

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：「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」

研究分担者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

#### 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、概ね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、現行の実験動物の吸入毒性指標（器質的障害）から評価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（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、及び、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。本分担研究では第二の目的に向け、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る雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を実施し、肺・肝及び脳（海馬）の網羅的遺伝子発現プロファイルを取得し、臓器毎及び臓器連関解析とそのデータベース化を行う。

平成24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、及び22時間/日 x 7日間反復吸入暴

露実験を実施し、経時的に採取した海馬、肝及び肺の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果、22時間 x 7日間反復暴露の海馬において、昨年度のホルムアルデヒド暴露と同様に、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。6時間 x 7日間反復暴露では、これらの遺伝子の発現抑制が一過性に認められ暴露期間中に回復することが示唆された。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、これ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た。この所見は健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。

以上のごとく、シックハウス症候群レベルの極低用量暴露による中枢影響を予測することが、脳サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により可能である事が明らかとなった。

#### A. 研究目的

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、現行の実験動物の吸入毒性指標（器質的障害）から評価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、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う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、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(海馬)のトキシコゲノミクス解析を実施すると共に、超微形態解析等の標的の絞り込みを行う。

本分担研究では、上記第二の目的に向け、先行研究で設定した3種の暴露プロトコルの内の6時間/日 x 7日間反復暴露[=労働

暴露モデル]及び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る、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験により得られた脳・肺・肝サンプルについて、遺伝子発現データ生成、その臓器毎及び臓器連関性の解析及びデータベース及び予測システムの基盤確立作業をおこなう。今年度は、キシレン（指針値：0.2 ppm）について検討した。

## B. 研究方法

### Total RNA の分離精製

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)に 4°Cで一晩浸漬し、RNase を不活化する。肝は 5mm 径の生検トレパンにより 3ヶ所を各々別チューブに採取した。肺は気管から RNA later を注入し、RNase の不活化を促した後、採取した。脳は摘出後、カミソリ刃にて正中で左右に切断し左部について、小脳、脳幹、海馬及び大脳皮質の 4 部位に分離後、各々別チューブに採取した。その後、RNA 抽出操作までは-80°Cにて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

### GeneChip 解析

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット)を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°Cにて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウエアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

### (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的配慮を十分行い、下記、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。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」。

## C. 研究結果及び考察

本年度 (平成 24 年度) は、キシレン (xylene; 分子量 : 106.2、CAS No. 1330-20-7)についてデータ解析を進めた。試薬としてキシレン (xylene; 分子量 : 106.2、CAS No. : 1330-20-7) は先行研究と同じく、位置異性体である o-体、m-及び p-体の混合キシレンとし、キシレン (カタロ

グ番号:244-00081、電子工業用(SC規格)、和光純薬工業)を使用した。o-、m-、p-体及び、キシレンの構造異性体であるエチルベンゼンの含有量(絶対純度%)について予め分析した結果、それぞれ23.1%、38.0%、16.8%及び13.2%(これら4物質の合計を100%とした相対純度では、25.4%、41.7%、18.4%及び14.5%)であった。キシレン濃度は、o-、m-、p-体それぞれの濃度の合計値とした。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及び166時間後に観測)と22時間/日×7日間反復暴露(22、70、166及び190時間後に観測)させた際の脳(海馬)、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。マウスへの暴露濃度を、キシレンの室内濃度指針値が0.2ppmであることから、これを参照し、公比 $\sqrt{10}$ で0.2、0.7及び2.0ppmを暴露目標値とした。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。DNAマイクロアレイはアフィメトリクス社のGeneChip(Mouse Genome 430 2.0)を用いた。遺伝子発現変動を、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトウェアは、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。

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、海馬、肝及び肺における解析結果を示す。

#### C-1: キシレン極低濃度[6時間/日×7日間]反復暴露時の遺伝子発現変動解析:

C-1-1: キシレン[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1,064ps、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214ps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6,336ps、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36ps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-1-2: キシレン[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:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして2,276ps、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 209 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 503 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 10 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-1-3: キシレン[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:

暴露及び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。

C-2: キシレン極低濃度[22 時間/日×7 日間]反復暴露時の遺伝子発現変動解析:

C-2-1: キシレン[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 3,256 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 122 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 788 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 36 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、昨年度のホルムアルデヒドの吸入暴露の際と同様に、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 (いずれも投与 22、70 及び 166 時間後、低・中・高用量) 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 (中・高用量)。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。

このことから、キシレン[22 時間/日×7 日間]の極低濃度吸入暴露により、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リバウンド現象が示された。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、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。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。

この IEG の遺伝子の内、Arc、Fos、Dusp1 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動について図 1 に示す。図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。具体的には、縦軸(Z 軸)に絶対値化した(細胞 1 個あたりのコピー数)mRNA の発現量を取り、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す。

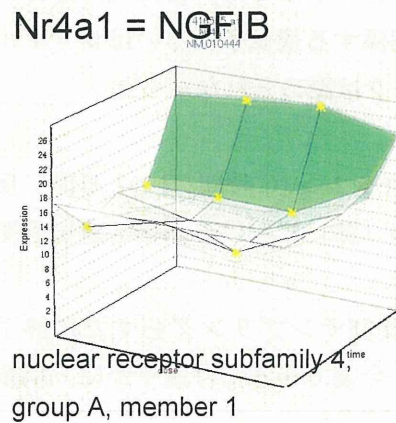
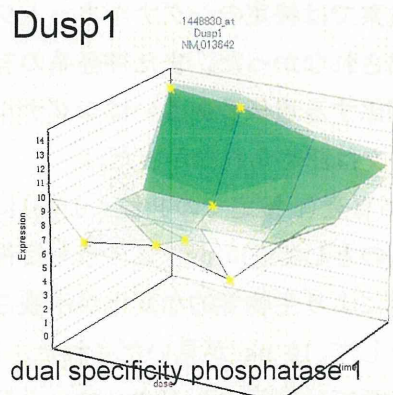
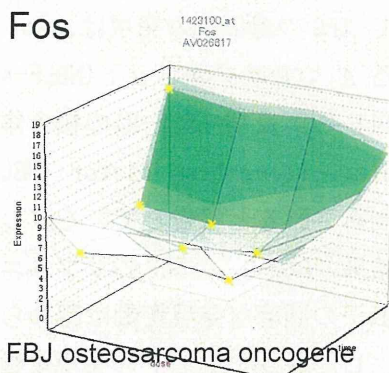
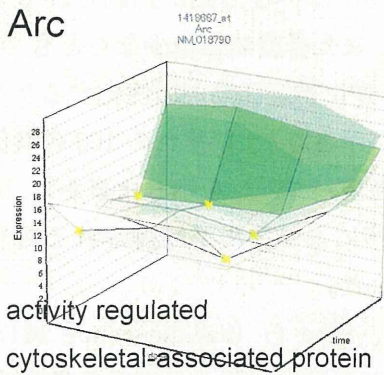


図 1 キシレン[22 時間/日×7 日間]反復暴露時の「海馬」における初期応答遺伝子 (Immediate early gene : IEG) である Arc、Fos、Dusp1 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動 溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に★を付した。

いずれも同様な発現パターンを示した。

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

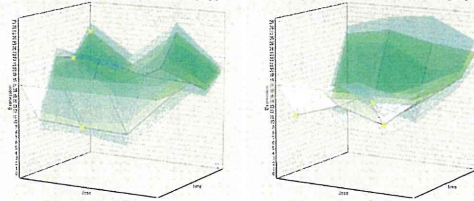
記した IEG の遺伝子は、[22 時間/日×7 日間]反復暴露の際には、暴露期間中は顕著に発現が抑制されているが、[6 時間/日×7 日間]反復暴露の際でも、計測時点が暴露直後である暴露 6 時間後に、発現減少が同様に認められた。6 時間暴露の 16 時間後には発現減少は認められず回復が認められた。これらのことから、キシレン吸入暴露による IEG の遺伝子の発現減少は、22 時間/日暴露の場合だけではなく、少なくとも 6 時間/日の暴露により誘発されることが明らかとなった。またこの結果は、ホルムアルデヒドの暴露の場合と同様であった。IEG 遺伝子内の、Arc 及び Dusp1 遺伝子の発現変動を図 2 に示す。

なお遺伝子発現変動の観測時点は、[6 時間/日×7 日間]反復暴露の場合は、投与 6、22、70 及び 166 時間後、[22 時間/日×7 日間]反復暴露の場合は、投与 22、70、166 及び 190 時間後であり、海馬の採取時刻は、前者はそれぞれ 18 時、10 時、10 時及び 10 時、後者はそれぞれ 10 時、10 時、10 時及び 10 時となっている。

両遺伝子共に、[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。

### Arc

6 時間×7 日間暴露      22 時間×7 日間暴露



### Dusp1

6 時間×7 日間暴露      22 時間×7 日間暴露

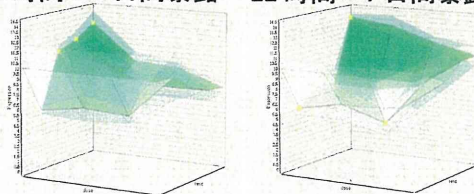


図 2 「海馬」における初期応答遺伝子 (Immediate early gene : IEG) である Arc (上段) 及び Dusp1 遺伝子 (下段) のキシレン [6 時間/日×7 日間]反復暴露の場合 (左)、及び [22 時間/日×7 日間]反復暴露の場合 (右) との発現変動の比較

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に★を付した。

-----  
C-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 3,977 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 144 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

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。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして629 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42 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-2-3: ホルムアルデヒド[22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:

暴露及び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。

#### D. 結論

本年度(平成24年度)はキシレン(指針値:0.2 ppm、暴露目標値0.2、0.7、2.0 ppm)(4用量、16群構成、各群3匹)の6時間/日×7日間反復暴露(6、22、70及び166時間後に観測)及び22時間/日×7日間反復暴露(22、70、166及び190時間後に観測)を実施した際の海馬、肺及び肝サンプルについて網羅的に遺伝子発現変動を解析した。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。

海馬において有害性を示唆するシグナルとして、初期応答遺伝子関連シグナルが見いだされた。具体的には、キシレンの[22

時間×7日間]反復暴露の暴露期間中、神経活動の指標となる初期応答遺伝子(IEG)

(Arc、Nr4a1、Fos、Junb及びEgr4遺伝子等)の発現が強く抑制され、暴露休止後24時間目の190時間時点で、逆にIEGの遺伝子の発現の増加が認められた。このことから、キシレン吸入暴露時海馬において、連続暴露期間中は、神経活動が抑制される事、暴露が中断されると、神経活動が過剰となるリバウンド現象が起こることが示唆された。

他方、6時間×7日間反復暴露の場合では、これらの遺伝子の発現抑制は一過性であり暴露期間中に回復していることが示唆された。したがって、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。海馬における神経活動の抑制は、記憶をはじめとする情動認知行動異常を誘発する可能性が高く、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た。今後、発生・発達期暴露も考慮に入れての検証を行う予定である。またこの事を見いだした事は、健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。

昨年度検討したホルムアルデヒドと今年度のキシレンの双方が、指針値レベルの極低濃度暴露により、海馬の神経活動の指標となるIEGの顕著な発現減少を誘発し神経活動を抑制する事が示唆された。現段階では化学構造が両化学物質で大きく異なる事から、最初の標的が共通である可能性は低く、遺伝子発現ネットワークが最終的に共通の因子に収束すると考えられた。

以上、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いて脳サンプルを用いる網羅的遺伝



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示唆された。

来年度は、さらなる「不定愁訴」の分子実態の把握に向け、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が室内指針値とともに掲げるホルマリン等 13 物質の中から次の被験物質を選択し、同様の解析・検討をおこない、中枢影響予測の鍵となる共通ネットワークの描出を目指す。これにより近年の技術革新に伴い急増する「新規物質」の吸入毒性評価に際しての中枢影響を含む極低濃度域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。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. (2012) 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(2):373-80.

Aisaki K, Tsuboi I, Harada T, Oshima H, Yamashita A, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. (2012) Neopterin, inflammation-associated product, prolongs erythropoiesis suppression in aged SAMPl mice due to senescent stromal-cell impairment. *Exp Biol Med (Maywood)*. 237(3):279-86.

### 2. 学会発表

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)

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、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)

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)

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

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

#### F. 知的財産所有権の出願・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

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 「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 室長

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等の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）後の肺を透過型電子顕微鏡（以下、TEM）を用いた高精度解析を行うことで、暴露による気化性物質の有害性を検証し、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。今年度の分担研究では研究課題として二つの柱を立てた。その柱の一つとして、低濃度のホルムアルデヒド（暴露濃度：0、0.1、0.3、1.0 ppm；指針値：0.08 ppm）をマウスに22時間/日×28日間反復吸入暴露（国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・北嶋等、昨年度実施）して、採取・保存した肺組織についてTEMによる肺毒性の微細な兆候を検索した。このために基盤研究として、TEMによる肺毒性の検索を可能とするTEM試料の作製・検索方法を確立した。この方法は、通常の病理診断に用いるものと同程度の大きさの組織片にTEM検索用の固定、エポキシ樹脂包埋を施したセミシン標本を作製し、光学顕微鏡とTEMを連携させた検索を行う酒井法を応用したTEM試料を作製するもので、肺の特定部位の超微細形態学的変化の高精度解析、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を可能にした。これを極低濃度ホルムアルデヒドの28日間暴露試験のTEM検索に応用した結果、極低濃度ホルムアルデヒドの28日間暴露でマウスの肺に形態学的な影響は認められなかった。二つ目の柱として本年度、極低濃度キシレン（0、0.2、0.7及び2.0 ppm；指針値：0.2 ppm）をマウスに22時間/日×28日間反復吸入暴露（国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・北嶋等による）、採取・保存した臓器について病理組織学的検索を行い、肺以外の肺の全身諸臓器に病理組織学的検索で影響を認めなかった。肺については、切り出し方法の改良を試みており、病理組織学的検査とTEMによる肺の本格的な検索を次年度に行う準備を進めている。

### 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つた。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見できる可能性がでてくる。

本分担研究の目的を「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等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見性を確認することとし、その柱の一つとして、低濃度のホルムアルデヒド(暴露濃度:0、0.1、0.3、1.0 ppm; 指針値: 0.08 ppm)をマウスに22時間/日×28日間反復吸入暴露(国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・北嶋等、以下、国衛研・北嶋等により昨年度実施)、採取・保存した肺組織について、透過型電子顕微鏡(TEM)による肺毒性の微細な兆候を検索した。

肺の毒性兆候を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・固定した試料を観察するもので、各臓器内での検索部位を特定すること、検索した部位に認められた変化の成り立ちを周囲組織との関わり合いも視野に入れて総合的に検索することは不可能である。また、TEM検索で認められた変化が偶発的なものか、毒性変化であるのかを判断す

ることさえも極めて困難である。こうした事情から、TEM検索で認められた変化が、検索した臓器に生じた毒性病変を代表するものか否かが、常に議論的となっている。光学顕微鏡による病理組織学的検査で認められた病変部そのものをTEMで検索することで、この問題を解決することができる。通常の病理診断に用いるものと同程度の大きさの組織片にTEM検索用の固定、エポキシ樹脂に包埋したセミシン標本を作製し、光学顕微鏡とTEMを連携させた検索を行う酒井法を応用した試料作製を行うことで、光学顕微鏡による観察で絞り込んだ肺の特定部位そのものをTEMによる超微細形態学的高精度解析が可能となる。これによって、対照群と投与群間、あるいは投与群間での形態学的変化を比較検討することも可能となる。今年度の目的とした一つ目の柱を実施するにあたり、①として、TEMによる肺毒性の検索を可能とする、TEM試料の作製・検索方法の確立を目標とした。次に②として、確立したTEM試料の作製・検索方法を極低濃度ホルムアルデヒドの28日間暴露試験のTEM検索に応用して極低濃度ホルマリンの吸入暴露がマウスの肺に対して形態学的な影響を及ぼすか否かの検証を進めた。本年度の研究の二つ目の柱として、北嶋班の研究課題として実施した極低濃度キシレンの28日間暴露試験で、肺以外の全身諸臓器のHE染色標本を作製して、病理組織学的検査を行ってキシレン暴露の影響の有無を形態学的に確認することを課題とした。

なお、肺については、切り出し方法の改良を試みており、肺の病理組織学的検査とTEMによる本格的な検索は次年度の課題とした。

## B. 研究方法

B-1: 低濃度のホルムアルデヒドのマウスの肺に及ぼす超微細形態影響の検索

① TEMによる肺毒性の検索を可能とする、TEM試料の作製・検索方法を確立

酒井法を応用、発展させたTEM試料作製・検索方法の確立では、次の手順でTEM試料作製を行った(解剖から固定までの手順は昨年度報告と重複)。12週齢の

C57BL/6J 雄マウスをネンブタール i. p. 麻酔下、右腋窩動静脈から放血死させて開胸。甲状腺の下酒井法を応用、発展させた TEM 試料作製方法の確立端で気管を切断、直ちに固定液を高さ20cm の落下圧で気管の断端から肺内に注入した。固定液は2%パラホルムアルデヒド溶液(インスタント磷酸緩衝液4、三菱化学ヤトロン(株)、1/15 mol/L、pH 7.2をベース)にグルタルアルデヒドを0.5%添加して用いた。固定液の注入は、肺が胸郭内で生理的に拡張した状態で固定できるように目視で確認しながら慎重に行った。肺を気管とともに摘出後に左右の肺を切り離し、上記固定液に浸漬、真空デシケータ内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定1日を行った。固定した肺はショ糖を3%添加したリン酸緩衝液を交換しながら1週間リンス、その後、リン酸緩衝液に浸漬して4°Cで2ヶ月間保存した。左肺の全割組織を主気管支に沿って1mm 幅で長さ12mm に切り出し、1%オスミウム酸で後固定、常法によりエポキシ樹脂に包埋した。ブロックを3.5×10mm にトリミングし、Nanotome Thick ダイヤモンドナイフで肺全割組織のセミシン切片を切削した。トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡下で肺全体の組織の保存性の良否の確認を行い、その部位を顕微鏡下で切り出してエポキシ樹脂に再包埋、超薄切、ウラン・鉛の二重染色を施して TEM による観察を行って、今回確立した TEM 試料作製、検索方法での超微細形態構造の保存状態を確認した。その概要を図1に示した。

## ② 極低濃度ホルムアルデヒドに28日間暴露したマウス肺の超微細形態学的 (TEM) 検索

昨年度ホルムアルデヒドを28日間暴露後に解剖、電顕検索用の固定をおこなって保存したマウスの肺に、今年度確立した TEM 試料作製・検索方法を応用した。肺の全割セミシン切片から TEM 検索部位として切り出す部位は、気道系(肺内気管支、細気管支、終末細気管支)から4ポイント、肺実質系では呼吸細気管支遠位端を中心とした細葉中心領域から1ポイントとした(図2)。本研究では極低濃度ホルマリン暴露によるシックハウスを想定していることから、気道系と肺実質領域で毒性影響を

受けやすい領域として知られている細葉中心領域を重点的に検索した。これら4ポイントを観察することで、肺の気道系と実質系の全般にわたる高精度な形態学的検索を行った。

## B-2: 極低濃度キシレンを28日間反復吸入暴露したマウスの病理組織学的検査

キシレンの極低濃度下の28日間反復吸入暴露は試薬として混合キシレンを使用し、吸入暴露までを国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・北嶋等において実施、解剖と組織のサンプリングは日本バイオアッセイ研究センター・大西(以下、バイオアッセイ)と国衛研・毒性部が共同で実施した。病理組織学的解析をバイオアッセイで行った。

キシレンの暴露濃度はキシレンの室内濃度指針値である0.2 ppm を考慮して0.2、0.7及び2.0 ppm に設定、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、 $0.196 \pm 0.014$  ppm (0.168~0.225 ppm)、 $0.681 \pm 0.060$  (0.566~0.823 ppm)、 $1.981 \pm 0.151$  (1.799~2.373 ppm)と、目標濃度に対しそれぞれ98%、97%、99%であった(詳細は国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・北嶋等の報告を参照)。

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、0.2、0.7及び2.0 pp)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、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、 $0.196 \pm 0.014$  ppm (0.168~0.225 ppm)、 $0.681 \pm 0.060$  (0.566~0.823 ppm)、 $1.981 \pm 0.151$  (1.799~2.373 ppm)と、目標濃度に対しそれぞれ98%、97%、99%であった(詳細は国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・北嶋等の報告を参照)。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。暴露濃度の設定では、室内濃度指針値である0.2 ppm を考慮した。

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、用時調整)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。

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。

### C. 研究結果

C-1: 低濃度のホルムアルデヒドのマウスの肺に及ぼす超微細形態影響の検索

① TEMによる肺毒性の検索を可能とする、TEM試料の作製・検索方法を確立

光顕によるセミシン切片の観察で、肺組織は全体が良好な状態で保存され、固定不良を呈する箇所は認められなかった。電顕による観察でも、細気管支、肺泡領域、肺胸膜とも超微細構造が良く保たれていることが確認された(図3-8)。今回、検討したマウスの肺の固定方法は、多くの動物を解剖する毒性試験で時間のかかる灌流固

定を行わずに電顕レベルでの肺組織の検索に耐え得る固定を可能にすることが示された。また、通常のパラフィン包埋標本に匹敵する大きさのセミシン切片を作製することで、光顕で検索部位を確認しながら電顕検索を行うことが可能となり、シックハウスなど極低濃度の化学物質の毒性、病態検索みならず粒子状ナノマテリアルの毒性検索でも有用なツールになると考える。このように、極めて大きな効果が期待される反面、試料を包埋したエポキシ樹脂ブロックから肺全断面のセミシン切片(厚さ1 μm)を作製する際に、肺内の気管支、肺胞管、肺胞までを連続して光学顕微鏡で検索できるように薄切面を削り出す工程は極めて難しい超精密工程であり、この超精密削り出し工程にかなりの時間を要した。また、肺内の気道のなかで上皮下に軟骨が存在する肺内気管支に相当する部位は肺門付近の極めて短い領域に存在することが判明し、今年度作製したTEM試料には切出し位置加減で肺内気管支が含まれていなかった動物もあった。このため、今年度のキシレン暴露実験のTEM試料作製では、固定した湿標本から組織片の切り出し位置と切り出し方向について検討を進めている。

② 極低濃度ホルムアルデヒドに28日間暴露したマウス肺の超微細形態学的(TEM)検索

光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて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詳細に検索した結果、極低濃度ホルムアルデヒドの暴露による形態学的変化は認められなかった。

(図9-14)

C-2: 極低濃度キシレンを28日間反復吸入暴露したマウスの病理組織学的検査

一般状態、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。暴露期間中の体重推移を表1に、摂餌量の推移を表2に示した。体重、摂餌量とも全てので対照群と比較し、有意な差は認められなかった。

臓器重量: 各臓器の絶対・相対重量を表3に示した。各臓器とも全ての暴露群で対

照群と比較し、有意な差は認められなかった。

病理組織学的検査：病理組織学的検査結果を表4に示した。検索した肺、脳、肝、腎、脾及び心臓にはキシレン暴露の影響は認められなかった（図15-18）。

なお、肺の病理組織学的検査は切り出し位置を確定次第実施する。

#### 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、病理組織学的検索でも肺、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（以上、昨年度報告）。また、今年度、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて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詳細に検索した結果、ホルムアルデヒドによる毒性影響は認められなかった。

キシレンを、室内濃度指針値（0.2 ppm）を考慮した濃度でマウスに極低濃度（0、0.2、0.7及び2.0ppm）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。病理組織学的検査においても肺、脳、肝、腎、脾及び心臓にキシレン暴露の影響は認められなかった

TEMによる肺毒性の検索を可能とするTEM試料の作製・検索方法は、シックハウスなど極低濃度の化学物質の毒性、病態検索のみならず、ナノスケールの物質を研究課題とする粒子状ナノマテリアルの毒性や体内動態の形態学的検索でも有用なツールとして期待される。

#### E. 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

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

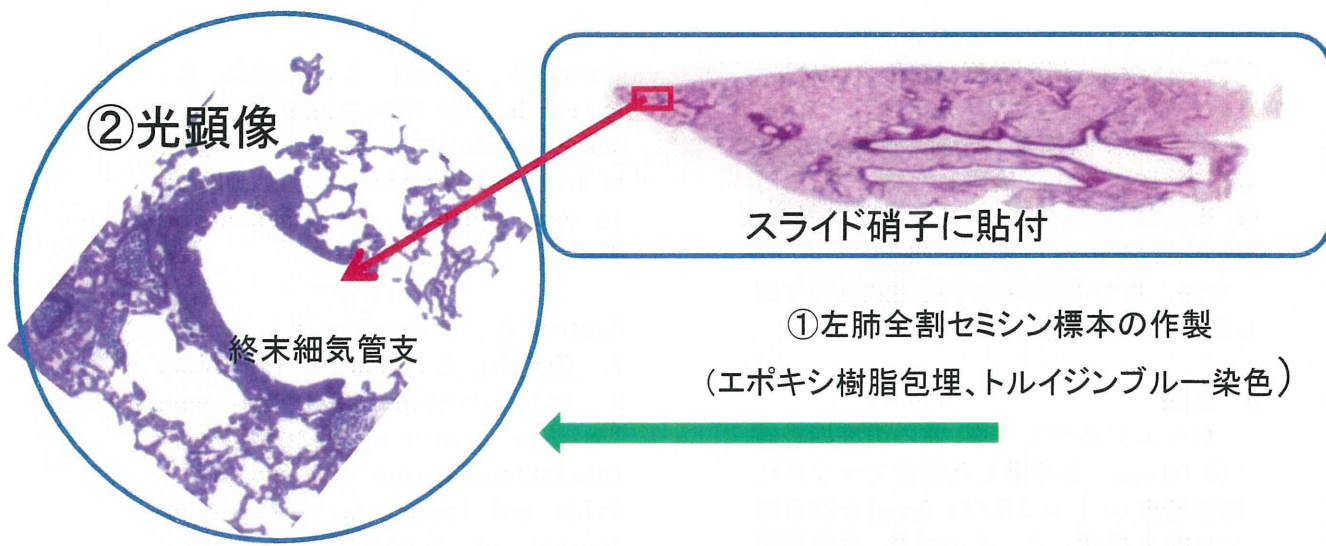
なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



**②光顕観察で**

ターゲット部位を選定、切り出し、  
スライドガラスから剥ぎ取る



**③ エポキシ樹脂で再包埋、  
超薄切切片の作製**

**TEM 観察**

…光顕で観察した切片②そのものを TEM で観察(左下円内赤枠)  
肺の全割標本を光顕で観察、任意の部位を切り出して、  
超微細形態観察を行うことが可能となった(網羅的電顕検索法)

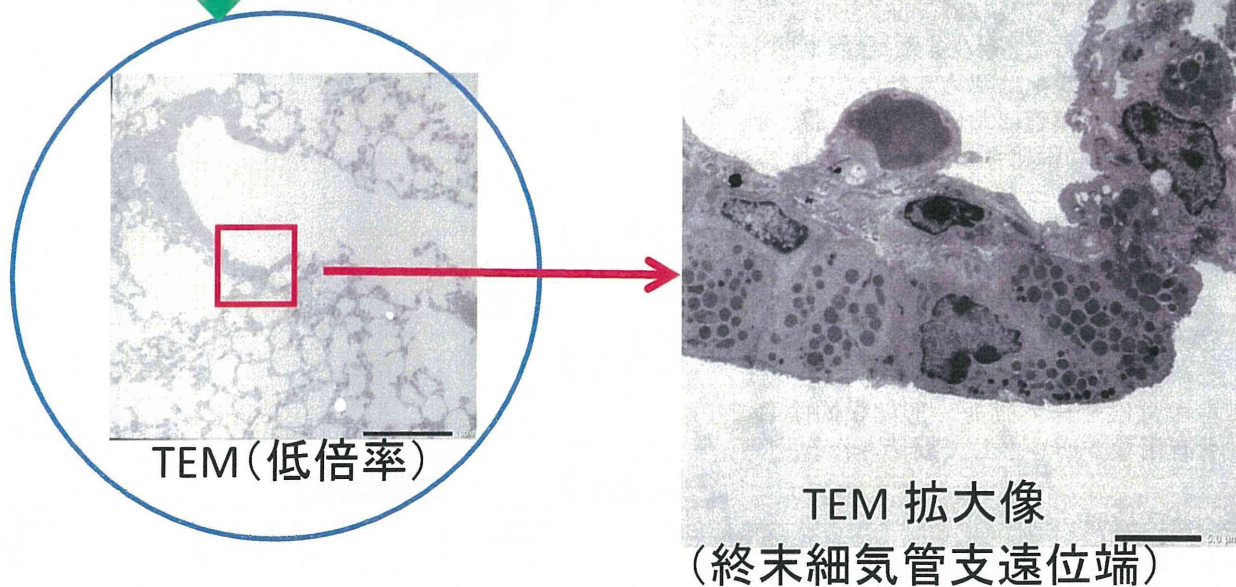


図 1 TEM による肺毒性の検索を目的とした試料作製方法



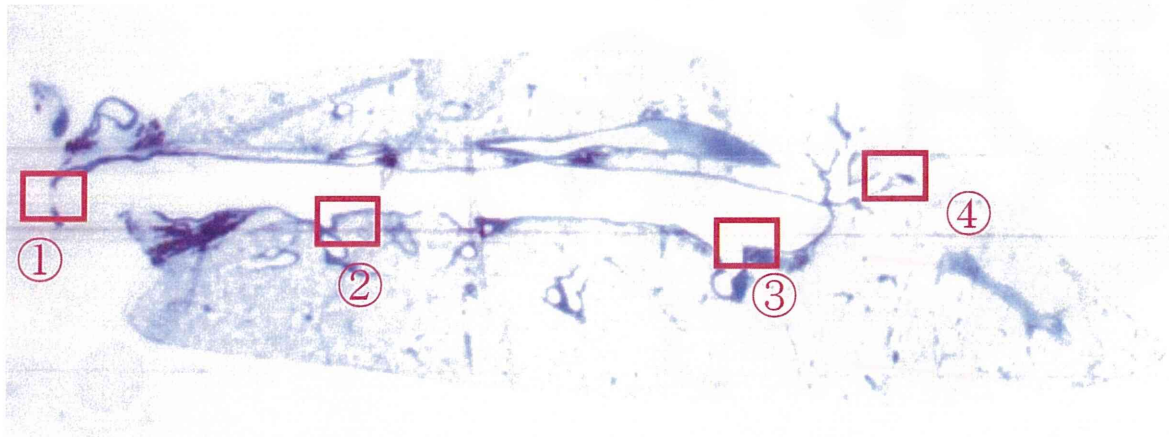


図2 低濃度のホルムアルデヒドのマウスの肺に及ぼす超微細形態影響の検索  
TEM 検索ポイント  
①：肺内気管支、②、③：細気管支、④：終末細気管支と細葉中心領域

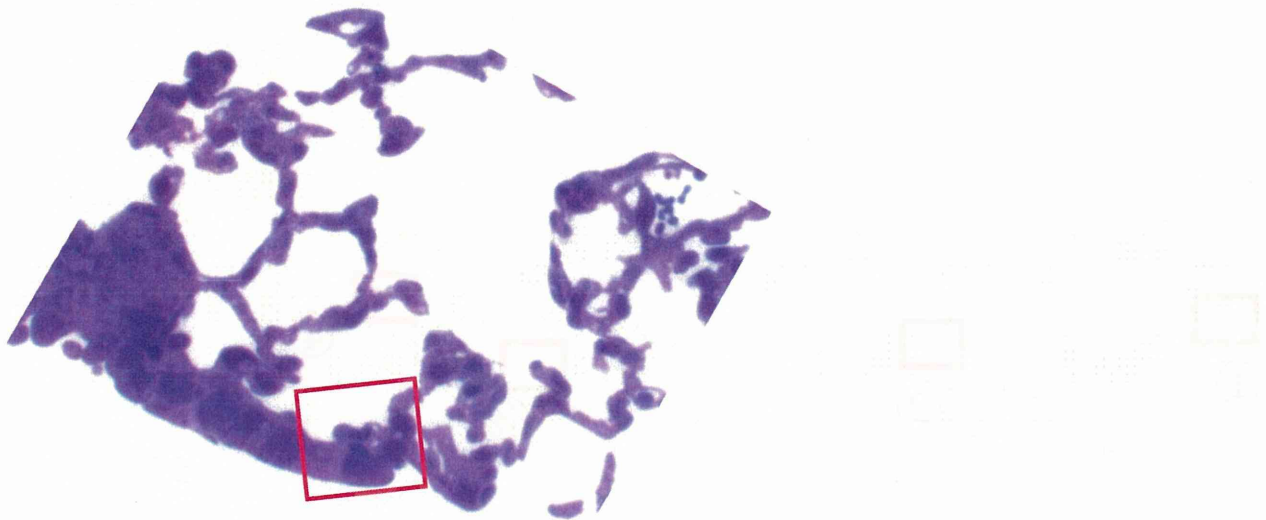


図 3 TEM による肺毒性の検索を可能とする TEM 試料の作製・検索方法の確立  
 セミシン標本（トルイジンブルー染色）から TEM 検索部位（赤枠内）を切り出した切片、  
 これをエポキシ樹脂に包埋、超薄切して TEM 試料を作製. TEM で観察、図 4 の TEM 写  
 真を撮影した.

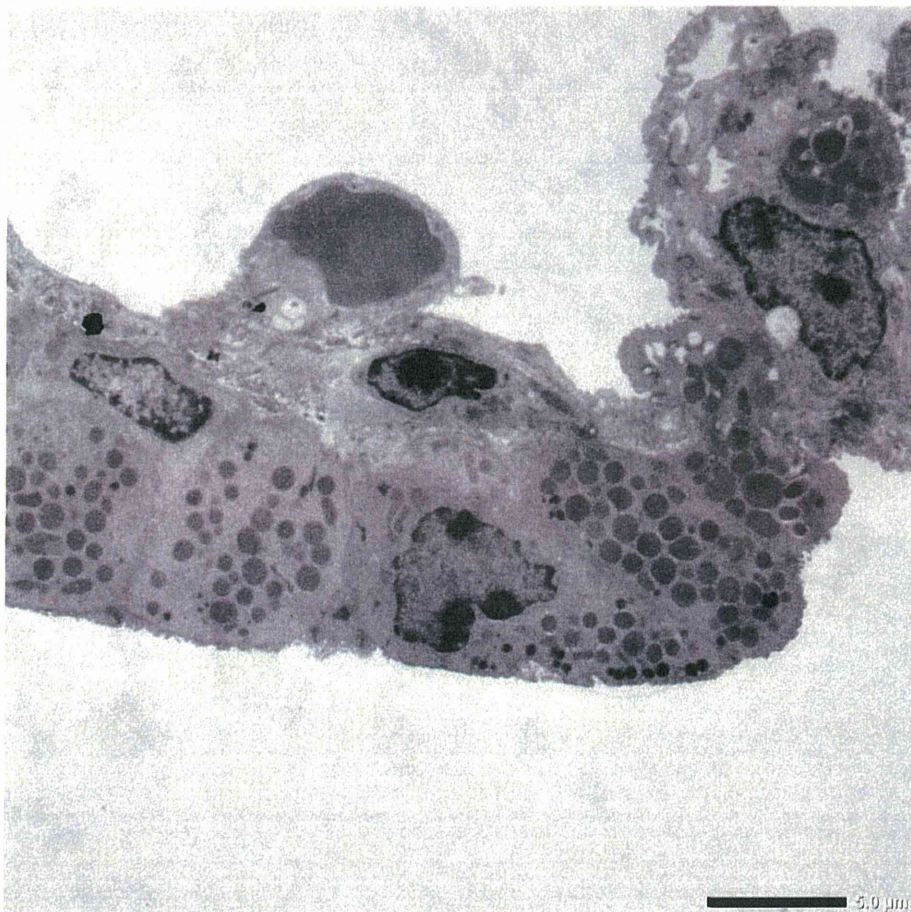


図 4 TEM による肺毒性の検索を可能とする TEM 試料の作製・検索方法の確立  
 終末細気管支遠位端（図 3 の赤枠内）の TEM 観察像、正常マウス

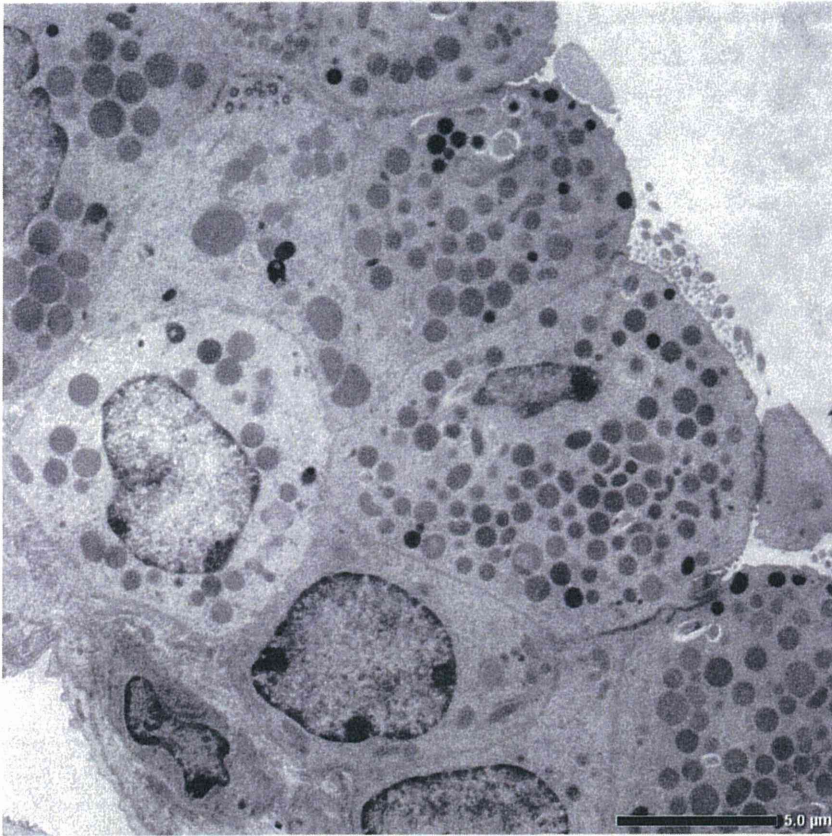


図 5 TEM による肺毒性の検索を可能とする TEM 試料の作製・検索方法の確立  
終末細気管支：ほとんどが無線毛細胞（クララ細胞）、正常マウス

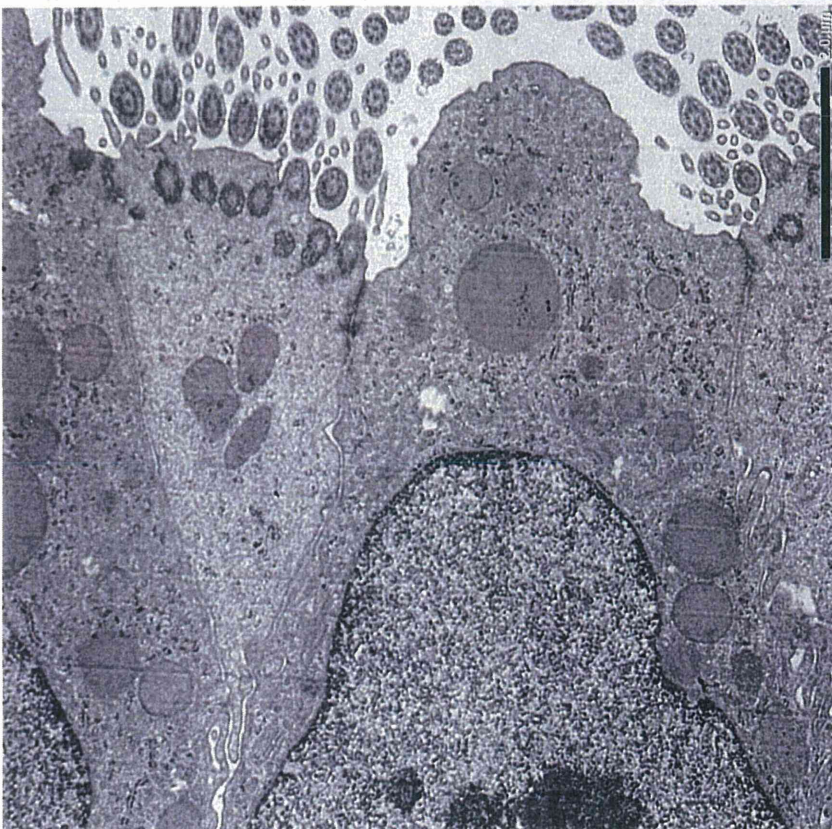


図 6 TEM による肺毒性の検索を可能とする TEM 試料の作製・検索方法の確立  
線毛上皮細胞とクララ細胞、正常マウス

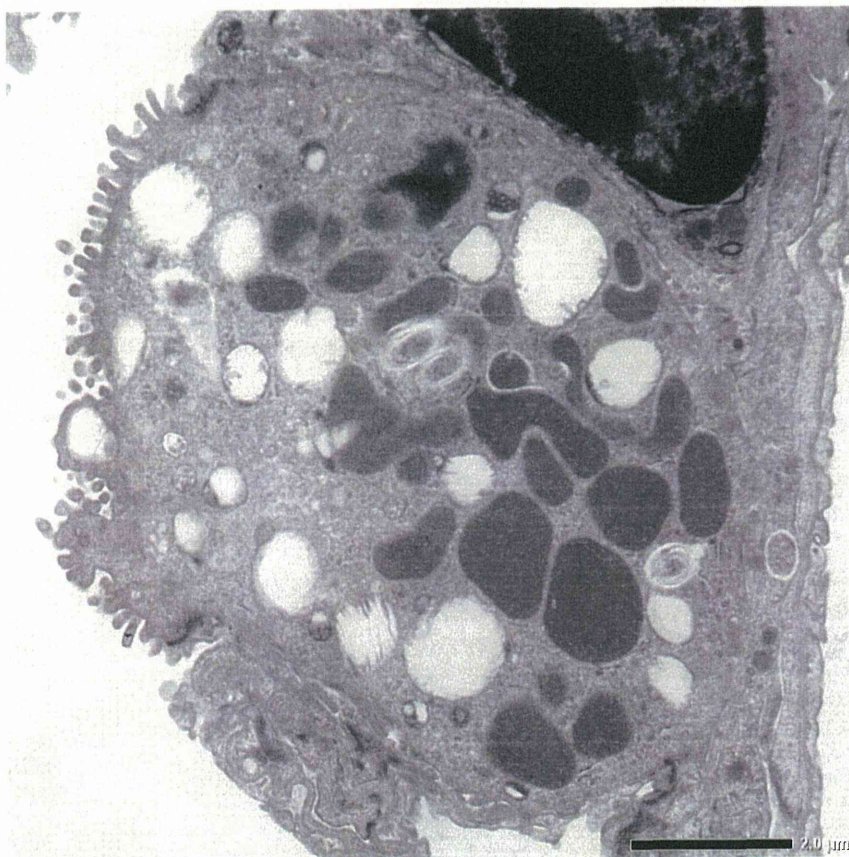


図 7 TEM による肺毒性の検索を可能とする、TEM 試料の作製・検索方法の確立  
II型肺胞上皮細胞、正常マウス

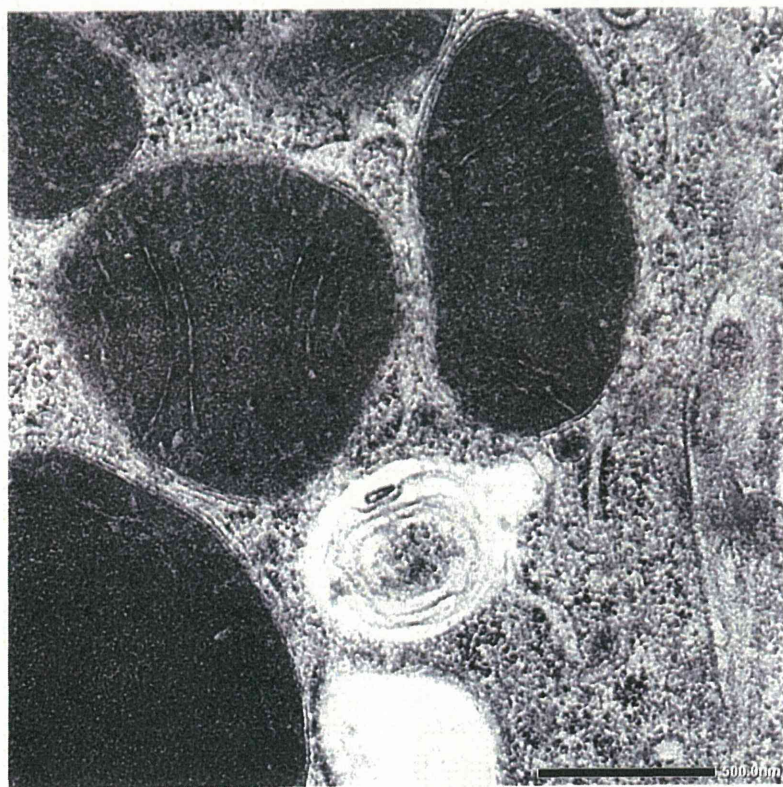


図 8 図 4 の一部を拡大、ミトコンドリアとラメラボディー