China, Invited

菅野 純、Percellome Project: 組織、臓器、種を跨いで、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012. 7. 17)

菅野 純、創薬とトキシコゲノミクスー Percellome Project の進捗とその応用性ー、医薬基盤研究所公開セミナー、大阪、2012 年 10 月 30 日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

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-

分担研究課題：「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」

研究分担者 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

研究協力者 小川幸男 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

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、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と実験動物で検出可能な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は困難である事が指摘されてきた。この点に対し先行研究「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」（厚労科研費・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」が掲げる物質について、器質的変化が誘発される以前の段階（時間的及び濃度的に）での遺伝発現変動を網羅的に評価可能なPercellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。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。本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、形態観察のための長期暴露実験、すなわち22時間/日 x 28日間反復暴露のプロトコールにより実施し、加えて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日間反復暴露及び22時間/日 x 7日間反復暴露の2種類のプロトコールにより実施する。

平成24年度（今年度）は、キシレン（混合キシレン）（指針値：0.2 ppm）について極低濃度下（0、0.2、0.7及び2.0 ppm）での6時間/日 x 7日間反復、22時間/日 x 7日間反復、及び22時間/日 x 28日間反復吸入暴露をマウスに対して実施した。その結果、0.2、0.7および2.0ppmの目標暴露濃度に対して、前二者の場合は、22℃でバブリングにより気化させる方法により、それぞれ平均0.204、0.703、2.03ppm及び0.203、0.701、2.03 ppm、後者のプロトコールでは、23℃に加熱することにより気化させる方法（加熱バブリング法）により、0.196、0.681、1.981 ppmと、ほぼ目標暴露濃度にて、キシレンをマウスに安定して吸入暴露することができた。

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、気化性化学物質の吸入毒性の内、シックハウス症候群については、人における被害報告濃度と実験動物で検出可能な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は困難である事が指摘されてきた。この点に対し先行研究「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」(厚生科研費・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」が掲げる物質について、器質的变化が誘発される以前の段階(時間的及び濃度的に)での遺伝発現変動を網羅的に評価可能な Percellome トキシコゲノミクスを極低濃度暴露時の肺及び肝に適用した結果、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響を高感度に捕捉することができた。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。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、形態観察のための長期暴露実験、すなわち22時間/日 x 28日間反復暴露のプロトコールにより実施し、加えて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日間反復暴露及び22時間/日 x 7日間反復暴露の2種類のプロトコールにより実施する。今年度は、キシレン(混合キシレン)(指針値: 0.2ppm)について室内濃度指針値を考慮し、0.2、0.7及び2.0 ppmを目標暴露濃度として極低濃度吸入暴露を実施した。

B. 研究方法

B-1: 被験物質

キシレン(Xylene; 分子量: 106.17、CAS No.: 1330-20-7)は、下記の試薬を使用した。

製造元: 和光純薬工業株式会社

試薬名: キシレン

カタログ番号: 244-00081 (3Lガロン瓶)

ロット番号: TGP8162

沸点 : 144 °C (*o*-体)、139.3 °C (*m*-体)、137~138°C (*p*-体)

蒸気圧: 0.7kPa(*o*-体、20°C)、0.8kPa(*m*-体、20°C)、0.9kPa(*p*-体、20°C)

比重 : 0.8801(*o*-体、20°C/4°C)、0.8684(*m*-体、15°C/4°C)、0.86104(*p*-体、20°C/4°C)

使用した被験物質の特性をガスクロマトグラフ法により確認し、その結果を図1-1~図1-5に示した。図1-1に*o*-キシレン標準品、図1-2に*m*-キシレン標準品、図1-3に*p*-キシレン標準品、図1-4にエチルベンゼン標準品及び図1-5に被験物質のキシレンのクロマトグラムをそれぞれ示した。この結果、被験物質中の分離した4つのピークは、先頭から、エチルベンゼン、*p*-キシレン、*m*-キシレン及び*o*-キシレンの順で溶出し、被験物質のそれぞれのピークは各標準品のピークと保持時間が一致し、被験物質として用いたキシレンは、エチルベンゼン、*p*-キシレン、*m*-キシレン及び*o*-キシレンを含有することが確認された。

B-2: キシレンの吸入暴露システム

B-2-1: 6時間/日 x 7日間反復及び、22時間/日 x 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。

吸入暴露装置のシステムを図2に示した。吸入暴露装置は、①キシレンガスの発生装置(図2のA(破線内))、②発生および希釈空気の流量制御装置(図2のB、C)、③一次希釈したキシレンガスを各濃度の吸入チャンバーへ定量供給するフローコントロールバルブと浮子式流量計(図2のD)④一次希釈したキシレンガスをさらに新鮮空気と混合・希釈するためのラインミキサー(図2のE)、⑤動物をキシレンガスに暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー(図2のF)、⑥濃度測定のためのサンプリング装置(図2のG)を作製した。

吸入チャンバーは全身暴露型であり、上部と下部が角錐状の角型チャンバーで観察窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1,060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。吸入チャンバーは、各群(0.2 ppm暴露群、0.7 ppm暴露群、2.0 ppm暴露群および対照群)につき1台、計4台を用いた。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全

面がステンレス製の金網であり、5連ケージ（1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H)mm）を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

B-2-2: 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。

キシレンガスの発生法は先行研究での検討の結果、もっとも安定して発生する事ができる、バブリングにより発生させる装置(柴田科学、Photo 1)を用いてガスを発生する方法を採用した。23℃に加温した発生装置内タンクへキシレン(%)、和光純薬)を入れ、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(柴田科学、Photo 1)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濃度まで低下させ、ステンレス製網ケージ(柴田科学、Photo 3)内に収容したマウスに1日あたり22時間(午後12時より午前10時まで)、28日間吸入暴露した。本研究で以後使用するチャンバーは、横層流型(容積3 m³、Photo 1)とし、チャンバー内にサーキュレーター(Photo 3)を設置し強力に空気を攪拌した状態で動物への暴露を行うこととした。

B-3: キシレンガスの発生方法

B-3-1: 6時間/日 x 7日間反復及び22時間/日 x 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。

キシレンガスの発生については、キシレンを一定温度下(22℃)でバブリングする方法でキシレンガスを作製した。この時、不要なキシレンを取り除く為に冷却(17℃)し、さらに再加熱(23℃)することで一定濃度のキシレンガスを得た。吸入チャンバーの換気流量は212 L/minでバブリングに使用した発生空気は1.0 L/min、希釈空気は10 L/minとして一定量(0.15 L/分、0.5 L/分、1.65 L/分)のキシレンガスを吸入チャンバーに送気して、目的濃度を作製した。(表1)

B-3-2: 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。

発生方法については、先行研究での検討の結果、キシレンガスの低濃度を安定的に得られるバブリング方式が最適であったため、この手法を選択した。キシレンガスは、キシレンをバブリングすることで目標濃度を達成することが可能であった。発生流量を0.7L/分とし、供給流量はチャンバー内濃度測定結果を考慮し調整し、目標濃度2.0ppmに対して1.65~1.79L/分、0.7ppmには0.42~0.49L/分、0.2ppmには0.11~0.12L/分とし、一次希釈流量25L/分及びチャンバー換気流量650L/分で希釈し暴露した。

B-4: キシレンの吸入チャンバー内の濃度測定の方法

B-4-1: 6時間/日 x 7日間反復及び22時間/日 x 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。

B-4-1-A: 被験物質の捕集方法

サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学製)を用い、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管(ORBOTM-91 Tube, Extra-Large, SUPELCO社製)を吸入チャンバー内に挿入し、6時間及び22時間、吸入チャンバー内のキシレンを捕集した。

B-4-1-B: 捕集管の前処理及び分析条件

捕集管で捕集したキシレンは、捕集管内の活性炭(1層及び2層)を取り出し、各々、バイアルびん(柴田科学株式会社製)に入れ、二硫化炭素(和光純薬工業株式会社製、作業環境測定用)を加え、蓋をしてダイレクトミキサー(サーマル化学産業株式会社製)を用いて振とうした。各濃度の活性炭1層の抽出液は、検量線の所定の範囲に入るように希釈した。その後、バイアルびん(Agilent Technologies社製)に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ(Agilent Technologies社製 HP5890A)より分析を実施した(図3)。GCの分析条件は、カラムはXylene Master(0.32mmφ×50m)、キャリアーガスはヘリウム、検出器はFIDを用い、カラム温度は65℃、注入口温度は200℃、検出器温度は200℃、試料注入量は1μLとした。なお、先行研究ではキシレンのm-とp-体及び不純物であるエチルベンゼンのそれぞれの単独の濃度は測定できなかったが、本実験ではガスクロマトグラフ用のカラムにXylene Master(信和化工株式会社)を採用した(図4)。この事により、これら3種の異性体に加えて不純物であるエチルベンゼンの各濃度が測定できる様になった(図5)。

B-4-2: 22時間/日 x 28日間反復実験の場合:

被験物質の捕集の部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施し、捕集管の前処理及び分析は、日本バイオアッセイ研究センターに依頼した。

キシレンガスの濃度検知は、チャンバー内濃度について、定流量ポンプ (MP Σ -30、MP Σ -300 (柴田科学)、Photo 4) により活性炭捕集管 (8015-0532JUMBO、柴田科学社)へチャンバー内空気を通し、捕集管内に充填されている活性炭にキシレンガスを吸着させ、溶媒 (二硫化炭素) で抽出し、ガスマスを用いてその濃度を測定する、「シックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会」が推奨する方法によりおこなった。捕集管流量は、対照群及び0.2ppm暴露群では500mL/分 [660L]、0.7ppmおよび、2.0ppm暴露群では100mL/分 [132.0L]とした。22時間/日 x 28日間暴露に際し、暴露期間中毎日、マウスへの22時間暴露中のチャンバー内空気を捕集した捕集管を測定機関 (日本バイオアッセイ研究センター) に送付し、分析を依頼した。

(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、所属する研究機関の指針を遵守した。

C. 研究結果及び考察

C-1: 6時間/日 x 7日間反復及び22時間/日 x 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。

試作したキシレンの吸入暴露装置を図2に示した。

C-1-A: キシレンの濃度制御の方法の検討

目標吸入暴露濃度である 0.2、0.7 および 2.0 ppm に濃度制御する方法について、キシレンガスの発生装置へ送るバブリングのための発生空気の流量、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。

なお、一次希釈空気の流量は 10 L/分とした。また、一次希釈したキシレンガス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、0.2 ppm 暴露群が 0.15 L/分、0.7 ppm 暴露群が 0.5 L/分、2.0 ppm 暴露群が 1.65 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。

各設定条件の試運転により、下記の結果を得た (表 1)。

検討 1: 発生空気の流量を 1.0 L/分、恒温槽の温度を 22°C、キシレンガスの再加熱温度を 23°Cとし、6時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.2、0.7 および 2.0 ppm の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.211 ppm (目標濃度に対し 106%)、0.742 ppm (目標濃度に対し 106%) および 2.09 ppm (目標濃度に対し 105%) であった。全ての群で目標濃度よりやや高値であった。

検討 2: 22 時間暴露での有効性を確認するために、検討 2 と同条件で 22 時間の暴露運転を行った。その結果、目標吸入暴露濃度 0.2、0.7 および 2.0 ppm の吸入チャンバーの実測値は、それぞれ 0.220 ppm (目標濃度に対し 110%)、0.699 ppm (目標濃度に対し 99%) および 2.02 ppm (目標濃度に対し 101%) であり、22 時間暴露では、0.2 ppm 群は目標値よりやや高値であるが他の濃度群では目標濃度に近似した値が得られることを確認した。

C-1-B: 吸入チャンバー内のキシレンの濃度測定

目標吸入暴露濃度 0.2、0.7 および 2.0 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。その結果、各濃度とも6時間および22時間採気の両者で捕集管2層目へのキシレンの移行は認められず、破過はなかった。また、同時に採気した3本の捕集管の測定値は、各濃度とも15%以内であり、安定した結果が得られた。

具体的には、6時間の暴露運転で目標吸入暴露濃度 0.2、0.7 及び 2.0 ppm の吸入チャンバーの実測値 (以下、平均値 \pm 標準偏差) がそれぞれ 0.204 \pm 0.004 (0.199 - 0.210 ppm) (目標濃度に対し 102%)、0.703 \pm 0.027 (0.678 - 0.747 ppm) (目標濃度に対し 100%) および 2.03 \pm 0.08 (1.95 - 2.17 ppm) (目標濃度に対し 102%)、22時間の運転でも目標吸入暴露濃度 0.2、0.7 および 2.0 ppm の吸入チャンバーの実測値がそれぞれ 0.203 \pm 0.005 (0.195 - 0.208 ppm) (目標濃度に対し 102%)、0.701 \pm 0.011 (0.686 - 0.715 ppm) (目標濃度に対し 100%) および 2.03 \pm 0.06 (1.96 - 2.11 ppm) (目標濃度に対し 102%) になり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた (図 7A, B)。従って、キシレンの室内濃度指針値

である0.2 ppmを考慮した0.2、0.7および2.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた。

C-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。

先行研究での検討結果を踏まえて、発生流量を0.7L/分とし、供給流量はチャンバー内のキシレン濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度2.0ppmに対して1.65~1.79L/分、0.7ppmには0.42~0.49L/分、0.2ppmには0.11~0.12L/分とし、一次希釈流量25L/分及びチャンバー換気流量650L/分で希釈し暴露した。目標吸入暴露濃度0.2、0.7及び2.0 ppmの吸入チャンバーの実測値（以下、平均値±標準偏差、最小~最大値）はそれぞれ、0.196±0.014 ppm (0.168~0.225 ppm)、0.681±0.060 (0.566~0.823 ppm)、1.981±0.151 (1.799~2.373ppm)と、目標濃度に対しそれぞれ98%、97%、99%となり、各濃度群ともほぼ目標濃度が得られた。従って、加熱バブリング法によって、キシレンの室内濃度指針値である0.2 ppmを考慮した0.2、0.7および2.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた（図7C）。

また対照群チャンバー内にキシレンは検出されなかった。

・(環境省、2003)

環境省環境保健部環境安全課「平成14年度地方公共団体等における有害大気汚染物質のモニタリング調査結果（表7）」（2003）
http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/m_on_h14/hyo_07.html

・(国土交通省、2003)

国土交通省住宅局住宅生産課「平成14年度室内空気中の化学物質の実態調査の結果について（2003）」
http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha03/07/071219_.html

D. 結論

平成24年度（今年度）は、キシレン（指針値：0.2 ppm）について極低濃度下（0、0.2、0.7及び2.0 ppm）での6時間/日 x 7日間反復、22時間/日 x 7日間反復、及び22時間/日 x 28日間反復吸入暴露をマウスに対して実施したその結果、その結果、0.2、0.7および2.0ppmの目標暴露濃度に対して、前二者の場合は、22°Cでバブリング

により気化させる方法により、それぞれ0.204±0.004、0.703±0.027、2.03±0.08及び、0.203±0.005、0.701±0.011、2.03±0.06、後者のプロトコールでは、23°Cに加熱することにより気化させる方法（加熱バブリング法）により、0.196±0.014、0.682±0.060、1.98±0.15（平均値±標準偏差）と、目標暴露濃度に近似した値にて、キシレンをマウスに安定して吸入暴露することができた。平成25年度も引き続き、シックハウス症候群に関わる化学物質について検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、菅野 純、食品の安全性確認に向けた Percellome トキシコゲノミクスの適用-香料エストラゴールの場合-、第39回日本毒性学会学術年会（2012.7.17）

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Katsuhide IGARASHI and Jun KANNO, Application of Percellome Toxicogenomics approach to food safety in case of a flavor, estragole, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012.7.20) Sendai, Symposium

種村健太郎、古川佑介、大塚まき、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、佐藤英明、菅野 純、発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢影響解析-幼弱期マウスへのイボテン酸投与による成熟期の脳高次機能障害について-、第39回日本毒性学会学術年会（2012.7.17）

北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一、菅野 純、Percellome 網羅的定量的トキシコゲノミクス、平成24年度公益社団法人日本実験動物学会 維持会員懇談会（2012.11.16）