

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	CH-1		CH-2		CH-3		CH-4	
群	対照群		0.04 ppm 群		0.12 ppm 群		0.40 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	212.4	12.0	213.9	12.1	213.0	12.1	213.2	12.1
標準偏差	1.1	0.1	1.5	0.1	2.4	0.1	3.2	0.2
日別平均値								
6月25日	210.9	11.9	213.1	12.1	212.8	12.0	214.1	12.1
6月26日	211.6	12.0	213.9	12.1	213.2	12.1	214.2	12.1
6月27日	212.1	12.0	213.8	12.1	213.3	12.1	213.2	12.1
6月28日	212.8	12.0	213.7	12.1	214.4	12.1	214.5	12.1
6月29日	212.6	12.0	214.5	12.1	212.0	12.0	212.6	12.0
6月30日	212.8	12.0	214.3	12.1	211.9	12.0	212.3	12.0
7月1日	212.9	12.1	213.9	12.1	212.6	12.0	212.6	12.0
7月2日	212.3	12.0	212.8	12.0	213.3	12.1	213.0	12.1
7月3日	212.7	12.0	213.0	12.1	213.6	12.1	212.3	12.0

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	0.04 ppm群	0.12 ppm群	0.40 ppm群
6 月 25 日午後 0 時から	0	0.0398	0.130	0.403
6 月 26 日午前 10 時				
6 月 26 日午後 0 時から	0	0.0391	0.126	0.410
6 月 27 日午前 10 時				
6 月 27 日午後 0 時から	0	0.0397	0.126	0.409
6 月 28 日午前 10 時				
6 月 28 日午後 0 時から	0	0.0381	0.118	0.394
6 月 29 日午前 10 時				
6 月 29 日午後 0 時から	0	0.0404	0.118	0.395
6 月 30 日午前 10 時				
6 月 30 日午後 0 時から	0	0.0368	0.123	0.399
7 月 1 日午前 10 時				
7 月 1 日午後 0 時から	0	0.0388	0.121	0.403
7 月 2 日午前 10 時				
平均濃度	0	0.0390	0.123	0.402
標準偏差	0	0.002	0.002	0.007

表 5 解剖時体重及び肝臓重量(22時間暴露)

1 回目暴露終了時解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1001	28.5	1.603
	1002	28.4	1.514
	1003	30.1	1.562
0.04 ppm 群	1101	27.3	1.527
	1102	28.2	1.464
	1103	29.1	1.540
0.12 ppm 群	1201	28.7	1.565
	1202	28.5	1.646
	1203	27.3	1.368
0.04 ppm 群	1301	27.1	1.256
	1302	29.3	1.737
	1303	28.5	1.596

1 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1004	29.2	1.610
	1005	26.5	1.249
	1006	28.3	1.593
0.04 ppm 群	1104	29.4	1.560
	1105	27.5	1.261
	1106	25.9	1.216
0.12 ppm 群	1204	29.1	1.475
	1205	27.2	1.369
	1206	26.1	1.042
0.04 ppm 群	1304	27.6	1.152
	1305	27.8	1.550
	1306	29.9	1.694

3 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1007	26.9	1.463
	1008	27.7	1.355
	1009	25.9	1.453
0.04 ppm 群	1107	26.2	1.277
	1108	27.7	1.515
	1109	27.8	1.507
0.12 ppm 群	1207	27.2	1.515
	1208	26.8	1.446
	1209	25.2	1.224
0.40 ppm 群	1307	27.3	1.504
	1308	28.7	1.657
	1309	25.6	1.311

7 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重(g)	肝臓重量(g)
対照群	1010	26.0	1.330
	1011	28.2	1.433
	1012	27.4	1.597
0.04 ppm 群	1110	28.3	1.559
	1111	27.5	1.496
	1112	26.4	1.364
0.12 ppm 群	1210	27.6	1.544
	1211	26.9	1.464
	1212	28.3	1.530
0.40 ppm 群	1310	27.5	1.538
	1311	28.9	1.238
	1312	25.9	1.375

表 6 剖検所見(22時間暴露)

1回目暴露終了時解剖

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
0.04 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
0.12 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
0.40 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

1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
0.04 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
0.12 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
0.40 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

3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
0.04 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
0.12 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
0.40 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

7日目解剖

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
0.04 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
0.12 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
0.40 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 7 病理組織所見(22時間暴露)

1回目暴露終了時解剖

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
0.04 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
0.12 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
0.40 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

1日目解剖

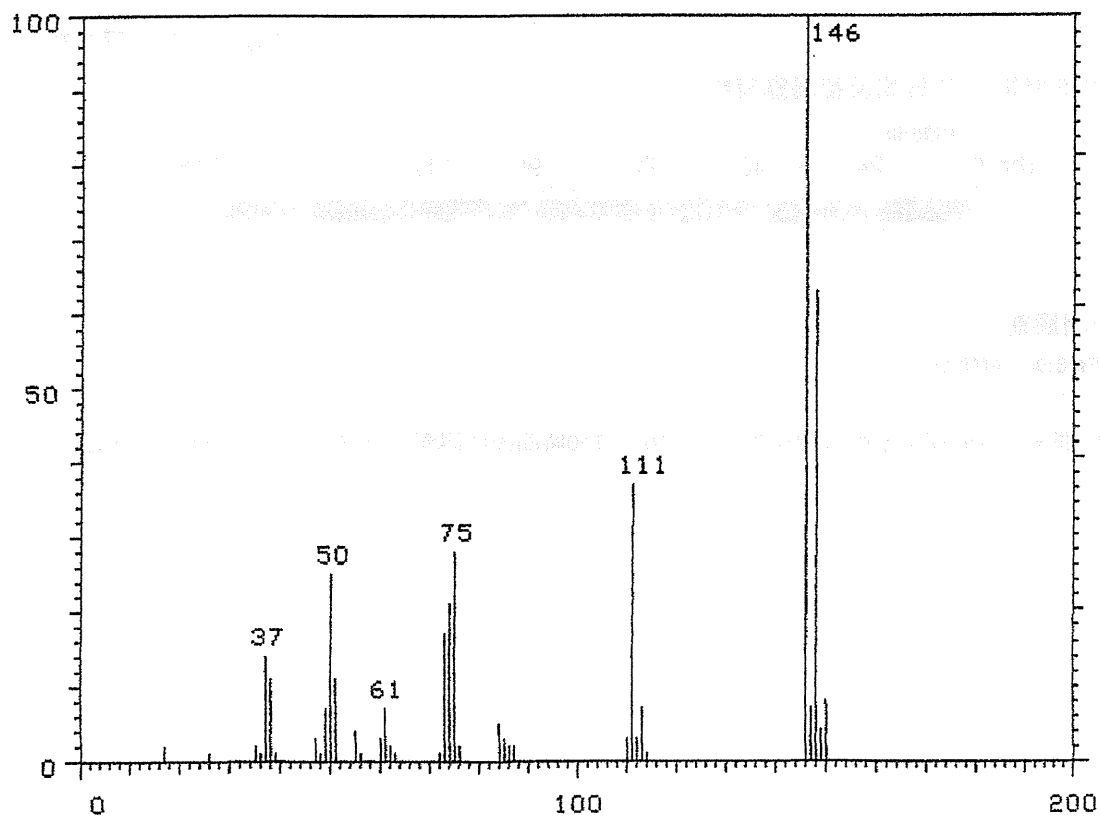
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

3日目解剖

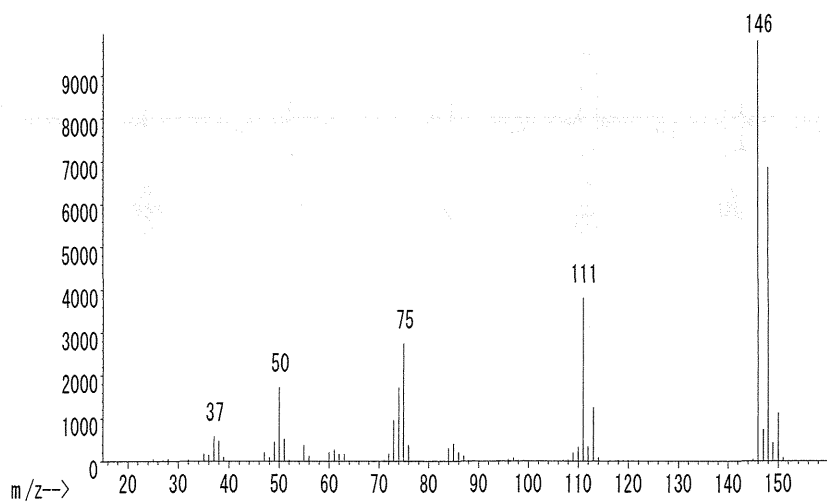
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.04 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.12 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
0.40 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

7日目解剖

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
0.04 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
0.12 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
0.40 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



被験物質のマススペクトル



パラジクロロベンゼンのマススペクトル

McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.
6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.

図1 マススペクトル

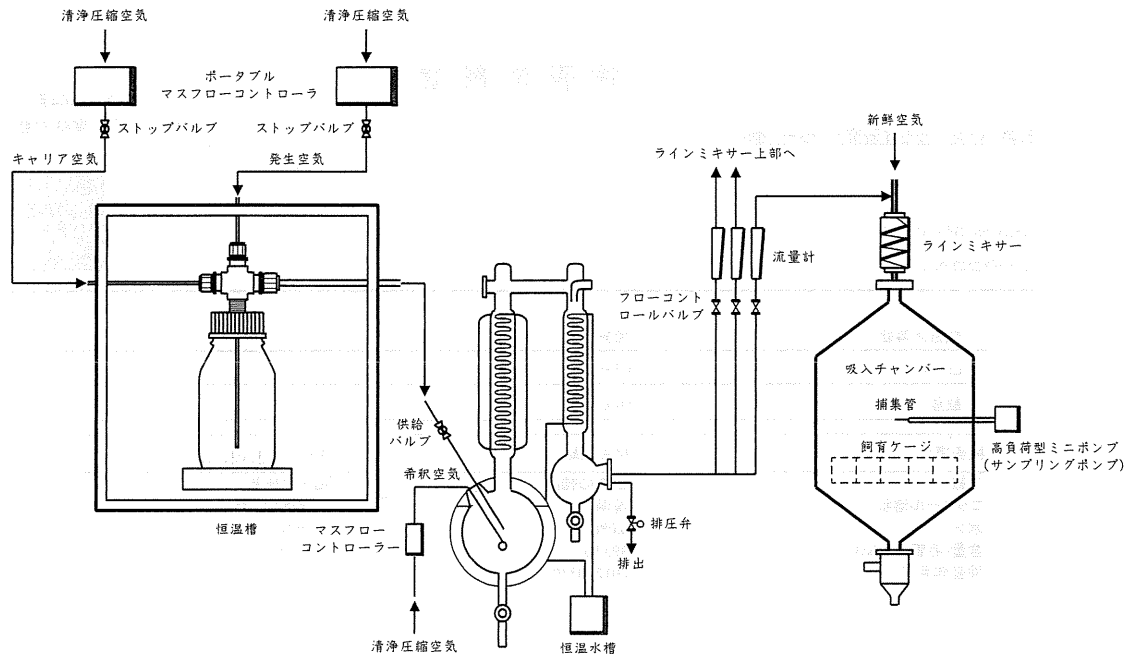


図 3 吸入装置のシステム

別紙-1

検査成績書

日本バイオアッセイ研究センター 御中

2013年4月11日
和光純薬工業株式会社

Code No.047-01315

p-ジクロロベンゼン



規格/等級	和光特級	
Lot No.	WEP0371	
数量	500g	
検査項目	検査成績	規格値
外観	白色の結晶	白色の結晶
エタノール溶状	澄明	試験適合(澄明)
水分	0.0%	0.1%以下
含量(毛管カラムGC)	99.9%	98.0%以上
検査年月日	2012/03/02	

判定	合格	検査責任者	上田恵美
----	----	-------	------

(1/1)

成績書発行番号 9999197

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

(分担研究者) 平成 25 年度研究報告書

「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」

分担研究者 慶長直人 (公財)結核予防会 結核研究所 生体防御部 部長

研究協力者 松下育美、土方美奈子 同部

研究要旨 化学物質が気道を通じて吸入される場合、低濃度でも人体に有害な影響を与えることが知られているが、どのような機構が背景にあるかは十分に明らかにされていない。シックハウス症候群について、ヒトの細胞モデル系を構築することは、そのメカニズムを知る上で重要な研究方法の一つと考えられる。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り、我々はこれまでヒト気道上皮細胞株を用いて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することを示し、また、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てきた。本年度は、ホルムアルデヒド以外のシックハウス関連の4種の化学物質について同様の検討を行い、クロルピリホスでも、ホルムアルデヒドと同様の IL-8 産生増強効果が見られることを示した。一方、トルエン、アセトアルデヒド及びキシレンにおいては、IL-8 の mRNA 増強効果は明らかでなかった。クロルピリホスの効果もホルムアルデヒド同様に、IL-8 発現に関連した JNK などのシグナル伝達系を介したものであるかどうか、今後の検討が必要である。現在、これら以外のシックハウス関連化学物質の影響についても順次検討を進めている。

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。環境中の微量な化学物質に反応して精神や身体の不調を引き起こす「シックハウス症候群」に関連して指針に定められている 13 種の化学物質のうち我々はこれまでホルムアルデヒドを中心に検討を重ねてきた。気道上皮細胞の炎症応答に及ぼす影響を検討するため、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いて、日常的な経気道性のウイルス曝露などを念頭に置いた poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する化学物質添加による *in vitro* での影響を定量 RT-PCR で検出する系を確立してきた。ホ

ルムアルデヒドではさらに、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、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 IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示した。

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化学物質添加による炎症応答への影響を検討する *in vitro* 実験系において、本年度はホルムアルデヒド以外の4種類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かの実験を行った。

B. 研究方法

B. 研究方法

「刺激物質」

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。

「化学物質」

シックハウス症候群関連 13 化学物質のうち、クロルピリホス、アセトアルデヒド、トルエン、キシレンの4種の化学物質を用いた。

「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 25 cm² フラスコで培養し (5 × 10⁵ cells /flask)、90% confluent で、poly I:C (1, 10 μg/ml) で 24 時間刺激後、各化学物質を段階希釈して各々数段階の濃度で 3 時間添加した後、細胞を回収、total RNA を抽出した。これまでの系と同様に、1 μg の total RNA を random primer を用いて逆転写反応を行い、反応液量の 1/20 を 1PCR 反応に持ち込み、IL8 の mRNA 発現レベルを TaqMan Gene Expression Assay (Hs00174103_m1) を用いた定量的 RT/PCR で測定した。内在性コントロールには Human GAPDH を用い、Δ Δ Ct 法で非刺激細胞での発現を 1 としたときの各細胞での相対発現量を求めた。

(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

図1A

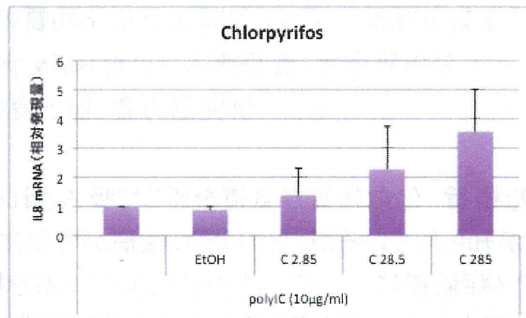


図1B

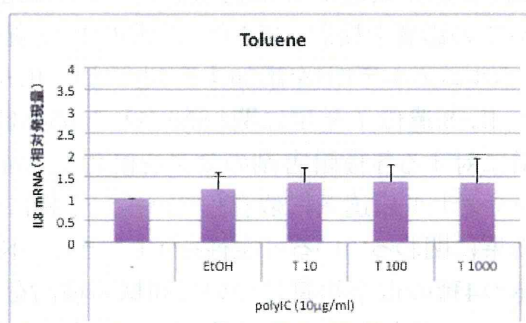


図1C

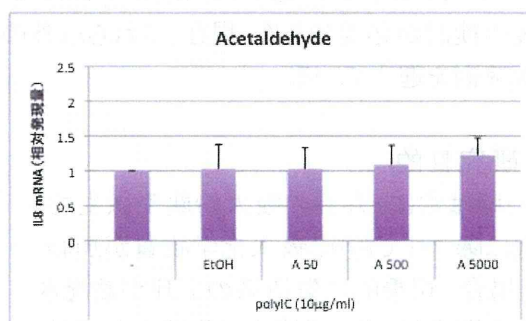


図1D

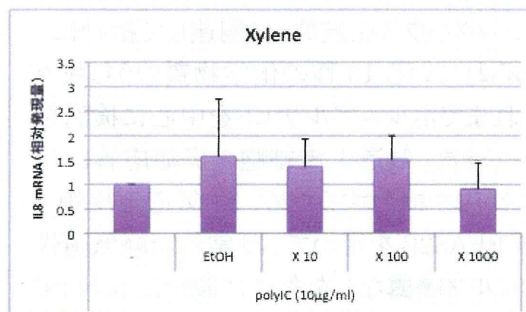


図1 Poly I:C (10 μg/ml) 存在下 24 時間、(A)クロルピリホス、(B)トルエン、(C)アセトアル

デヒド, (D)キシレン添加後3時間の IL-8 の 遺伝子発現レベル

ヒト気道上皮細胞株を用いてシックハウス症候群関連の化学物質の潜在的な炎症増強作用を解析する *in vitro* の系において、インターロイキン 8 (IL-8) の mRNA 発現量を指標にして、微生物関連物質 (polyI:C) と各種化学物質との複合効果が見られるか否かを検討した。

本年度は化学物質として、A: クロルピリホス (2.85, 28.5, 285 μ M)、B: トルエン (10, 100, 1000 μ M)、C: アセトアルデヒド (50, 500, 5000 μ M)、D: キシレン (10, 100, 1000 μ M)を選択し、BEAS2B 細胞株を poly I:C (1, 10 μ g/ml)で 24 時間刺激後、各種化学物質を 3 時間添加することにより、IL-8 mRNA の定量を実施し、同様な効果が認められるか否かを検討した。

その結果、クロルピリホスにおいては、IL-8 の産生増強の効果が認められたが、その他、トルエン、アセトアルデヒド、キシレンにおいては、IL-8 の mRNA 発現量に明らかな増強効果は認められなかった(図 1A, B, C, D)。

D. 考察

ヒト気道上皮細胞株 (BEAS2B 細胞)を用いた *in vitro* の炎症応答検出系により、クロルピリホス、アセトアルデヒド、トルエン、キシレンの 4 種のシックハウス関連化学物質の複合的な作用が見られるか否かを *in vitro* 解析系により検討した。

微生物関連物質 poly I:C 曝露を加えることにより、クロルピリホスでも、ホルムアルデヒドで見られたのと同様の IL-8 産生増強効果が観察された。一方、トルエン、アセトアルデヒド及びキシレンにおいては、IL-8 の mRNA 増強効果は明らかでなかった。

これまで、ホルムアルデヒドでは、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のうち、特に JNK 系が IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性が明らかにされたが、クロルピリホスでも同様のシグナルを介しているかどうかは今後の検討が必要である。クロルピリホスは、シロアリ駆除などに用いられる常温で固体の有機リン化合物であり、2003 年のシックハウスによる健康被害防止のために建築基準法が改定され、現在、居室を有する建築物の新規の建材には使用が禁じられている。このとき、ホルムアルデヒドとクロルピリホス2種類の化学物質が規制対象となったことは、今回の結果を踏まえると、たいへん妥当であったと考えられる。現在、これら以外のシックハウス関連化学物質の影響についてもさらに検討を進めている。

E. 結論

ヒト気道上皮細胞株を用いた *in vitro* 系においては、微生物由来物質の存在により、複数の化学物質の吸入曝露による有害作用が増強される可能性を示しており、化学物質のヒトへの影響を見る際の細胞モデルとして有用と思われた。今後、シックハウスと関連すると考えられる、この4種以外の化学物質についても、同様の手法による検討結果を比較することにより、吸入曝露動物モデルにより得られた遺伝子発現様式と比較するための基礎データを得ることができるものと考ええる

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

1. 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.

2. 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.

2. 学会発表

国際学会発表

1. Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Keicho N. Beta defensin-1 expression and genetic polymorphisms in human airway epithelial cells. In:18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, November 11-14, Yokohama, Japan, 2013.

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とホルムアルデヒドの毒性応答メカニズムにおける複合効果の検討. In:第53回日本呼吸器学会学術講演会, 4月19日-21日, 東京, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成25年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H23-化学一般-001）
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-

分担研究報告書

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 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、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、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25年度はパラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について、極低濃度下（0、0.04、0.12、0.4 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、初年度のホルムアルデヒド及び昨年度のキシレン暴露と同様に、暴露期間中、神経活動の指標となる前初期遺伝子（Immediate early gene: IEG）（Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Egr2遺伝子等）の顕著な発現抑制が低用量群から、すなわち指針値レベルの濃度から認められ、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認められた。化学構造の異なる3物質（ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン）に共通して示唆された海馬における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られ、その原因解明の手がかりとなる可能性がある。

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

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3年間の研究（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レベル低濃度暴露を考慮した吸入トキシコゲノミクスを核とする評価体系の開発—」（H20-化学-一般-001））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）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) 酸化的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、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捉えているものと考えられ、動物実験から人へ外挿が困難という課題が、本トキシコゲノミクス手法により克服されることが明らかとなった。

この成果を踏まえ、本研究は、第一に極低濃度下で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、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、を目的とする。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（平成25年度）は、パラジクロロベンゼン（指針値：0.04 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 で一晚浸漬し、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℃にて保存した。抽出に当たっては、RNAlater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砕液を調製した。得られた破砕液の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℃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ェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

吸入暴露実験

本年度(平成24年度)は、パラジクロロベンゼン(paradichlorobenzene; 分子量147.0、CAS No. 106-46-7)についてデータ解析を進めた。先行研究と同じものを使用した(カタログ番号: 047-01315、和光純薬工業)。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、パラジクロロベンゼンの室内濃度指針値が0.04 ppmであることから、これを参照し、公比 $\sqrt{10}$ で0.04、0.12及び0.4 ppm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。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。

(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

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: パラジクロロベンゼン極低濃度[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: パラジクロロベンゼン[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1,963 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99 psが見いだされた。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として、神経活動の指標となる前初期遺伝子(Immediate early gene: IEG) (Arc、JunB、Dusp1 及び Ier2)の発現増加が認められた(いずれも暴露22、70及び166時間後、低・中・高用量)。ただし、いずれも暴露6時間後は発現減少が認められた(低・中・高用量)。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。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして3,174 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18 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。

C-1-2: パラジクロロベンゼン[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1,940 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51 psが見いだされた。肝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。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。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして1,571 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして28 psが見いだされた。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。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。

C-1-3: パラジクロロベンゼン[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:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして1,802 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。肺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。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。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして1,246 ps、このうち目視