

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 14 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-2: パラジクロロベンゼン極低濃度[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: パラジクロロベンゼン[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 2,031 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 126 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 620 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 14 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、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 IEG の遺伝子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。具体的には、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4 及び Egr2 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、キシレン吸入暴露の場合と同様であった。

このことから、パラジクロロベンゼン[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、Pol 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、その機能が修飾された結果、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

過時間をとり、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。

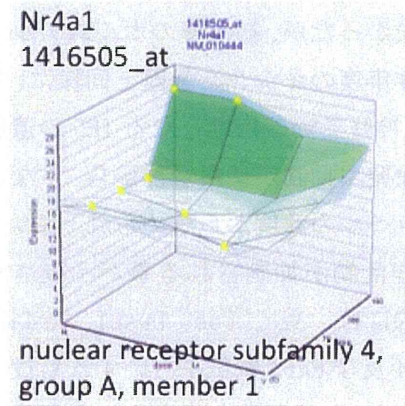
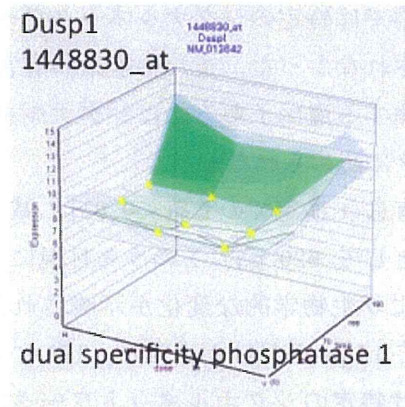
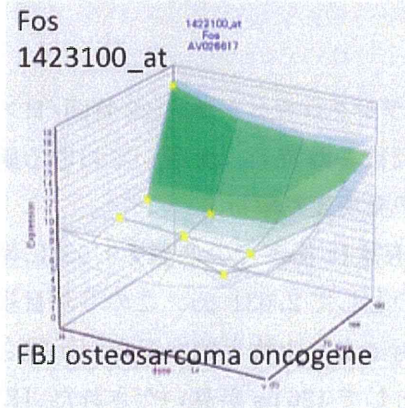
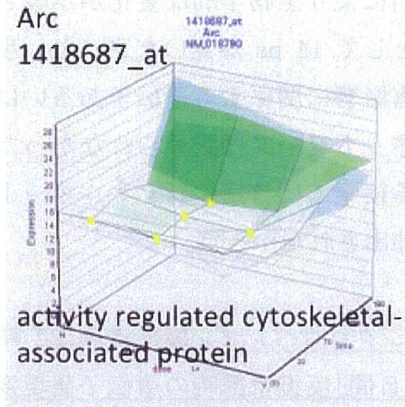


図1 パラジクロロベンゼン[22時間/日×7日間]反復暴露時の「海馬」における前初期遺伝子(Immediate early gene: IEG)である Arc、Fos、Dusp1 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動

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を[6時間/日×7日間]反復暴露時について検討した。その結果 6時間暴露完了時にも、上記 IEG 遺伝子群の発現減少が認められた。しかし、6時間暴露の16時間後には、発現が増加するリバウンド現象が認められた。これらのことから、パラジクロロベンゼン吸入暴露による 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、16時間後にはその都度、リバウンド現象が誘発されている可能性があることが示された。尚、この結果は、ホルムアルデヒド及びキシレンの暴露の場合と同様であった。IEG 遺伝子の内、Arc 及び Dusp1 遺伝子の発現変動を図2に示す。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、初回暴露開始後6、22、70及び166時間後、[22時間/日×7日間]反復暴露の場合は、初回暴露開始後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時である。

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、発現抑制は比較的軽度であることから、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示唆された。また、リバウンド現象が現れるためには2時間の休止は不十分であり、16時間以上では十分である可能性が示された。

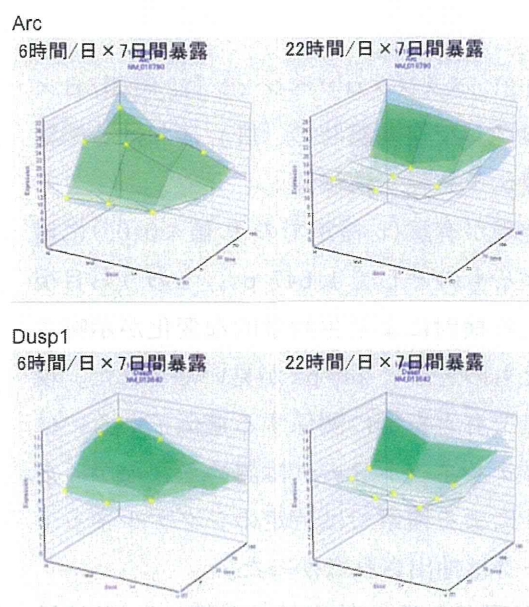


図 2 「海馬」における初期応答遺伝子 (Immediate early gene: IEG) である Arc (上段) 及び Dusp1 遺伝子 (下段) のパラジクロロベンゼン[6 時間/日×7 日間]反復暴露の場合 (左)、及び[22 時間/日×7 日間]反復暴露の場合 (右) の発現変動の比較

溶媒群と投与群との有意差の検定を 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: パラジクロロベンゼン[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 1,647 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 240 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。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 1,135 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 41 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-2-3: パラジクロロベンゼン[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:

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に増

加するものとして 897 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 26ps 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として酸化ストレス関連遺伝子が見いだされた。具体的には Gpx2、Aox1、Gsta2 及び Gsta1 遺伝子(暴露 22 及び 166 時間後、高用量)、Prdx1 及び Gstm1 遺伝子(暴露 166 時間後、高用量)の発現増加が認められた。IPA による検索でも Oxidative stress として酸化ストレスが抽出された。したがって、パラジクロロベンゼンの極低濃度暴露により肺において酸化ストレスが生じている事が示唆された。この内、Gpx2 及び Aox1 遺伝子の発現変動について図 3 に示す。

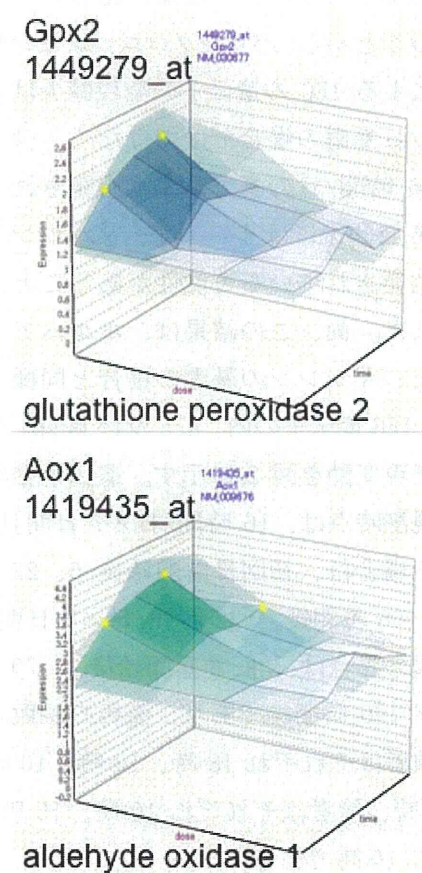


図3 パラジクロロベンゼン[22時間/日×7日間]反復暴露時の「肺」における酸化ストレス関連遺伝子である Gpx2 及び Aox1 遺伝子の発現変動

溶媒群と投与群との有意差の検定を 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。

他方、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 1,232 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 48 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。

有害事象との関連は明らかではないが、海馬において発現変動が認められた IEG 遺伝子群の一部に発現減少が認められた。具体的には、Dusp1、Nr4a1、Klf2 遺伝子である(いずれも暴露開始後 22、70 及び 166 時間、低・中・高用量)。この内、Dusp1 及び Klf2 遺伝子の発現変動について図3に示す。これらの遺伝子の発現変動は、肺と海馬に共通して、これらの遺伝子発現開始点上流に同一の転写調節因子が結合した結果誘発される可能性が考えられたが、現時点ではこの転写調節因子は不明である。今後、より短い2時間単回暴露時の海馬、及び肺・肝の遺伝子発現変動を解析することにより、神経活動抑制の上流に位置する分子機序と肺・肝の関与が解明できるものとする。

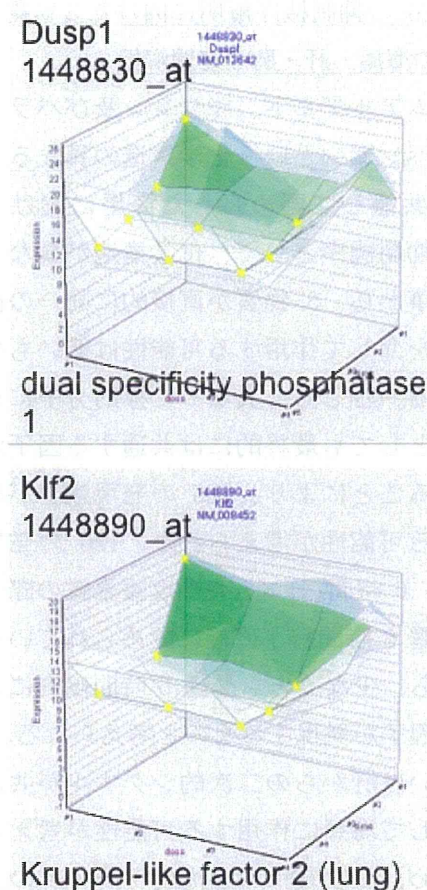


図4 パラジクロロベンゼン[22時間/日×7日間]反復暴露時の「肺」における IEG である Dusp1 (上段) 及び Klf2 遺伝子 (下段) の発現変動

C-3: IEG の抑制機序解明に向けた3物質についての海馬・肝・肺の連関解析:

ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼンという化学構造の異なる3物質に共通して認められた海馬におけるIEGの抑制機序として、化学構造が異なっていることから、3物質が直接的に同一の標的分子を介して作用する可能性は低いものとする。むしろ、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が介在することにより、IEGの発現減少が誘発される可能性が考えられた。IEGの発現抑制は、6時間/日×7日間反復暴露の際の初回暴露6時間終了直後に認められていることから、少なくとも暴露6時間以内にこの共通因子が発現するものと考えられる。

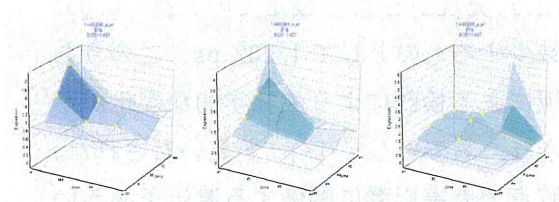
肺或いは肝からの二次的シグナルが共通因子として海馬に作用する可能性が考えられたため、3物質につき海馬・肝・肺の連関解析を試みた。その結果、6時間/日×7日間反復暴露時の肺及び肝において、インターロイキン1β (I11b) 遺伝子の発現増加が3物質に共通して認められたため、この分子が共通因子の候補と考えられた。この肺及び肝におけるI11b遺伝子の発現変動を図5に示す。

次いでI11b遺伝子がIEG遺伝子の転写発現調節因子であるか否かを検索する目的で、IEG遺伝子(Arc, Fos, Dusp1, Nr4a1, Junb, Egr4, Cyr61, Egr2, Ier2, Klf2)につきプロモーター解析(*in silico*) (Upstream analysis, Ingenuity Pathways Analysis)を検討したところ、I11bが候補として抽出されてきたことから、この分子がIEGの発現抑制因子の候補が支持される。文献検索の結果、I11bが海馬依存的な記憶に障害

を与えるという報告(Gonzalez Pら、Brain Behav Immun 34:141-150, 2013)が見いだされた。このことから、I11bがIEGの発現抑制を介し、情動認知行動異常、特に記憶障害を誘発する可能性が考えられる。

A: 肺 interleukin 1 beta (I11b)

ホルムアルデヒド キシレン パラジクロロベンゼン



B: 肝 interleukin 1 beta (I11b)

ホルムアルデヒド キシレン パラジクロロベンゼン

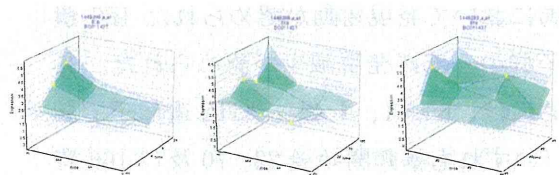


図5 3物質の[6時間/日×7日間]反復暴露時の肺(A)及び肝(B)におけるinterleukin 1 beta (I11b)遺伝子の発現変動

しかし、6時間/日×7日間あるいは22時間/日×7日間反復暴露という比較的長時間暴露の際の観測時点では、IEGの発現減少を誘発する共通因子の遺伝子発現変動が終了し捉えられない可能性も考えられた。他方、6時間暴露の都度、リバウンド現象

が誘発されている可能性があること、22 時間反復の後の 24 時間後にリバウンド現象が認められていること、の二点から、IEG 抑制を誘発する因子は、毎日の反復暴露の都度に同程度に海馬に作用していた可能性も残される。今後、より短い 2 時間単回暴露時の海馬、及び肺・肝の遺伝子発現変動を解析することにより、より詳細に神経活動抑制の上流に位置する分子機序と肺・肝の関与が解明できるものとする。

D. 結論

本年度（平成 25 年度）はパラジクロロベンゼン（指針値:0.04 ppm、暴露目標値 0.04、0.12 及び 0.4 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。

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（IEG 遺伝子群）が見いだされた。具体的には、パラジクロロベンゼンの 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 IEG 遺伝子群、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Egr2 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、逆にこれらの発現の増加が認められた。このことから、パラジクロロベンゼ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 6 時間暴露直後に確認され、その後の観測点である暴露終了 16 時間目では、むしろリバウンド現象を示唆する所見を得た。したがって、IEG の遺伝子の発現抑制は一日毎の暴露時間に依存することが示唆された。

本 3 年間研究により、ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼンという化学構造の異なる 3 物質に共通して 22 時間/日×7 日間反復暴露の際に、海馬における神経活動抑制が示唆された。この抑制所見は、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られ、その原因解明の手がかりとなる可能性がある。この 3 物質に共通して認められた海馬における IEG の抑制機序として、化学構造が異なっている事から、3 物質が直接的に同一の標的分子を介して作用する可能性は低いものとする。むしろ、異なった標的分子に作用し、最終的に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。この共通因子の候補にインターロイキン 1β (Il1b) 遺伝子が挙げられた。しかし、6 時間/日×7 日間反復実験では、実験後半に上昇する傾向にあること、22 時間/日×7 日間反復暴露実験では上昇がみられないこと、などから上流因子としての要件を満たしていない可能性がある。今後、より短い 2 時間単回暴露時の海馬の遺伝子発現変動を解析することにより、より詳細に神経活動抑制の上流に位置する因子の解明が進むものとする。この神経活動の抑制所見は、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、情動認知行動解析と神経科学的物証の収集により、発生・発達期

暴露も考慮に入れて、海馬に対する有害性の実証及び遺伝子発現変動データの予見性の確認について検討計画中である。

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。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y, Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci* 38: 643-654, 2013.

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J, An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci*. 38(4):619-28, 2013.

2. 学会発表

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクス、第 40 回日本トキシコロジー学会学術年会(2013. 6. 18)

菅野 純、ケミカルバイオロジーの視点からのトキシコゲノミクス：Percellome Project の進捗とその応用性、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013. 6. 18)

Kanno J, Percellome Toxicogenomics : a quantitative and comprehensive approach for basic and applied toxicology. The XIII International Congress of Toxicology 2013 (ICT 2013) (2013. 7. 2), Seoul, Korea, Invited

G. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

特許第 5177712 号、2013 年 1 月 18 日登録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究所、NTT データ、発明者：菅野純、相崎健一ら、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」特願 2012-148848、出願日 2012 年 7 月 2 日 (出願中)

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343、出願日 2012 年 7 月 17 日 (出願中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成25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二つの研究課題を立てた。

第一の研究課題として、H24年度に極低濃度キシレン（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・北嶋等実施）したマウスの肺組織について透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた高精度な形態学的解析を進めた。TEMによる肺の形態学的解析には本分担研究でH24年度前半までに基盤技術確立を終えたTEM試料の作製・検索方法を用いた。この方法は、通常の病理組織標本と同程度の大きさのエポキシ樹脂包埋セミシン標本を作製して光学顕微鏡でTEM検索部位を選定、その部位をセミシン標本から取り出してTEM検索試料を作製するもので、光学顕微鏡で特定の部位に絞り込んだTEMによる高精度解析と、これまでのTEM検索では不可能であった対照群と投与群間、あるいは投与群間での形態学的変化の比較検討が可能となる。

その結果、極低濃度キシレン暴露した肺の気道終末部の上皮細胞にクララ細胞の分泌顆粒の増加を示唆する所見が認められたが、細胞のオルガネラレベルでの暴露の影響を正確に評価するには正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動幅に関する知見を蓄積が必要である。

第二の研究課題として、パラジクロロベンゼンを極低濃度（0、0.04、0.12及び0.40 ppm；指針値：0.04 ppm）でマウスに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・北嶋等で実施）して、主要臓器（肺、脳、肝臓、腎臓、心臓及び脾臓）の病理組織学的検索を実施して検索した結果、主要臓器に暴露の影響は認められなかった。TEM検索用に保存した肺組織はエポキシ樹脂包埋ブロックを作製し、高濃度群のセミシン切片作製まで試料作製を進めた。

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オルガネラレベルでの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た。H25年度は二つの研究課題を設定した。その一つはH24年度に暴露を実施した極低濃度キシレン（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・北嶋等実施）したマウスの肺組織について透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた高精度な形態学的解析を進めることであり、二つ目の課題はパラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）を極低濃度でマウスに22時間/日×28日間反復吸入暴露して、主要臓器の光学顕微鏡による病理組織診断と吸入暴露での標的臓器となることが予想される肺組織のTEMによる詳細検索を行うこととした。

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1mm³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。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。このTEM試料の作製・検索方法を極低濃度キシレンの28日間暴露試験のTEM検索に応

用して極低濃度キシレ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、極低濃度パラジクロロベンゼン28日間暴露試験のTEM検索については肺のエポキシ樹脂包埋を行い、高用量群はセミシン標本の作製まで進めた。

B. 研究方法

B-1：極低濃度キシレンに28日間暴露したマウス肺のTEMによる詳細検索

H24年度に極低濃度キシレン（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・北嶋等実施）したマウスの肺組織をTEM検索用に固定、保存した。

本年度はこの肺組織を用いてTEMによる高精度な形態学的解析をH24年度までに基盤技術確立を終えたTEM試料の作製・検索方法を応用して進めた（図1、2）。この方法は、通常の病理組織標本作製と同程度の大きさの組織片を臓器から切り出してTEM検索用の固定（本分担研究では細気管支主幹に沿って切り出した肺の全割組織）、エポキシ樹脂包埋、約2 μ mの厚さで薄切を切片をスライドガラスに貼り付けてトルイジンブルー染色を施した大型のセミシン標本作製する。それを光学顕微鏡で観察して任意のTEM検索部位を選定。選定したTEM検索部位をスライドガラスから剥がしてエポキシ樹脂に再包埋して超薄切用のエポキシ樹脂包埋ブロックを作製し、ダイヤモンドナイフで厚さ100nm前後の超薄切切片を切削してTEM検索用試料とするもので、TEMによる検索はJEM 1400（日本電子）を用いて加速電圧80～100kvで行った。TEM検索部位として、肺の全割セミシン切片から線毛上皮が主に分布する細気管支主幹から1ポイント、非線毛細胞（クララ細胞）などが主として分布する気道末端部から1ポイントを選定した（図3）。

B-2：極低濃度のパラジクロロベンゼンを22時間/日×28日間反復吸入暴露

(1) 吸入暴露

パラジクロロベンゼンの極低濃度下の28日間反復吸入暴露は吸入暴露と暴露期間中の動物管理と体重、摂餌量測定及び一般症状観察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した。動物は雄性C57BL/6Jマウス（日本チャールスリバー）に1群6匹、3用量群（0.04、0.12及び0.40 ppm）と対照群（0 ppm）にて、8週齢から暴露開始、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）を実施した。

投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由：投与経路は室内環境におけるヒトへの主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。投与期間は、連続暴露による影響を光学顕微鏡とTEMを用いた高精度検索をするため、28日間とした。

暴露濃度の設定理由：パラジクロロベンゼンの室内濃度指針値である0.04 ppmを考慮して、最高暴露濃度を0.40 ppmとし、以下0.12、0.04 ppmの3段階の濃度（公比3）を設定した。

パラジクロロベンゼンの暴露方法：恒温槽（40℃）に浸漬したパラジクロロベンゼン入り密封容器に、高温槽で60℃に加温した清浄空気（発生空気）を供給し、パラジクロロベンゼンを気化させた。このパラジクロロベンゼンを含む空気と清浄空気（キャリア空気）を混合し、被験物質供給装置（柴田科学株式会社）の発生容器に導入、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、ラインミキサー内で空調された新鮮空気と混合し、設定濃度としたパラジクロロベンゼン混合空

気を吸入チャンバーに送り込んだ。新鮮空気はHEPAフィルターと活性炭フィルターにより濾過した空気を使用した。なお、暴露濃度は毎日捕集管を用いてパラジクロロベンゼンを捕集、日本バイオアッセイ研究センターで分析/濃度測定を行い、その結果を基にパラジクロロベンゼンガスの供給量を補正しつつ暴露を行った。具体的には、前日の濃度分析結果を基に、ガス供給量を浮子式流量計のフローコントロールバルブにて調節することにより目的濃度を作製した。捕集管で捕集したパラジクロロベンゼンの分析/濃度測定は固相吸着-溶媒抽出法で行った。

(1) 動物管理

以下の条件で飼育した。

① 飼育環境

温度 : 検疫室 ; 23±2 °C

吸入試験室 ; 21±2 °C

吸入チャンバー内 ; 20~24 °C

湿度 : 検疫室 ; 55±15 %

吸入チャンバー内 ; 30~70 %

明暗サイクル: 12時間点灯 (8:00~20:00)

/ 12時間消灯 (20:00~8:00)

換気回数 : 検疫室 ; 15~17回/時

吸入試験室 ; 5~7回/時

吸入チャンバー内 ; 12±1回/時

圧力: 吸入チャンバー内 ; 0~15×10Pa

吸入チャンバーの容積 : 3m³

ケージへの動物の収容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

馴化期間 : ステンレス製3連網ケージ

(95(W) x 116(D) x 120(H) mm/匹)

投与期間 : ステンレス製5連網ケージ

(100(W) x 116(D) x 120(H) mm/匹)

② 飼料

パラジクロロベンゼン暴露中を含む全飼育期間を通じて、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場 : 千葉県千葉市美浜区新港

8-2) のCRF1固型 (30kGy-γ線照射滅菌飼料) を飼料給餌器により自由摂取させた。

試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株) から分析データを使用ロット毎に入手して保管した。また、飼料中の夾雑物は、本試験の試験計画書に規定した許容基準と照合して異常が無いことを確認した。

③ 飲水

パラジクロロベンゼン暴露中を含む全飼育期間を通じて、市水をフィルター濾過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

④ 動物の生死及び一般状態の観察

検疫馴化期間は、生死及び瀕死の確認を毎日1回以上、一般状態の詳細観察は馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に行った。

パラジクロロベンゼン暴露期間は、生死及び瀕死の確認、一般状態の観察を毎日1回以上行った。

⑤ 体重及び摂餌量測定

検疫馴化期間は、全動物について、馴化開始日、馴化7日後及び馴化最終日(群構成時)に体重を測定した。

パラジクロロベンゼン暴露期間は、週2回体重を測定し、解剖時にも測定した。

(2) 解剖、マウスの肺の TEM 検索に向けた採材・固定

暴露28日目 (12週齢) に C57BL/6J 雄マウスをネブタール 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 (インスタント燐酸緩衝液4、三菱化学ヤトロン (株)、1/15 mol/L、pH 7.2をベース) にグルタール

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、真空デシケーター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℃で2ヶ月間保存した。左肺の全割組織を細気管支主幹に沿って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。エポキシ樹脂包埋ブロックを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厚さ1μmで切削。トルイジンブルーで染色してセミシン標本作製した(図1)。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・大西と国衛研・毒性部の共同で実施した。

(3) 主要臓器の臓器重量測定と病理組織学的検査

解剖時に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、胸腺を摘出して臓器重量を測定した。また肝臓、腎臓、脾臓、心臓について病理組織標本作製して学的検査を行った。肺についてはTEM検索用に作製した左肺細気管支主幹に沿って切り出した肺の全割セミシン切片を用いて病理組織診断を行った。

C. 研究結果

C-1: 極低濃度キシレンを28日間反復吸入暴露したマウスの肺のTEMによる検索

光学顕微鏡による観察では投与群の動物の細気管支の線毛細胞と気道終末部のクララ細胞には形態学的に対照群と差を認め無かったが、TEM検索で、極低濃度キシレン暴露群の動物の気道終末部の非線毛細胞(クララ細胞)などに分泌顆粒の増加を示唆する所見が認められた(図4~10)。現在のところ、

細胞のオルガネラレベルでの暴露の影響を正確に評価するには正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動に関する知見が不足しており、本分担研究で観察された上記の所見が極低濃度キシレン暴露の影響か否かの判定は出来なかった。

C-2: 極低濃度のパラジクロロベンゼンを22時間/日×28日間反復吸入暴露試験

パラジクロロベンゼンの暴露は設定通りに行われた。チャンバー内の実測暴露濃度を表1に示した。

動物の飼育状態には各群とも異常は認められず、体重、摂餌量にもパラジクロロベンゼン暴露の影響は認められなかった。体重推移を表2に、摂餌量推移を表3に、臓器重量を表4に示した。

肝臓、腎臓、脾臓、心臓について病理組織標本作製して組織学的検査を行った。その結果、各臓器ともパラジクロロベンゼン暴露の影響は認められなかった。病理組織検査の結果を表5に示した。肺の病理組織学的検査はエポキシ樹脂包埋組織した高用量群のセミシン標本で診断を行ったが、異常所見は認められなかった。脳と肝臓の組織写真をそれぞれ図11と図12に示した。

TEM検索に向けて肺の採材・固定、エポキシ樹脂で包埋を行った。

D. 結論

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0、0.2、0.7及び2.0 ppmの極低濃度で28日間全身吸入暴露した。その結果、動物の体重や臓器重量、主要臓器の病理組織学的検査では極低濃度のキシレン暴露の影響は認められなかった。TEMによる検索では気道終末部の上皮細胞に細胞オルガネラレベルでの形態学的変化が起きている可能性が示されたが、細胞のオルガネラレベルでの暴露の影

響を正確に評価するには正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動に関する知見が不足しており、本分担研究では観察された所見が極低濃度キシレン暴露の影響か否かの判定は出来なかった。本分担研究で開発した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により引き起こされる病態を捉えるのに有用なツールとして期待されるが、TEMによる詳細検索で肺に対する揮発性化学物質の極低濃度暴露の影響を検出するには、正常な肺組織でのオルガネラの形態学的変動幅に関する知見が蓄積する必要がある。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi M, Umeda Y, Katagiri T, Kasai T, Ikawa N, Nishizawa T, Fukushima S. Inhalation carcinogenicity of 1,1,1-trichloroethane in rats and mice. *Inhalation Toxicology* 25: 298-306, 2013.

Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 8: 30, 2013.

2. 学会発表

大西誠、笠井辰也、山本正弘、齋藤美

恵子、福島昭治

多層カーボンナノチューブの新しい分析法の提案：マーカーを用いた肺中多層カーボンナノチューブの微量定量法の開発 第86回日本産業衛生学会(2013年5月)(松山).

笠井辰也、片桐卓、大西誠、斎藤新、後藤薫、平井繁之、晴佐久満、西沢共司、福島昭治

多層カーボンナノチューブのラットにおける13週間全身吸入曝露試験：曝露環境（エアロゾル濃度、濃度制御、粒度分布m形態観察） 第86回日本産業衛生学会(2013年5月)(松山).

加納浩和、鈴木正明、梅田ゆみ、妹尾英樹、大西誠、松本道治、福島昭治

3-アミノフェノールのラット及びマウスへの経口投与による発がん性と慢性毒性 第86回日本産業衛生学会(2013年5月)(松山).

妹尾英樹、加納浩和、鈴木正明、大西誠、笠井辰也、高信健司、梅田ゆみ、相磯成敏、福島昭治

ナノマテリアルの生体影響評価における気管内投与法の有用性と活用方法 第28回発癌病理研究会(2013年8月)(沖縄).

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

動物、TEM 検索臓器、固定液

動物：C57BL/6J マウス、雄 12 週齢、肺

TEM 検索臓器：肺

固定液：2%パラホルムアルデヒド溶液 + グルタルアルデヒドを 0.5%添加

Buffer：インスタント燐酸緩衝液 4（三菱メディエンス（株）、1/15 mol/L、pH 7.2）

肺の固定手順

- 気管を甲状腺の下端で切断、断端から固定液を肺内に注入
- 両肺を肺門部で気管支から切断
- 左肺、右肺とも固定液に浸漬（肺は液面に浮いた状態）
- 真空デシケータで陰圧(0.05~0.06MPa)にして、肺胞内の残存空気を脱気
- 常圧に戻して放置 →肺は固定瓶の底に沈降

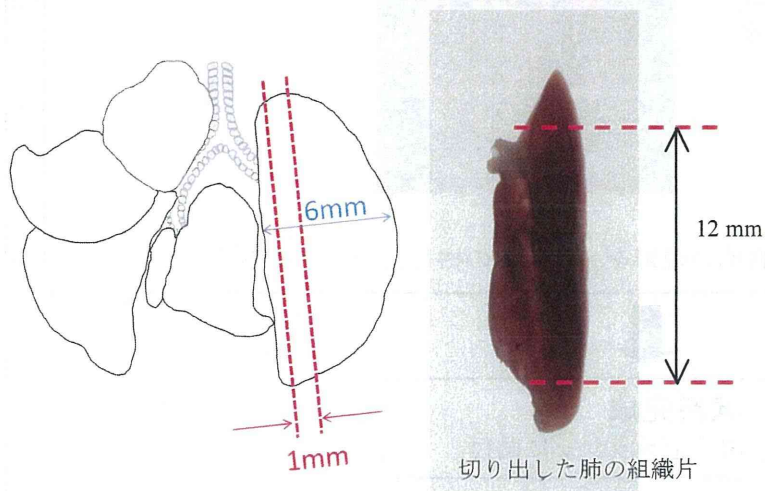


真空デシケーター

固定液のリンス、保存

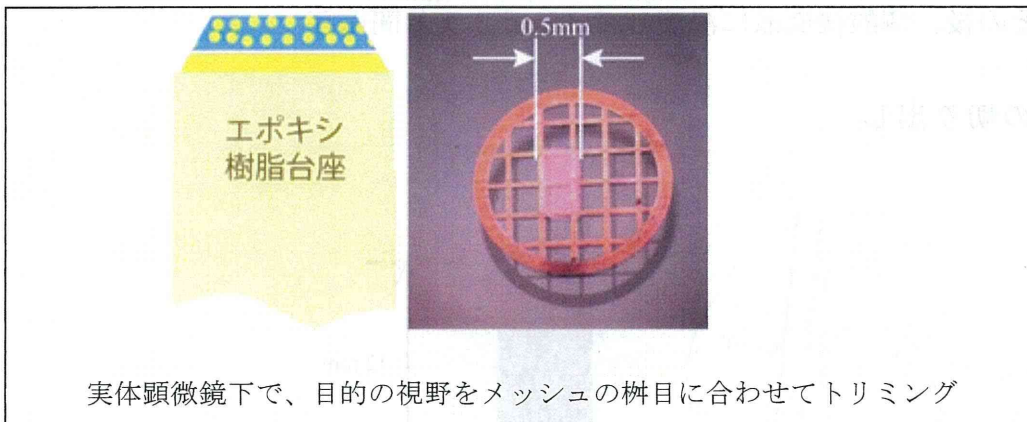
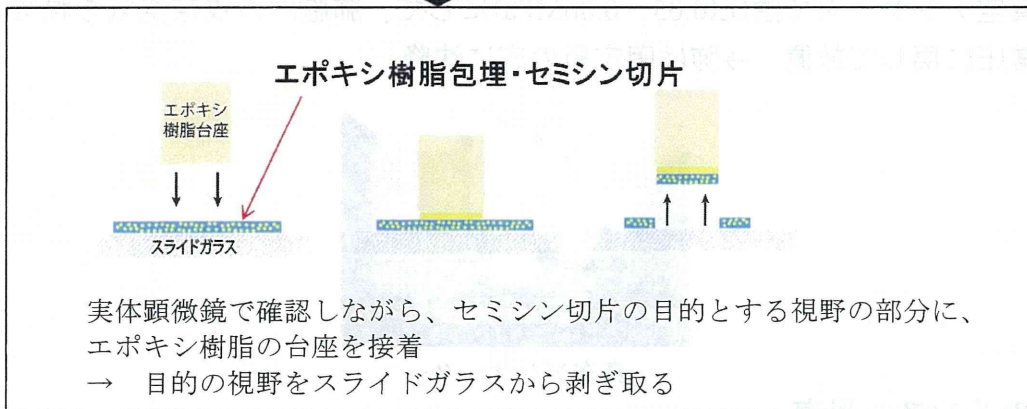
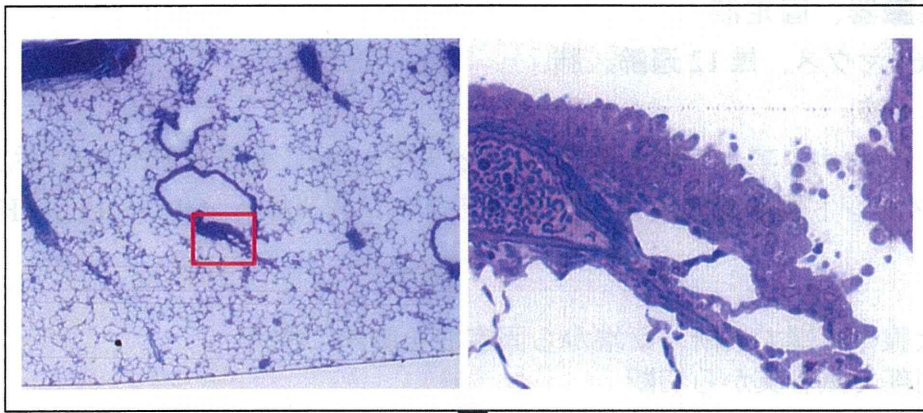
- 浸漬固定 1 日
- ショ糖を 3%添加した燐酸緩衝液を交換しながら 1 週間リンス
- その後、燐酸緩衝液に浸漬して 4°Cで 2 ヶ月間保存

肺組織の切り出し



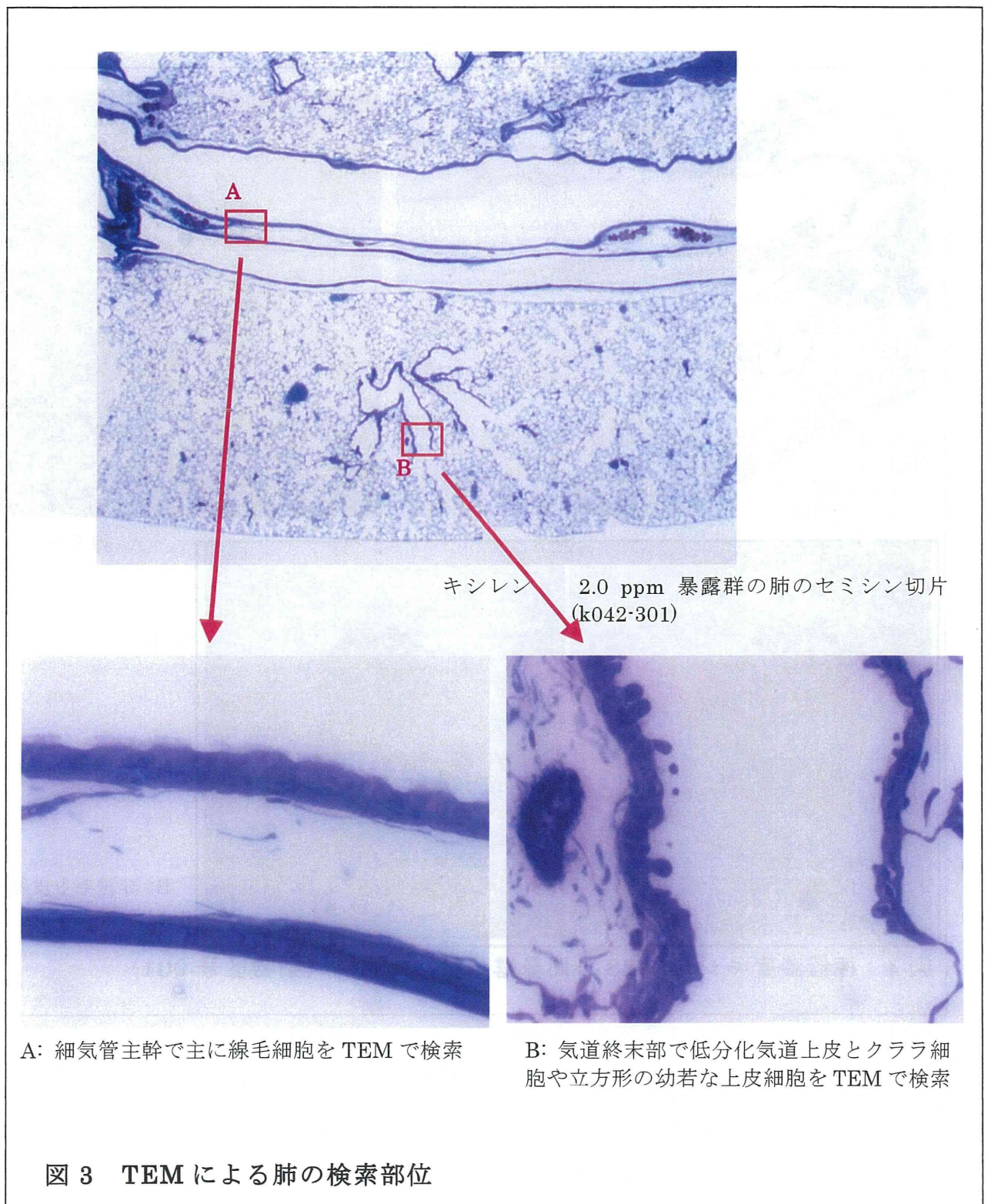
- 左肺を固定後、細気管支主幹に沿って全割組織を切り出す。
- 切り出した組織片をウルトラマイクロトームで薄切可能な大きさにトリミング（長辺が 12mm 以内）

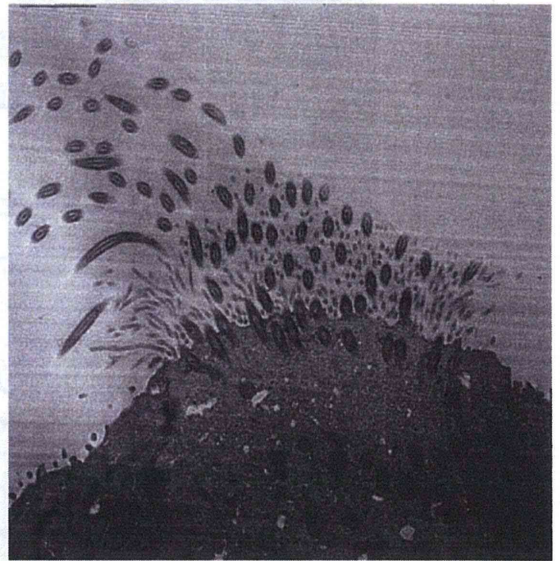
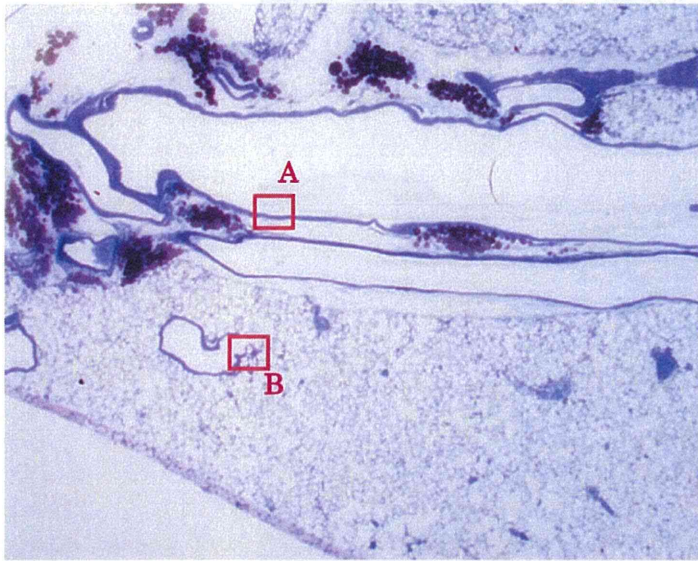
図 1 TEM 検索を目的とした肺組織の固定と切り出し



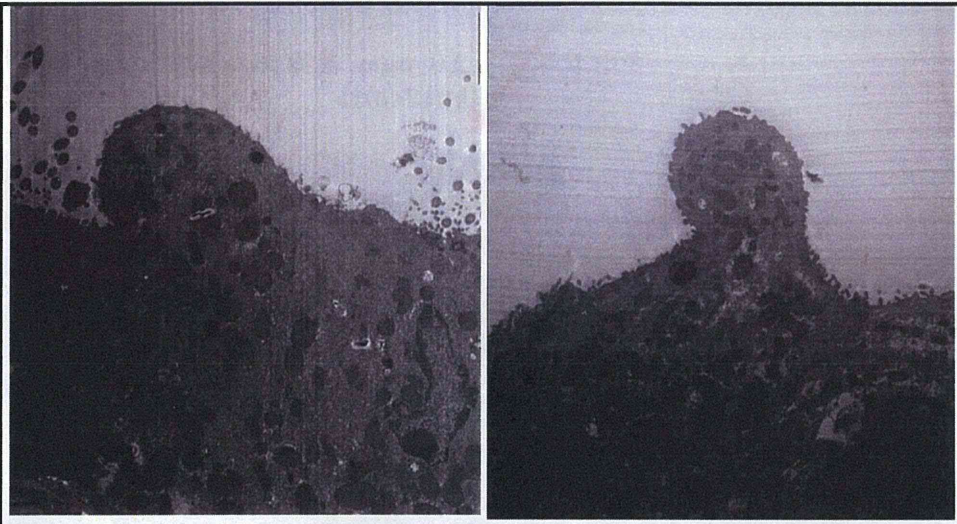
試料完成
超薄切片をメッシュに貼付

図 2 TEM 試料作製法



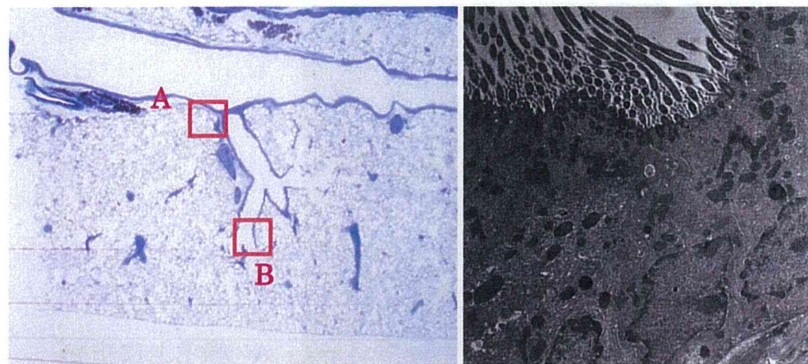


A: 線毛上皮細胞



B: 非線毛上皮細胞

図 4 極低濃度キシレン 28 日間暴露試験、対照群 (動物番号:001)

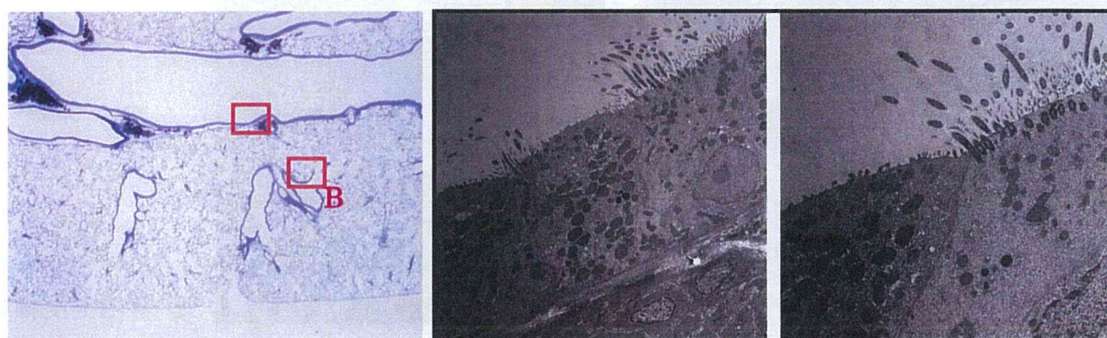


A: 線毛上皮細胞

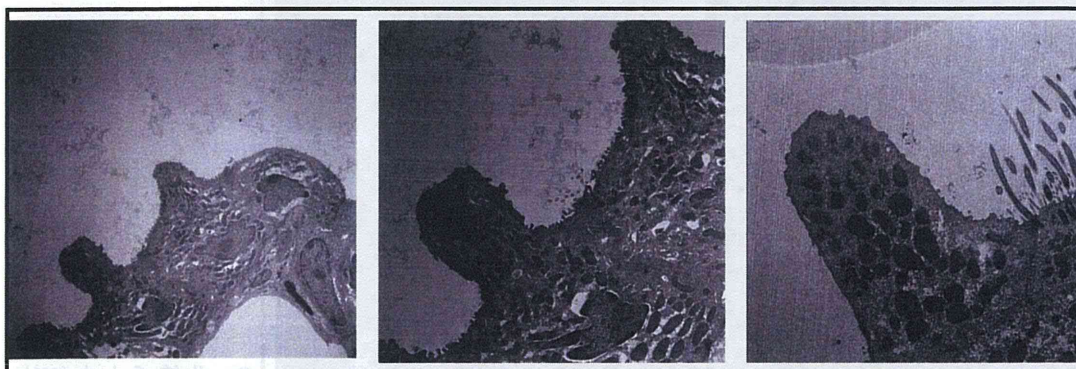


B: 非線毛上皮細胞

図 5 極低濃度キシレン 28 日間暴露試験、0.2 ppm 暴露群 (動物番号:101)

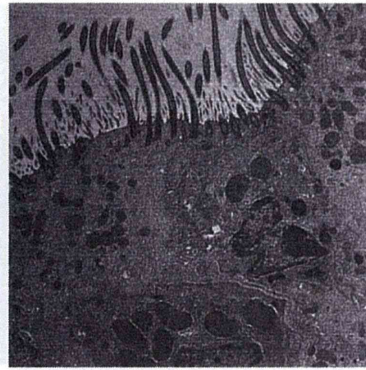
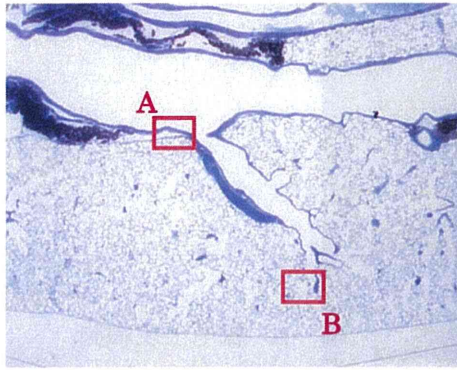


A: 線毛上皮細胞

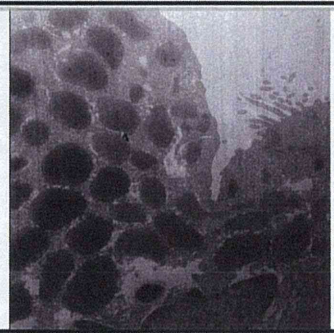
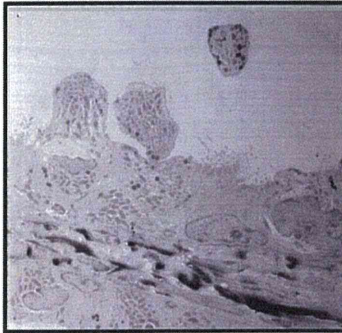


B: 非線毛上皮細胞

図 6 極低濃度キシレン 28 日間暴露試験、0.2 ppm 暴露群 (動物番号:104)

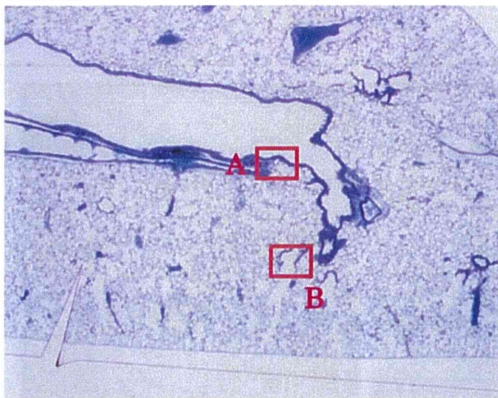


A: 線毛上皮細胞

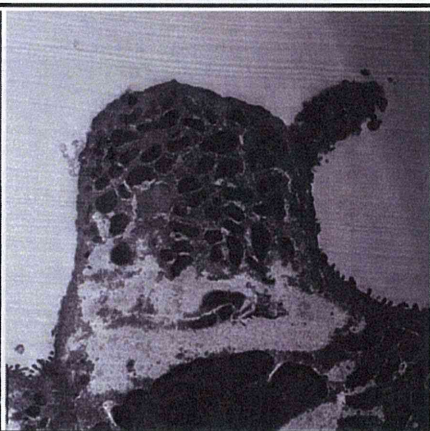
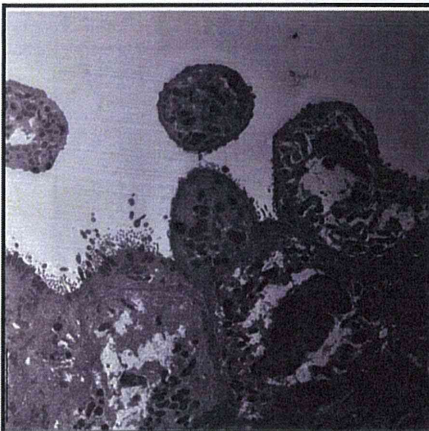


B: 非線毛上皮細胞

図7 極低濃度キシレン28日間暴露試験、0.7 ppm 暴露群(動物番号:201)



A: 線毛上皮細胞



B: 非線毛上皮細胞

図8 極低濃度キシレン28日間暴露試験、0.7 ppm 暴露群(動物番号:202)