

3 試験成績

3-1 被験物質の特性

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。

3-2 吸入チャンバー内の被験物質濃度

吸入チャンバー内の被験物質濃度を表 4 に、不純物であるエチルベンゼン濃度を表 5 に示した。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標暴露濃度 0.2、0.7 及び 2 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、それぞれ 0.203 ± 0.005 ppm (0.195 ppm～0.208 ppm)、 0.701 ± 0.011 ppm (0.686 ppm～0.715 ppm) 及び 2.03 ± 0.06 ppm (1.96 ppm～2.11 ppm) であった。また、キシレンの不純物である吸入チャンバー内のエチルベンゼン濃度は、キシレンの目標暴露濃度 0.2、0.7 及び 2 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、それぞれ 0.0441 ± 0.0006 ppm (0.0429 ppm～0.0447 ppm)、 0.151 ± 0.003 ppm (0.147 ppm～0.155 ppm) 及び 0.435 ± 0.015 ppm (0.417 ppm～0.454 ppm) であった。

3-3 動物の生死及び一般状態

全ての動物が、定期解剖時まで生存した。また、いずれの動物も特記すべき一般状態の変化を認めなかった。

3-4 体重

解剖時の体重を表 6 に示した。

3-5 病理学的検査

3-5-1 剖検観察

肝、肺及び脳の剖検所見を表 7 に示した。

いずれの動物も特記すべき変化を認めなかった。

3-5-2 臓器重量

肝臓重量(g)を表 6 に示した。

3-5-3 病理組織学的検査

肝、肺及び脳の病理組織学的検査の結果を表 8 に示した。

いずれの動物も特記すべき変化を認めなかった。なお、動物番号 1202 の肝臓に、軽度の巣状壊死が認められたが、発生例数が 1 匹であり、かつ中間用量の 0.7ppm 群での変化であることから、被験物質であるキシレンの投与との関係は無いものと考えられた。

表 1 吸入チャンバー内環境の測定結果:温度(22時間暴露)

単位:°C

| チャンバー | CH-1 | CH-2 | CH-3 | CH-4 |
|-------|------|-----------|-----------|---------|
| 群 | 対照群 | 0.2 ppm 群 | 0.7 ppm 群 | 2 ppm 群 |
| 全期間 | | | | |
| 平均値 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 22.9 |
| 標準偏差 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 |
| 日別平均値 | | | | |
| 7月24日 | 23.0 | 23.1 | 23.1 | 23.0 |
| 7月25日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 22.9 |
| 7月26日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 23.0 |
| 7月27日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 22.9 |
| 7月28日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 22.9 |
| 7月29日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 23.0 |
| 7月30日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 22.9 |
| 7月31日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 23.0 |
| 8月1日 | 23.0 | 23.1 | 23.0 | 22.9 |

表 2 吸入チャンバー内環境の測定結果:湿度(22時間暴露)

単位:%

| チャンバー | CH-1 | CH-2 | CH-3 | CH-4 |
|-------|------|-----------|-----------|---------|
| 群 | 対照群 | 0.2 ppm 群 | 0.7 ppm 群 | 2 ppm 群 |
| 全期間 | | | | |
| 平均値 | 54.3 | 51.8 | 51.2 | 51.8 |
| 標準偏差 | 2.7 | 2.8 | 2.8 | 3.0 |
| 日別平均値 | | | | |
| 7月24日 | 55.0 | 53.4 | 53.0 | 53.6 |
| 7月25日 | 54.6 | 52.5 | 52.1 | 52.6 |
| 7月26日 | 54.4 | 52.2 | 51.5 | 52.1 |
| 7月27日 | 54.5 | 51.9 | 51.3 | 51.8 |
| 7月28日 | 54.4 | 51.7 | 51.1 | 51.6 |
| 7月29日 | 54.3 | 51.4 | 50.9 | 51.4 |
| 7月30日 | 54.1 | 51.2 | 50.7 | 51.2 |
| 7月31日 | 54.2 | 51.2 | 50.6 | 51.2 |
| 8月1日 | 53.2 | 50.3 | 49.7 | 50.3 |

表 3 吸入チャンバー内環境の測定結果:換気量と換気回数(22時間暴露)

単位:換気量 L/min 換気回数 回/時

| チャンバー 群 | CH-1 対照群 | | CH-2 0.2 ppm 群 | | CH-3 0.7 ppm 群 | | CH-4 2 ppm 群 | |
|------------|-------------|------|-------------------|------|-------------------|------|-----------------|------|
| | 換気量 | 換気回数 | 換気量 | 換気回数 | 換気量 | 換気回数 | 換気量 | 換気回数 |
| 全期間 | | | | | | | | |
| 平均値 | 213.7 | 12.1 | 213.8 | 12.1 | 212.7 | 12.0 | 213.5 | 12.1 |
| 標準偏差 | 0.4 | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.5 | 0.0 |
| 日別平均値 | | | | | | | | |
| 7月24日 | 214.0 | 12.1 | 213.0 | 12.1 | 213.3 | 12.1 | 213.2 | 12.1 |
| 7月25日 | 214.2 | 12.1 | 213.2 | 12.1 | 213.3 | 12.1 | 213.6 | 12.1 |
| 7月26日 | 213.9 | 12.1 | 213.2 | 12.1 | 212.7 | 12.0 | 213.7 | 12.1 |
| 7月27日 | 213.5 | 12.1 | 213.9 | 12.1 | 212.4 | 12.0 | 213.2 | 12.1 |
| 7月28日 | 213.6 | 12.1 | 214.0 | 12.1 | 212.6 | 12.0 | 213.4 | 12.1 |
| 7月29日 | 213.6 | 12.1 | 214.0 | 12.1 | 212.5 | 12.0 | 213.5 | 12.1 |
| 7月30日 | 213.7 | 12.1 | 214.1 | 12.1 | 212.5 | 12.0 | 213.7 | 12.1 |
| 7月31日 | 213.5 | 12.1 | 214.2 | 12.1 | 212.7 | 12.0 | 213.5 | 12.1 |
| 8月1日 | 213.3 | 12.1 | 214.1 | 12.1 | 212.9 | 12.1 | 213.0 | 12.1 |

表 4 吸入チャンバー内の被験物質濃度(22時間暴露)

| | 単位: ppm | | | |
|-----------------|---------|----------|----------|--------|
| | 対照群 | 0.2 ppm群 | 0.7 ppm群 | 2 ppm群 |
| 7月 24 日午後 0 時から | 0 | 0.201 | 0.694 | 2.03 |
| 7月 25 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 25 日午後 0 時から | 0 | 0.203 | 0.715 | 2.09 |
| 7月 26 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 26 日午後 0 時から | 0 | 0.195 | 0.698 | 2.11 |
| 7月 27 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 27 日午後 0 時から | 0 | 0.199 | 0.686 | 1.96 |
| 7月 28 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 28 日午後 0 時から | 0 | 0.208 | 0.707 | 2.02 |
| 7月 29 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 29 日午後 0 時から | 0 | 0.208 | 0.715 | 2.02 |
| 7月 30 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 30 日午後 0 時から | 0 | 0.207 | 0.692 | 1.97 |
| 7月 31 日午前 10 時 | | | | |
| 平均濃度 | 0 | 0.203 | 0.701 | 2.03 |
| 標準偏差 | 0 | 0.005 | 0.011 | 0.06 |

表 5 吸入チャンバー内のエチルベンゼン濃度(22時間暴露)

| | 単位: ppm | | | |
|-----------------|---------|----------|----------|--------|
| | 対照群 | 0.2 ppm群 | 0.7 ppm群 | 2 ppm群 |
| 7月 24 日午後 0 時から | 0 | 0.0444 | 0.151 | 0.441 |
| 7月 25 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 25 日午後 0 時から | 0 | 0.0447 | 0.155 | 0.452 |
| 7月 26 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 26 日午後 0 時から | 0 | 0.0429 | 0.152 | 0.454 |
| 7月 27 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 27 日午後 0 時から | 0 | 0.0437 | 0.147 | 0.417 |
| 7月 28 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 28 日午後 0 時から | 0 | 0.0447 | 0.151 | 0.431 |
| 7月 29 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 29 日午後 0 時から | 0 | 0.0442 | 0.152 | 0.429 |
| 7月 30 日午前 10 時 | | | | |
| 7月 30 日午後 0 時から | 0 | 0.0441 | 0.147 | 0.418 |
| 7月 31 日午前 10 時 | | | | |
| 平均濃度 | 0 | 0.0441 | 0.151 | 0.435 |
| 標準偏差 | 0 | 0.0006 | 0.003 | 0.015 |

表 6 解剖時体重及び肝臓重量(22時間暴露)

1 日目解剖

| 群 | 動物番号 | 解剖時体重(g) | 肝臓重量(g) |
|-----------|------|----------|---------|
| 対照群 | 1001 | 26.5 | 1.583 |
| | 1002 | 25.3 | 1.324 |
| | 1003 | 26.6 | 1.304 |
| 0.2 ppm 群 | 1101 | 25.7 | 1.415 |
| | 1102 | 25.5 | 1.376 |
| | 1103 | 28.1 | 1.073 |
| 0.7 ppm 群 | 1201 | 27.0 | 1.549 |
| | 1202 | 26.0 | 1.560 |
| | 1203 | 25.9 | 1.444 |
| 2 ppm 群 | 1301 | 25.5 | 1.384 |
| | 1302 | 27.3 | 1.452 |
| | 1303 | 27.2 | 1.441 |

3 日目解剖

| 群 | 動物番号 | 解剖時体重(g) | 肝臓重量(g) |
|-----------|------|----------|---------|
| 対照群 | 1004 | 25.7 | 1.242 |
| | 1005 | 28.6 | 1.590 |
| | 1006 | 25.2 | 1.234 |
| 0.2 ppm 群 | 1104 | 26.3 | 1.415 |
| | 1105 | 27.3 | 1.412 |
| | 1106 | 26.4 | 1.331 |
| 0.7 ppm 群 | 1204 | 28.0 | 1.591 |
| | 1205 | 25.8 | 1.190 |
| | 1206 | 24.9 | 1.300 |
| 2 ppm 群 | 1304 | 25.2 | 1.363 |
| | 1305 | 27.4 | 1.471 |
| | 1306 | 27.3 | 1.371 |

7 日目解剖

| 群 | 動物番号 | 解剖時体重 (g) | 肝臓重量 (g) |
|-----------|------|-----------|----------|
| 対照群 | 1007 | 25.4 | 1.226 |
| | 1008 | 27.9 | 1.602 |
| | 1009 | 27.2 | 1.446 |
| 0.2 ppm 群 | 1107 | 28.2 | 1.561 |
| | 1108 | 24.5 | 1.308 |
| | 1109 | 27.2 | 1.581 |
| 0.7 ppm 群 | 1207 | 25.7 | 1.283 |
| | 1208 | 27.9 | 1.598 |
| | 1209 | 26.6 | 1.507 |
| 2 ppm 群 | 1307 | 27.7 | 1.611 |
| | 1308 | 26.3 | 1.478 |
| | 1309 | 25.3 | 1.399 |

暴露終了翌日解剖

| 群 | 動物番号 | 解剖時体重 (g) | 肝臓重量 (g) |
|-----------|------|-----------|----------|
| 対照群 | 1010 | 26.8 | 1.362 |
| | 1011 | 27.2 | 1.349 |
| | 1012 | 25.7 | 1.283 |
| 0.2 ppm 群 | 1110 | 28.8 | 1.574 |
| | 1111 | 27.1 | 1.211 |
| | 1112 | 26.7 | 1.396 |
| 0.7 ppm 群 | 1210 | 27.3 | 1.487 |
| | 1211 | 26.3 | 1.400 |
| | 1212 | 28.1 | 1.529 |
| 2 ppm 群 | 1310 | 27.6 | 1.486 |
| | 1311 | 27.9 | 1.455 |
| | 1312 | 26.1 | 1.402 |

表 7 剖検所見(22時間暴露)

1日目解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|------|------|------|
| 対照群 | 1001 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1002 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1003 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1101 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1102 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1103 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1201 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1202 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1203 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1301 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1302 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1303 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

3日目解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|------|------|------|
| 対照群 | 1004 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1005 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1006 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1104 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1105 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1106 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1204 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1205 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1206 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1304 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1305 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1306 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

7日目解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|------|------|------|
| 対照群 | 1007 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1008 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1009 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1107 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1108 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1109 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1207 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1208 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1209 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1307 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1308 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1309 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

暴露終了翌日解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|------|------|------|
| 対照群 | 1010 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1011 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1012 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1110 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1111 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1112 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1210 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1211 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1212 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1310 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1311 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1312 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

表 8 病理組織所見(22時間暴露)

1日目解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|---------|------|------|
| 対照群 | 1001 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1002 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1003 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1101 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1102 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1103 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1201 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1202 | 軽度の巣状壊死 | 著変なし | 著変なし |
| | 1203 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1301 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1302 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1303 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

3日目解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|------|------|------|
| 対照群 | 1004 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1005 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1006 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1104 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1105 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1106 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1204 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1205 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1206 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1304 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1305 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1306 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

7日目解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|------|------|------|
| 対照群 | 1007 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1008 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1009 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1107 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1108 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1109 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1207 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1208 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1209 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1307 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1308 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1309 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

暴露終了翌日解剖

| 群 | 動物番号 | 肝臓 | 肺 | 脳 |
|-----------|------|------|------|------|
| 対照群 | 1010 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1011 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1012 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.2 ppm 群 | 1110 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1111 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1112 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 0.7 ppm 群 | 1210 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1211 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1212 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| 2 ppm 群 | 1310 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1311 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |
| | 1312 | 著変なし | 著変なし | 著変なし |

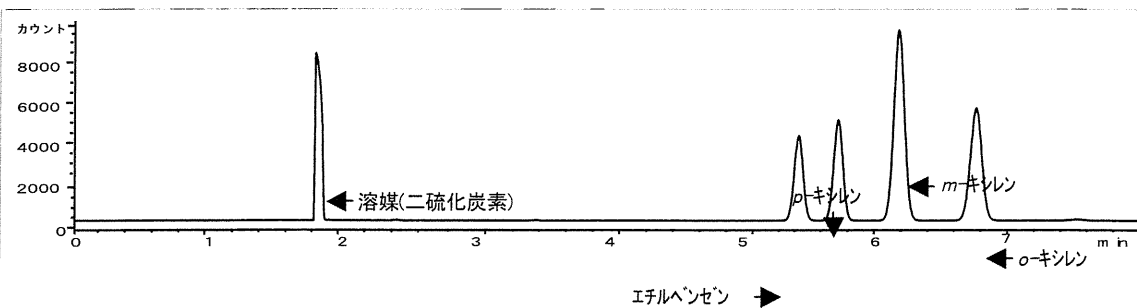
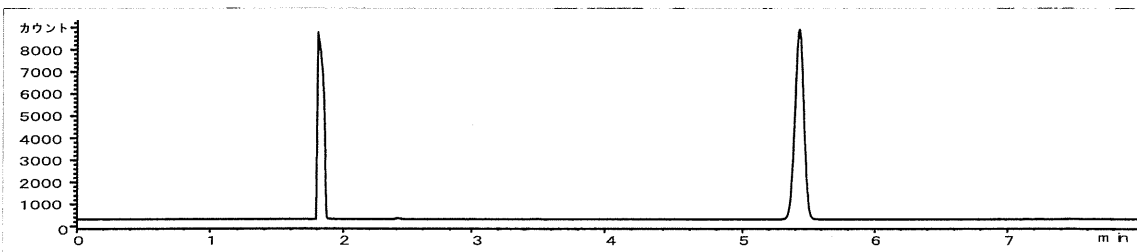
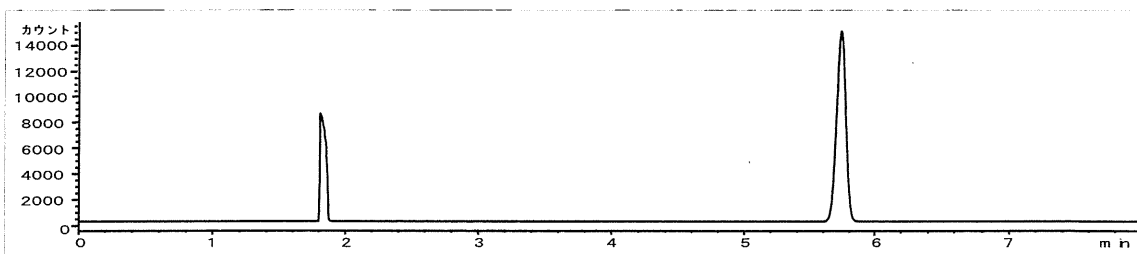
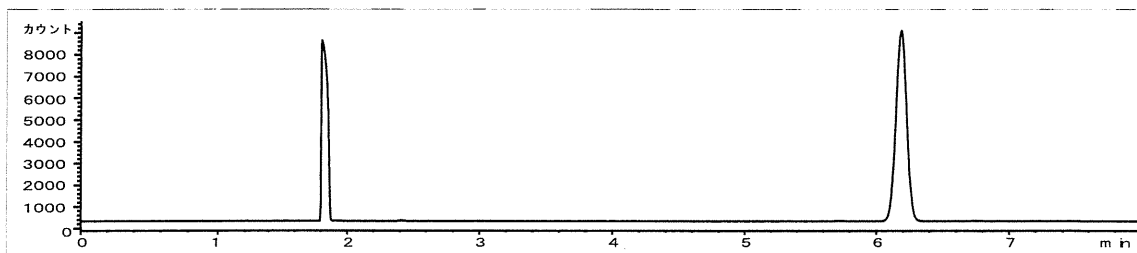
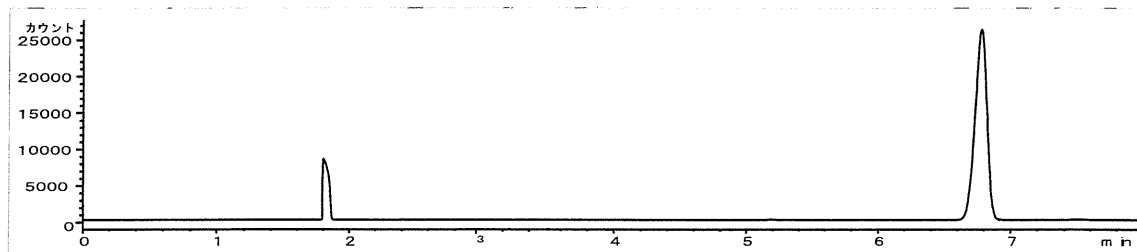
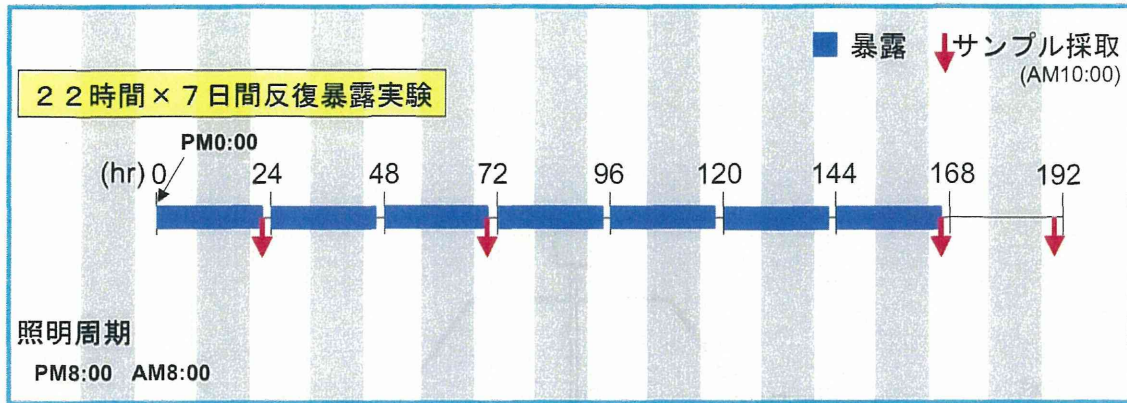


図 1-5 被験物質(キシレン ロット番号:TGP8162)



22時間 x 7日間反復暴露（投与22、70、166、190時間後に観測）[時刻：10時、10時、10時、10時]

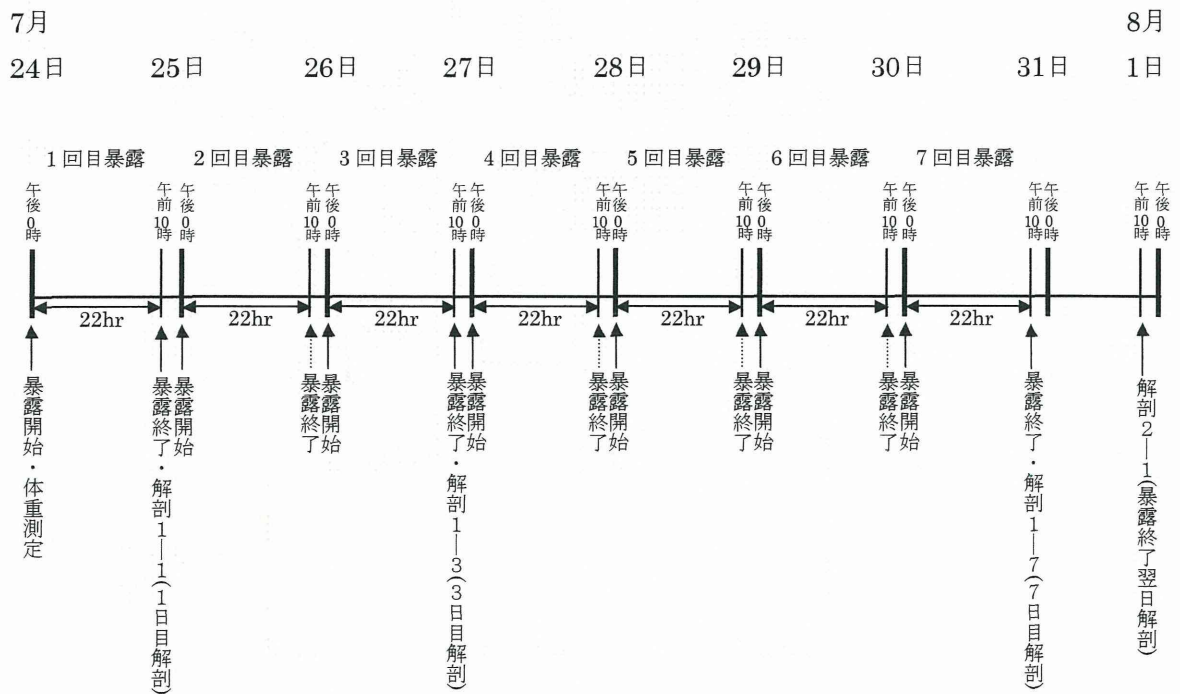


図 2 試験スケジュール(22時間暴露)

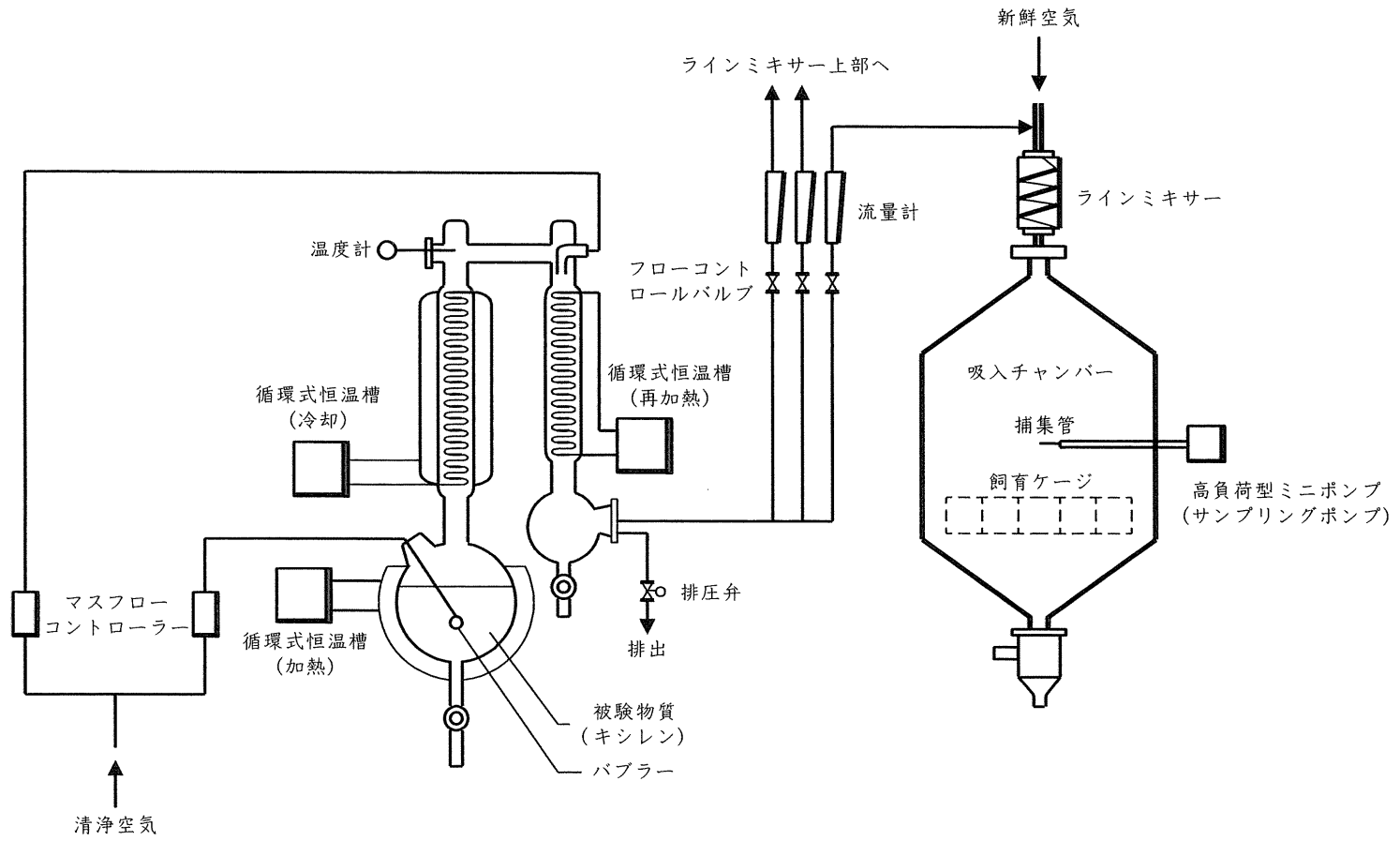


図 3 吸入装置のシステム

別紙-1-1

検査成績書

2012年5月30日
和光純薬工業株式会社

Code No. 244-00081

キシレン

| 規格／等級 | 和光特級 | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Lot No. | TGP8162 | |
| 数量 | 3L | |
| 検査項目 | 検査成績 | 規格値 |
| 外観 | 無色澄明の液体 | 無色澄明の液体 |
| 含量(o-,m-,p-キシレンの含量)(キャピラリーカラムGC) | 85.40% | 80%以上 |
| 吸光度 300nm | 1.0以下 | 1.0以下 |
| 吸光度 320nm | 0.2以下 | 0.2以下 |
| 吸光度 340nm | 0.05以下 | 0.05以下 |
| 吸光度 360nm~400nm | 0.01以下 | 0.01以下 |
| 水分 | 0.012% | 0.02%以下 |
| 酸(HClとして) | 0.001%以下 | 0.001%以下 |
| 塩基(NaOHとして) | 0.001%以下 | 0.001%以下 |
| 硫黄化合物 | 試験適合(Sとして約 6ppm以下) | 試験適合(Sとして約 6ppm以下) |
| チオフェン類 | 試験適合(C4H4Sと して約1ppm以下) | 試験適合(C4H4Sと して約1ppm以下) |
| 硫酸着色物質 | 試験適合 | 試験適合 |
| 検査年月日 | 2012/04/03 | |

| | | | |
|----|----|-------|------|
| 判定 | 合格 | 検査責任者 | 木村 誠 |
|----|----|-------|------|

成績書発行番号 S236120

別紙-1-2

被験物質であるキシレンの純度(%)

| <i>o</i> -キシレン | <i>m</i> -キシレン | <i>p</i> -キシレン (%) | エチルベンゼン | 計 |
|----------------|----------------|-----------------------|---------|------|
| 23.1 | 38.0 | 16.8 | 13.2 | 91.0 |

製造元：和光純薬工業株式会社

カタログ番号：244-00081

ロット番号：TGP8162

測定方法：ガスクロマトグラフ法

測定条件

機器：HP5890A (アジレントテクノロジーズ)

カラム：Xylene Master (0.32 φ × 50m 信和化工株式会社)

温度：65℃

流量：5mL/min

注入量：1 μL

注入方法：スプリット法(1:10)

溶液処理：キシレンを二硫化炭素に溶解し、標準物質である *o*-、*m*-、*p*-キシレン及びエチルベンゼンと面積値を比較することにより、純度を測定した。

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：「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-

研究分担者 慶長直人

国立国際医療研究センター研究所 呼吸器疾患研究部 部長

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

研究要旨

化学物質の吸入曝露は、低濃度でも人体に有害な影響を与える場合があるが、そのメカニズムは十分に明らかにされていない。その病態モデル系を確立することはシックハウス症候群の対策上、重要である。ヒトの肺は常に外界の吸入粉塵や微生物に曝されており、そこ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。我々はこれまで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* での影響を検討してきた。正常のヒト気道細胞に近い BEAS2B 細胞株を poly I:C で刺激後、ホルムアルデヒドを添加することにより、IL-8 mRNA 発現量が有意に増強、さらに IL-8 遺伝子発現に関わるとされる p38MAPK, ERK1/2, 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、polyI:C による IL-8 遺伝子発現がそれら 3 つの主要なシグナル伝達系に依存していること、特に JNK 系がホルムアルデヒドによる IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示した。本年度は、さらに分泌される多数の生理活性物質を同時定量し、複合効果の有無を検討した。またホルムアルデヒドに続いてキシレン等の化学物質を用いた検討も開始した。

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、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。揮発性有毒物質である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ため、我々はこれまで、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、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン類を測定し、さらに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、poly I:C による IL-8 遺伝子発現がそれら 3 つの主要なシグナル伝達系に依存していること、特に JNK 系がホルムアルデヒドによる IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示してきた。

本年度はさらにこれまで確立したヒト気道上皮細胞系による poly I:C の低濃度刺激下でのホルムアルデヒド添加による炎症応答増強の系について、さらに他の生理活性物質への影響についても検討を進めるとともに、同一の *in vitro* 実験系において、ホルムアルデヒド以外の化学物質の影響を検討し、ヒトの気道系に吸入化学物質がどのような影響を与えるのかの検討を深めることとした。

B. 研究方法

「刺激物質」

これまでの検討から、ホルムアルデヒドについては、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。この物質は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に対する agonist として知られている。ホルムアルデヒド以外の化学物質の影響を検討する際には、特にグラム陰性菌を認識する際のレセプターに対する agonist として細菌性リポ多糖（LPS）を追加刺激物質として検討した。

「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、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細胞を回収、RNA を抽出し、定量的 RT/PCR を実施した。

キシレンの影響については、poly I:C（1, 10 µg/ml）もしくは LPS（10, 100 ng/ml）で 24 時間刺激後、キシレンを段階希釈して 1-1000 µM まで、3 時間添加して細胞を回収、RNA を抽出し、ホルムアルデヒドの場合と同様、サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現レベルを定量的 RT/PCR で測定した。

「生理活性物質の測定」

poly I:C とホルムアルデヒドの複合効果については、培養上清に分泌される生理活性物質を、Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いた。対象は、27 種類のサイトカイン等の生理活性物質（IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES, TNF-α, VEGF）を選択、同時測定した。

（倫理面への配慮）

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

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（poly I:C）とホルムアルデヒドとの複合効果がインターロイキン 8 の産生以外にも見られるかどうか、気道上皮細胞より分泌される多数の生理活性

物質の同時定量を行なった結果、微生物関連物質 poly I:C 曝露により、多数のサイトカイン類が誘導されたが、ホルムアルデヒド添加による複合効果がこれまで明らかな IL-8 以外の好中球やリンパ球の遊走に関わるケモカイン(ex. RANTES)にも認められた。しかしながら、IL-8 以外の効果は必ずしも mRNA 発現量の変化とは並行していなかった (図 1, 2)。

ホルムアルデヒド以外の化学物質として、キシレン(1, 10, 100, 1000 μ M)を新たに選択し、BEAS2B 細胞株を poly I:C (1, 10 μ g/ml)もしくは LPS(10, 100 ng/ml)で 24 時間刺激後、化学物質を 3 時間添加することにより、サイトカイン mRNA の定量を実施し、同様な効果が認められるか否か検討したが、特に poly I:C 1 μ g/ml では、キシレンの低濃度の添加によって、IL-8 の mRNA 発現量に大きな変化は見られず、高濃度では細胞死が見られた (図表省略)。

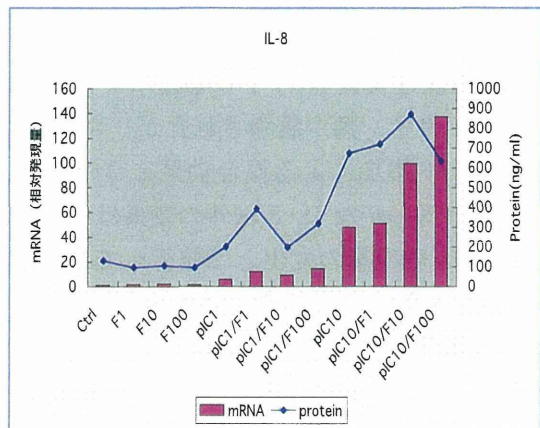


図 1 Poly I:C (1, 10 μ g/ml) 存在下 24 時間、ホルムアルデヒド (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) 添加後 3 時間の IL-8 の遺伝子発現レベルおよびタンパク発現レベル

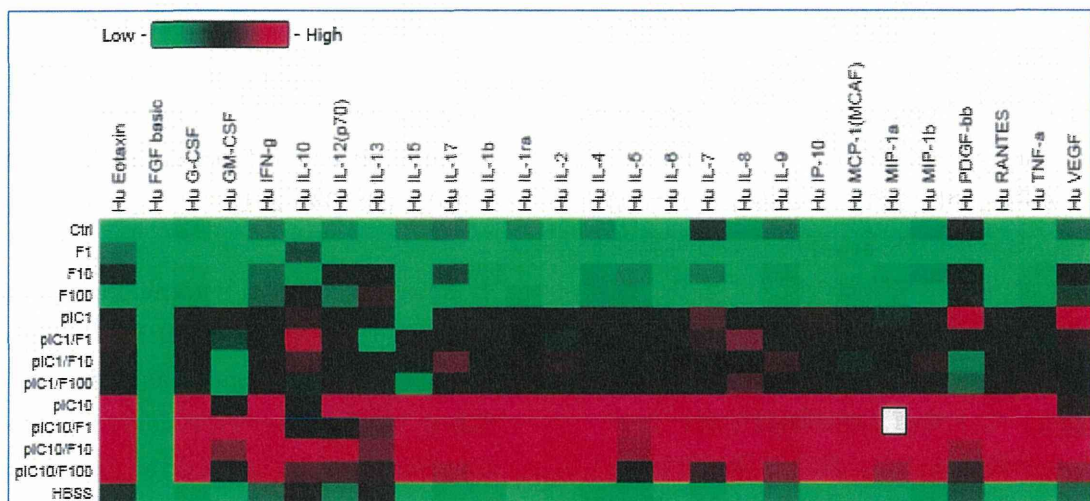


図 2 サスペンションアレイシステムを用いた培養上清中の 27 種類のサイトカイン等の生理活性物質の相対濃度比較

D. 考察

微生物関連物質 poly I:C 曝露により多数のサイトカイン類が誘導されたが、ホルムアルデヒド添加による複合効果については、これまで明らかな IL-8 以外の効果は必ずしも mRNA 発現量の変化とは並行しておらず、ELISA 系での確認や、翻訳後修飾や分解への効果によるものかもしれず、今後、さらに検討していく必要があるものと思われた。

キシレンにおいては、予備検討を開始したところであるが、ホルムアルデヒドでみられた IL-8 の mRNA 増強効果は、少なくとも低濃度では、明らかでないものと思われた。溶媒として使用した物質の影響がないことを確認するための追加実験をさらに行なう必要がある。

E. 結論

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がかなり特異的に見られること、またこれまでの検討により、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が明らかにされた。この *in vitro* 解析系は、ヒトへの外挿に有用である可能性を示し、微生物由来物質の吸入により、症状が増強される可能性を示唆しており、吸入曝露による毒性を考える上で意義深い。すなわち、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である。また、さらにキシレンなどシックハウスと関連する化学物質に関する複合効果についても、同様の手法により検討を開始しており、今後、吸入曝露モデルによ

り得られた遺伝子発現様式と比較するデータを提供できると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Asano K, Tryka E, Cho JS, Keicho N. Macrolide therapy in chronic inflammatory diseases. *Mediators Inflamm.* 2012: 692352., 2012.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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): 107-14., 2013.

7. 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.

8. 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.

2. 学会発表

国際学会発表

1. 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.

2. 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.

国内学会発表

1. 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

2. 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.

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