

201329001B

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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 26(2014)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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 26(2014)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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書 (別添 3)

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

資料：委託研究報告書及び平成 23 年度～25 年度分担研究報告書

1. 委託研究報告書：マウスを用いた極低濃度暴露実験 13

2. 委託研究報告書：遺伝子発現誘導に基づく化学物質分類技術及び同期発現
遺伝子抽出技術の高精度化に関する業務コンサルティング 204

3. 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 275

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 直人 309

5. 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 317

6. 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 334

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 4) 374

III. 研究成果の刊行物・別刷 (別添 5) 376

別添 3

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）

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-

平成 23 年度～25 年度 総合研究報告書

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、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）を人へ外挿することは困難である。この問題に対し、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）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。先行研究にて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、本研究では 28 日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、多臓器連関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。

本研究の成果として、1) ホルムアルデヒド（平成 23 年度実施、指針値：0.08 ppm）、キシレン（平成 24 年度実施、指針値：0.2 ppm）及びパラジクロロベンゼン（平成 25 年度実施、指針値：0.04 ppm）について、目標通りに極低濃度下（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3、1.0 ppm、キシレン：0、0.2、0.7、2.0 ppm、パラジクロロベンゼン：0、0.04、0.12、0.4 ppm）での 6 時間/日×7 日間、22 時間/日×7 日間、及び 22 時間/日×28 日間マウス反復吸入暴露実験を実施し（北嶋）、2) 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）。その結果、22 時間×7 日間反復暴露の海馬において、化学構造の異なる 3 物質に共通して、生活暴露モデルである 22 時間/日×7 日間反復暴露の

際、海馬において暴露期間中、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, Cyr61, Ier2 及び Klf2 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。また暴露休止後遅くとも 24 時間後には、逆に神経活動の活性化を示唆するリバウンド現象が認められた。6 時間×7 日間反復暴露の場合は、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 時間目では毎日のリバウンド現象を示唆する所見を得た。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を検討するため、3 物質の連関性を解析した結果、6 時間/日×7 日間反復暴露時の肺及び肝におけるインターロイキン 1 β 遺伝子の発現増加が 3 物質に共通して認められ、この分子が共通因子の候補と考えられた。また、解析の精度向上と効率化のために、(株) NTT データにマイクロアレイデータ補正技術 (MLANG、すなわちマイクロアレイの測定値をプローブ毎に補正し、より高精度の定量測定を行う技術) 開発に関する共同委託研究を実施した。3) 並行して、22 時間/日×28 日間反復暴露時の肺の透過型電子顕微鏡による形態解析を検討した結果、ホルムアルデヒド暴露時の肺では形態学的変化は認められなかった。キシレン暴露時の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を認めた。パラジクロロベンゼンにつき解析を進めており、肺において酸化的ストレス関連遺伝子の発現変動が認められることから、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する (大西)。4) 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、ホルムアルデヒドを含むシックハウス症候群関連物質との複合効果 (IL-8 遺伝子の発現増強) の分子機序の一端が明らかとなった。またホルムアルデヒド以外のシックハウス症候群関連の 4 物質について同様の検討を行い、クロルピリホスにも、ホルムアルデヒドと同様の IL-8 産生増強効果が認められる事を見いだした (慶長)。この事はこの *in vitro* 解析系が、人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重要な知見と考える。また、海馬に対する二次シグナル候補であるインターロイキン 1 β は、IL-8 に比較し弱いながら、本解析系において産生増加傾向が示されており、今後の IEG との関連解析が期待された。

以上のごとく、シックハウスの極低濃度の化学物質の吸入暴露に於いても、脳サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により、中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。特に、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、本研究の目的の一つ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。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。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さ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 公益財団法人 結核予防会
結核研究所 生体防御部
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、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、従来の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）を人へ外挿することは困難である。この問題に対し、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）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的絞り込みを行う。

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、比較的長期の暴露の際には観測可能となる事が期待される。短い（1～7 日間）暴露により発現が誘導された遺伝子と、比較的長期の暴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

先行研究にて、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、本研究では 28 日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、多臓器連関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。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暴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）、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）である。

ホルムアルデヒド（平成 23 年度実施、

指針値：0.08 ppm)、キシレン（平成24年度実施、指針値：0.2 ppm）及びパラジクロロベンゼン（平成25年度実施、指針値：0.04 ppm）について、室内濃度指針値を考慮した室内濃度指針値を考慮した極低濃度下でマウスに吸入暴露し検討した。以下に実験方法の概要を示す。

シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露実験：12週齢の雄性C57BL/6Jマウス（日本チャールスリバー）を対象とした吸入暴露試験（4用量、16群構成、各群3匹）を、先行研究での暴露条件である6時間/日×7日間反復暴露（＝労働暴露モデル）、及び22時間/日×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。ホルムアルデヒド（formaldehyde；分子量：30.03、Cas No.：50-00-0）は先行研究と同じ、ホルムアルデヒド液（ホルムアルデヒド濃度37.3% [メタノール7.4%含有、ギ酸含量0.04%以下]、和光純薬工業）を、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-、m-、p-体、及び、構造異性体であるエチルベンゼンの混合からなるキシレン（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。これは、特定の位置異性体のみを必要量用意することが困難であることと、実際のヒト暴露を想定すると市販の混合キシレンによる実験が不適切ではないとの判断による。o-、m-、p-体及び、エチルベンゼンの含有量（絶対純度%）について分析した結果は、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。パラジクロロベンゼン（paradichlorobenzene；分子量147.0、CAS No. 106-46-7）も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）。ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ホルムアル

デヒド及びキシレンはバブリングし気化させる方法、パラジクロロベンゼンは加熱昇華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C57BL/6Jマウス（12週齢）に吸入暴露（6時間/日×7日間反復暴露 [6、22、70、166時間後に観測]と22時間/日×7日間反復暴露 [22、70、166、190時間後に観測]）（4用量、16群構成、各群3匹）させ、得られたマウスの海馬、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C57BL/6Jマウス（暴露開始時8週齢、日本チャールスリバー）を対象とした28日間の反復全身吸入暴露実験（22時間/日×7日間反復）（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）から肺胞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幅の肺の全切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1μm）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ミクロームで厚さ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 (5×10⁵ cells/flask)、90% confluent で Poly I:C (10 μg/ml) 存在下、24 時間後にホルムアルデヒド (10 μM) あるいは、シックハウス症候群関連 13 物質の内 4 物質、すなわちクロルピリホス (2.85, 28.5, 285 μM)、トルエン (10, 100, 1,000 μM)、アセトアルデヒド (50, 500, 5,000 μM) 及び キシレン (10, 100, 1,000 μM) (溶媒: エタノール) を選択し、各物質を添加 3 時間後に細胞を回収し、IL8 の mRNA 発現レベルを TaqMan Gene Expression Assay (Hs00174103_m1) を用い定量的 RT/PCR で測定し、また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) :

ホルムアルデヒド (平成 23 年度実施、指針値: 0.08 ppm)、キシレン (平成 24 年度実施、指針値: 0.2 ppm) 及びパラジクロロベンゼン (平成 25 年度実施、指針値: 0.04 ppm) について、室内濃度指針値を考慮し目標通りに極低濃度下 (ホルムアルデヒド: 0、0.1、0.3、1.0 ppm、キシレン: 0、0.2、0.7、2.0 ppm、及びパラジクロロベンゼン: 0、0.04、0.12、0.4 ppm) での肺の形態観察の為の 22 時間/日×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×7 日間反復と 22 時間/日×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。いずれの吸入暴露実

験の場合も、目標濃度に対し 94~106% 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) :

12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) にホルムアルデヒド (平成 23 年度実施)、キシレン (平成 24 年度実施) 及びパラジクロロベンゼン (平成 25 年度実施) を対象とし極低濃度下 (ホルムアルデヒド: 0、0.1、0.3、1.0 ppm、キシレン: 0、0.2、0.7、2.0 ppm、パラジクロロベンゼン: 0、0.04、0.12、0.4 ppm) での吸入暴露 (4 用量にて、6 時間/日×7 日間反復暴露 [6、22、70、166 時間後に観測] と 22 時間/日×7 日間反復暴露 [22、70、166、190 時間後に観測]) (各群 n=3) を実施し、得られた海馬、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変動解析を実施した。

解析の結果、ホルムアルデヒドの場合、「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、ホルムアルデヒドの生活暴露モデルである 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、Duspl、Nr4a1、Junb、Egr4、Egr2、Cyr61、Ier2、Klf2 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。労働暴露モデルである 6 時間×7 日間反復暴露では、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。加えて、22 時間/日×7 日間反復暴露時に、膜電位の過分極 (=神経伝達の抑制) を示唆する K⁺チャネル関連遺伝子の発現増加が認められた。一方「肝」において有害性を示唆するシグナルとして、概日リズム関連遺伝子が見いだされた。具体的には 22 時間/日×7 日間反復暴露により、Cry1、Clock、Arnt1 及び Npas2 遺伝子の発現増加が認められた。また暴露休止 24 時間

後である投与 190 時間後でも、高用量で発現増加傾向が認められた。「肺」では 22 時間/日×7 日間反復暴露により、IEG の顕著な発現減少とそれに続く暴露休止 24 時間後での発現増加が認められたが、海馬で認められた IEG の全てではなくその一部(Dusp1、Nr4a1、Cyr61、Klf2 遺伝子)であった。

キシレンの場合、「海馬」において有害性を示唆するシグナルとして、ホルムアルデヒドの場合と同じく、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、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 IEG 遺伝子群、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Egr2、Cyr61、Ier2、Klf2 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。6 時間×7 日間反復暴露では、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。この所見はホルムアルデヒドの場合と同じであった。一方「肝」では、酸化的ストレス、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の変動は認められなかった。「肺」において有害性を示唆するシグナルとして、22 時間/日×7 日間反復暴露の際に酸化的ストレス関連遺伝子が見いだされた。また 22 時間/日×7 日間反復暴露により、IEG の顕著な発現減少とそれに続く暴露休止 24 時間後での発現増加が認められたが、海馬で認められた IEG の全てではなくその一部 (Dusp1、Nr4a1、Cyr61、Klf2 遺伝子) であった。この所見はホルムアルデヒドの場合と同じであった。

パラジクロロベンゼンの場合、「海馬」において有害性を示唆するシグナルとして、ホルムアルデヒド及びキシレンの場合と同じく、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 (Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Egr2、Cyr61、Ier2、Klf2 遺伝子等) の顕著な発現減少が指針値レベルの濃度でも認められた。

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られる場合が多く、また 6 時間×7 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及びキシレン吸入暴露の場合と同じであった。一方「肝」では、酸化的ストレス、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の変動は認められなかった。「肺」において有害性を示唆するシグナルとして、22 時間/日×7 日間反復暴露の際に酸化的ストレス関連遺伝子が見いだされた。また 22 時間/日×7 日間反復暴露により、IEG の顕著な発現減少とそれに続く暴露休止 24 時間後での発現増加が認められたが、海馬で認められた IEG の全てではなく一部 (Dusp1、Nr4a1、Cyr61、Klf2 遺伝子) で認められ、これはホルムアルデヒド及びキシレンの場合と同じであった。

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 物質につき肝・肺の連関解析を実施した。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 (Il1b) 遺伝子の発現増加が 3 物質に共通して認められ、この分子が共通因子の候補と考える。尚、Il1b 遺伝子は、IEG 遺伝子群の上流遺伝子を既存文献データ (Ingenuity Pathway Analysis) に対し検索した際に高確率でリストアップされた。

加えて、解析の精度向上と効率化のために、(株) NTT データにマイクロアレイデータ補正技術 (MLANG、すなわちマイクロアレイの測定値をプローブ毎に補正し、より高精度の定量測定を行う技術) 開発に関する共同委託研究を実施した (平成 23 年度)。

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

ホルムアルデヒド (平成 23 年度実施、指針値: 0.08 ppm)、キシレン (平成 24 年度実施、指針値: 0.2 ppm) 及びパラジクロロベンゼン (平成 25 年度実施、指針値: 0.04 ppm) を対象とし、極低濃度下 (ホルムアルデヒ

ド： 0、0.1、0.3、1.0 ppm、キシレン： 0、0.2、0.7、2.0 ppm、及びパラジクロロベンゼン： 0、0.04、0.12、0.4 ppm)、22時間/日×28日間反復吸入暴露時の肺について、透過型電子顕微鏡(TEM)による超微形態学的検索を実施した。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た。ホルムアルデヒド暴露時の肺サンプルについて検索した結果、形態学的変化は認められなかった。キシレン暴露肺において、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。パラジクロロベンゼンについては、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実施中であり、肺において酸化的ストレス関連遺伝子の発現変動が認められることから、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する。

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

平成23年度は、最も正常の気道細胞に近いとさ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の機序に迫るため、各種リン酸化酵素阻害剤を用いて検討した。その結果、polyI:C(10 µg/ml)存在下で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、IL-8 mRNA発現量が有意に増強する過程にJNK分子が関与(JNKのリン酸化を亢進)することを見いだした。平成24年度は両者の複合効果についてさらに、分泌される多数の生理活性因子の同時定量を、蛍光マイクロビーズアレイ(Bio-Plex サスペンションアレイ)システムを用い、27種類のサイトカインを選択し行なった。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おらず、ELISA系での確認や、翻訳後修飾や分解への効果なども今後、加味して検討していく必要があるものと思われた。平成25年度は、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、ホルムアルデヒド以外のシックハウス症候群関連の4物質(クロルピリホス、トルエン、アセトアルデヒド及びキシレン)について同様の検討を行った。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。I11bは、IL-8に比して弱いながら発現誘導を示唆するデータが得られ、IEG上流因子の可能性について、ヒト細胞での検討が期待された。

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、ホルムアルデヒド(平成23年度実施、指針値：0.08 ppm)、キシレン(平成24年度実施、指針値：0.2 ppm)及びパラジクロロベンゼン(平成25年度実施、指針値：0.04 ppm)について、12週齢の雄性マウスに、室内濃度指針値を考慮し目標通りに極低濃度下(ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3、1.0 ppm、キシレン：0、0.2、0.7、2.0 ppm、及びパラジクロロベンゼン：0、0.04、0.12、0.4 ppm)での吸入暴露(4用量にて、肺の形態観察の為の22時間/日×28日間反復暴露、及びトキシコゲノミクスの為の6時間/日×7日間反復暴露と22時間/日×7日間反復暴露)(各群n=3)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、海馬において有害性を示唆するシグナルとして、ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼンに共通して、初期応答遺伝子関連シグナル(IEG遺伝子群)の抑制およびリバウンド現象が見いだされ、連続暴露期間

中は、神経活動が抑制され、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。6時間×7日間反復暴露の所見からは、IEGの遺伝子の発現抑制は少なくとも6時間以上の暴露で誘発され、16時間以上の休止でリバウンドが生じ、かつ反復による影響が次の日に残留しない可能性が示された。

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物質に共通して海馬におけるIEGの発現減少が認められ、海馬における神経活動の抑制が示唆された。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。

また、いずれのIEGの遺伝子も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、Pol IIに結合する4つのサブユニット(NELF-A, NELF-B, NELF-C/D and 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、あるいは異なる機構が存在すること、が考えられた。

この3物質に共通して認められた海馬におけるIEGの抑制分子機序として、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。3物質についての肝・肺の連関解析

の結果、その条件を満たすものとしてインターロイキン1 β (I11b)遺伝子が同定された。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であることが支持される。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。

しかし、6時間/日×7日間反復実験では、I11bが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残る。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確定を進める計画である。

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では、平成23年度に実施したホルムアルデヒドの場合は、形態学的変化は認められなかったが、平成24年度に実施したキシレン暴露時の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。この影響がキシレン暴露による可能性が示唆されたが、現時点では、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ための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いるため、結論を得るにはさらに検討を要するものとする。平成25年度実施したパラジクロロベンゼン暴露時の肺については解析を実施中であり、肺において酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が認められることから、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する。

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、この過程に JNK 分子が関与 (JNK のリン酸化を亢進) することを見いだし、またホルムアルデヒド以外のシックハウス関連の 4 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 産生増強効果が認められる事を見いだした。この事は、この *in vitro* 実験系が、人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重要な知見と考える。また、I11b は、IL-8 に比して弱いながら発現誘導を示唆するデータが得られ、IEG 上流因子の可能性について、ヒト細胞での検討が期待された。

E. 結論

以上のごとく、シックハウスレベルの極低濃度暴露により、極低濃度の化学物質の吸入暴露に於いても、脳サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により、その中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。特にホルムアルデヒド、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示唆された、海馬における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考ええる。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 (I11b) 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残った。今後、単回暴露時の海馬、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考ええる。また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、今後、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予定である。

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を検討した結果、ホルムアルデヒド暴露時の肺では形態学的変化は認められなかったが、キシレン暴露時の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を認めた。パラジクロロベンゼンにつき解析を実施中であり、肺において酸化的ストレス関連遺伝子の発現変動が認められることから、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がクロルピリホスでも認められた事は、この系が人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重要な知見と考える。

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

1-1) 書籍等

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Kodama Y, Sekita K, Takagi A, Kitajima S. Chapter11 Application of Percellome

Toxicogenomics to Food Safety Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food, 2011, 184-198. Editor(s): Ingemar Pongratz, Linda Bergander, Royal Society of Chemistry.

ISBN:978-1-84973-297-0, DOI:10.1039/9781849732970-00184

Aisaki K, Kanno J.

15 STANDARDIZATION OF GENE-EXPRESSION INFORMATION FOR THE SAFETY EVALUATION: ACTIVITIES IN JAPAN

Applications of Toxicogenomics in Safety Evaluation and Risk Assessment, 2011 323-329

Darrell R. Boverhof (Editor), B. Bhaskar Gollapudi (Editor), John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-44982-0

1-2) 学術雑誌

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.

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.

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.

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. *Inhal Toxicol* 25: 298-306, 2013.

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. 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.

Swedenborg E, Kotka M, Seifert M, Kanno J, Pongratz I, Rüegg J. 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, 2012.

Hang NT, Lien LT, Kobayashi N, Shimbo T, Sakurada S, Thuong PH, Hong LT, Tam DB, Hijikata M, Matsushita I, Hung NV, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon-gamma release assay for tuberculosis. *PLoS One* 6 (8): e23806, 2011.

Nagano K, Nishizawa T, Eitaki Y, Ohnishi M, Noguchi T, Arito H, 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*, 53, 234-239, 2011.

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

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, (2013.11.11-14), Yokohama, Japan.

Kanno J, 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）

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）

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、神戸、（2012.4.20-22）

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡
パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、

第34回日本高血圧学会総会 SHR学会合同シンポジウム(2011.10.22)

北嶋 聡、小川幸男、長野嘉介、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、安彦行人、山本雅也、菅野 純、Percellome法によるシックハウス症候群レベルの極低濃度曝露下での吸入トキシコゲノミクス、第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.12)

菅野 純
Percellome 解析：時間軸と用量軸の融合と絶対値による解析精度の向上、第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.12)

菅野 純
Percellome Toxicogenomics Projectの進捗とChemical Biologyとしての毒性学、JSBi応用システムバイオロジー研究会第3回応用システムバイオロジー研究会（2011.6.27）

Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Keicho N. Enhanced inflammatory response to formaldehyde in human bronchial epithelial cells. In: European Respiratory Society Annual Congress 2011, September 24 - 28, Amsterdam, Netherlands, 2011.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

菅野 純（研究分担者）：
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

委託研究報告書

I. ホルムアルデヒドのマウスを用いた極低濃度暴露試験

報告書

(6時間/日、7日間暴露)

試験番号：0778

CAS No. 50-00-0

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

要約

化学物質の極低濃度暴露による生体影響検出の技術開発を目的として、生活環境中の濃度に即した極低濃度のホルムアルデヒドを C57BL/6J 雄マウスに 6 時間/日、7 日間全身暴露（経気道投与）し、遺伝子発現解析用の肝、肺及び脳の組織を採取した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群 12 匹、合計 48 匹のマウスを用いた。暴露濃度は、0.1、0.3 及び 1 ppm とした。対照群は清浄空気による換気のみとした。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により測定した。1 回目暴露終了時、並びに暴露開始後 1 日目、3 日目及び 7 日目に各群 3 匹の動物を解剖し、肝、肺及び脳から遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルを採取するとともに、病理組織学的検査用サンプルを採取した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標暴露濃度 0.1、0.3 及び 1 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ 0.102 ± 0.005 ppm (0.098 ppm～0.112 ppm)、 0.308 ± 0.024 ppm (0.266 ppm～0.344 ppm) 及び 1.060 ± 0.061 ppm (1.007 ppm～1.173 ppm)であった。

剖検と病理組織学的検査では、全動物とも肝、肺及び脳に特記すべき所見を認めなかった。

遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルは試験委託者に送付した。

I 試験材料

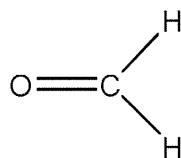
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称： ホルムアルデヒド
別 名： メタナール、オキシメタン
CAS No.： 50-00-0

I-1-2 構造式及び分子量

構造式：



分子量： 30.03

I-1-3 物理化学的性状等

性 状： 刺激臭のある無色液体
沸 点： -19.2℃
蒸 気 圧： 1.33kPa (10mmHg) (-88℃)
比 重： 0.815

I-2 使用ホルムアルデヒド発生用原液

名 称： ホルムアルデヒド液
製 造 元： 和光純薬工業株式会社
カタログ番号： 064-00406
ロット番号： DCR2374
純 度： 37.3% (メタノールを7.4%含有)

* 詳細は別紙 - 1参照

I-3 被験物質の特性

使用した被験物質の特性は、GC/MS (Agilent Technologies 社製 Agilent Technologies 5973N) を用いて定性した。その結果、ホルムアルデヒドに相当する分子イオンピーク及びフラグメントピーク (文献 1) を確認した (図 1)。

I-4 試験動物

日本チャールス・リバー (株) 筑波飼育センター (茨城県新治郡八郷町大字上林 955) の C57BL/6J マウス (SPF) の雄を使用した。