

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.

5. 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.

6. 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. 慶長直人, 松下育美, 土方美奈子. MAC 症のヒト遺伝子研究. 第 86 回 日本結核病学会総会, 6 月 2-3 日, 2011.

2. 田中崇裕, 櫻田紳策, 加納圭子, 鏑木康志, 小林信之, 慶長直人. 結核患者における血漿ペプチドーム解析によるバイオマーカー探索. 第 34 回日本分子生物学会年会, 12 月 13-16 日, 横浜, 2011.

3. 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.

4. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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-
平成23年度～25年度 総合研究報告書
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）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、器質的変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。

本分担研究では第二の目的に向け、6 時間/日×7 日間反復暴露及び 22 時間/日×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。

本研究の成果として、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 日間及び 22 時間/日×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結果、これらの化学構造の異なる 3 物質に共通して、生活暴露モデルである 22 時間/日×7 日間反復暴露の際の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。この抑制所見は、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。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1β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。今後、より短い2時間単回暴露時の海馬、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・肝の関与の解明が進むものとする。

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。

以上のごとく、シックハウスレベルの極低濃度の化学物質の吸入暴露に於いて、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。

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、器質的変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 Percollome 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×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。平成23年度はホルムアルデヒド(指針値: 0.08 ppm)、平成24年度

はキシレン(指針値: 0.2 ppm)及び平成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で一晩浸漬し、RNase を不活化する。肝は 5mm 径の生検トレビンにより 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、ピオチン化 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

ホルムアルデヒド（平成 23 年度実施）（formaldehyde；分子量：30.03、Cas No.：50-00-0）、キシレン（平成 24 年度実施）（xylene；分子量：106.2、CAS No. 1330-20-7）及びパラジクロロベンゼン（平成 25 年度実施）（paradichlorobenzene；分子量 147.0、CAS No. 106-46-7）についてデータ解析を進めた。試薬として、ホルムアルデヒドは先行研究と同じく、ホルムアルデヒド液（カタログ番号：064-00406、特級、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）を使用した。キシレン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）。

12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）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、我々が開発したソフトウェア「RSort」を用いて、網羅的に解析した。これは、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 3 軸とした 3 次元グラフ（下記図 1 参照）の面の凹凸を評価し、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。尚、RSort による自動抽出は網羅性を確保する観点から有意な変化を見落とさない設定（偽陰性回避）にて運用していることから、若干のノイズデータを拾うため、目視による確認、すなわち 3 次元グラフの目視により生物学に有意と判断される変化が示唆されたものを抽出する作業、を実施している。通常、45,000 のデータから 1,000～数千のデータ程度まで自動的に RSort が抽出することから、その後の目視による確認作業は格段に迅速化されている。現在、RSort の性能向上を図っており、今後さらに迅速化が進む予定である。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、各被験物質について、海馬、肝及び肺における解析結果の概要を記載する。

C-1：ホルムアルデヒド極低濃度反復吸入暴露時の遺伝子発現変動解析（平成 23 年度）：

C-1-1：6 時間/日×7 日間反復暴露時の遺伝子発現変動解析

「海馬」では、測定した 45,000ps のうち、

発現が有意に増加する 1,236 ps が RSort により自動的に得られ（以下、有意に増加あるいは減少）、このうち 3 次元グラフ等の目視による確認により生物学に有意と判断される変化が示唆されたもの（以下、目視確認）が 190 ps を抽出した。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。他方、発現が有意に減少するものとして 5,152 ps、このうち目視確認により 115 ps を抽出した。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（22 時間/日×7 日間暴露時の解析参照）。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。

「肝」では、発現が有意に増加するものとして 1,184 ps、このうち目視確認により 57 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 1,886 ps、このうち目視確認により 25 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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。

「肺」では、発現が有意に増加するものとして 950 ps、このうち目視確認により 68 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 1,648 ps、このうち目視確認により 58 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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-1-2: 22 時間/日×7 日間反復暴露時の遺伝子発現変動解析

「海馬」では、発現が有意に増加するものとして 6,099 ps、このうち目視確認により 346 ps を抽出した。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。他方、発現が有意に減少するものとして 1,127 ps、このうち目視確認により 28 ps を抽出した。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として、K⁺チャネル関

連遺伝子の発現増加が認められ、また神経活動の指標となる前初期遺伝子（Immediate early gene: IEG）の顕著な発現減少が、それぞれ経時的に同様な発現パターンを示しながら低用量群、すなわち指針値レベルの濃度でも認められた。具体的には、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。このことから、ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間]の極低濃度経気道暴露により、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ことが示唆された。一方、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。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。

「肝」では、発現が有意に増加するものとして 572 ps、このうち目視確認により 92 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 3,179 ps、このうち目視確認により 44 ps を抽出した。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として、概日リズム関連遺伝子の発現増加が認められ、この結果は IPA による検索でも”Circadian Rhythm Signaling”として抽出されてきた。具体的には Cry1、Clock、Arntl 及び Npas2 遺伝子の発現増加（投与 70 時間後、高用量）が認められた。したがって、ホルムアルデヒドの 22 時間/日×7 日間反復暴露により、肝における概日リズムが乱れ、その結果、肝機能に影響が現れる可能性が示唆された。

「肺」では、発現が有意に増加するものとして 1,586 ps、このうち目視確認により 87 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 2,066 ps、このうち目視確認により 23 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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。有害事象との関連は不明だ

が、海馬において発現変動を示した 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、Klf2 遺伝子) であった。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: キシレン極低濃度反復吸入暴露時の遺伝子発現変動解析 (平成 24 年度):

C-2-1: 6 時間/日×7 日間反復暴露時の遺伝子発現変動解析

「海馬」では、発現が有意に増加するものとして 1,064 ps、このうち目視確認により 214 ps を抽出した。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。他方、発現が有意に減少するものとして 6,336 ps、このうち目視確認により 36 ps を抽出した。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として、平成 23 年度検討したホルムアルデヒドの場合と同様に、IEG 遺伝子群が見いだされた (22 時間/日×7 日間暴露時の解析参照)。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。

「肝」では、発現が有意に増加するものとして 2,276 ps、このうち目視確認により 209 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 503 ps、このうち目視確認により 10 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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。

「肺」では、発現が有意に増加するものとして 160 ps、このうち目視確認により 31 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 3,024 ps、このうち目視確認により 49 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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-2-2: 22 時間/日×7 日間反復暴露時の

遺伝子発現変動解析

「海馬」では、発現が有意に増加するものとして 3,256 ps、このうち目視確認により 122 ps を抽出した。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。他方、発現が有意に減少するものとして 788 ps、このうち目視確認により 36 ps を抽出した。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として、ホルムアルデヒド吸入暴露の場合と同様に、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、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、ホルムアルデヒドの場合と同様にキシレン[22 時間/日×7 日間]の極低濃度経気道暴露により、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ことが示唆された。一方、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、これもホルムアルデヒドの場合と同様であった。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。

「肝」では、発現が有意に増加するものとして 3,977 ps、このうち目視確認により 144 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 629 ps、このうち目視確認により 42 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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。

「肺」では、発現が有意に増加するものとして 3,343 ps、このうち目視確認により 624 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 586 ps、このうち目視確認により 10 ps を抽出した。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、酸化的ストレス、グルタチオン

関連遺伝子の発現増加が認められた。具体的には Gsta1、Gsta3、Gsta4、Gstol、Gpx2 及び Prdx4 遺伝子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、キシレン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。加えて、有害事象との関連は不明だが、海馬において発現変動を示した 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 (Duspl、Nr4a1、Klf2 遺伝子) であり、これもホルムアルデヒドの場合と同様であった。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-3: パラジクロロベンゼン極低濃度反復吸入暴露時の遺伝子発現変動解析 (平成 25 年度):

C-3-1: 6 時間/日×7 日間反復暴露時の遺伝子発現変動解析

「海馬」では、発現が有意に増加するものとして 1,963 ps、このうち目視確認により 99 ps。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。他方、発現が有意に減少するものとして 3,174 ps、このうち目視確認により 18 ps を抽出した。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として、平成 23 年度検討したホルムアルデヒド及び平成 24 年度検討したキシレンの場合と同様に、IEG 遺伝子群が見いだされた(22 時間/日×7 日間暴露時の解析参照)。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。

「肝」では、発現が有意に増加するものとして 1,940 ps、このうち目視確認により 51 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少

するものとして 1,571 ps、このうち目視確認により 28 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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。

「肺」では、発現が有意に増加するものとして 1,802 ps、このうち目視確認により 36 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 1,246 ps、このうち目視確認により 14 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに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-3-2: 22 時間/日×7 日間反復暴露時の遺伝子発現変動解析

「海馬」では、発現が有意に増加するものとして 2,031 ps、このうち目視確認により 126 ps を抽出した。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。他方、発現が有意に減少するものとして 620 ps、このうち目視確認により 14 ps を抽出した。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、Duspl、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。

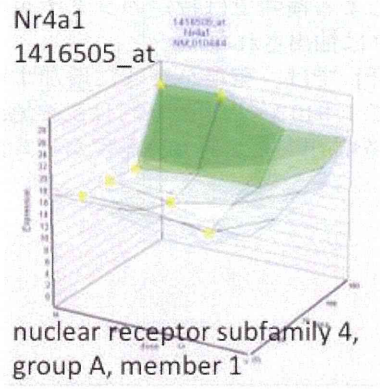
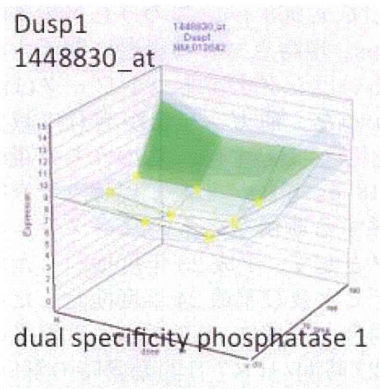
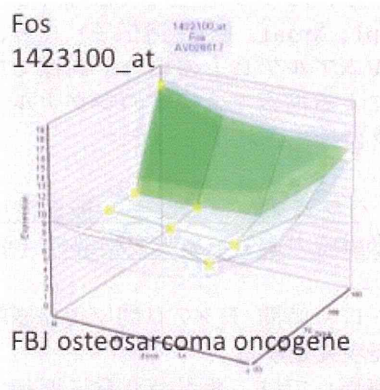
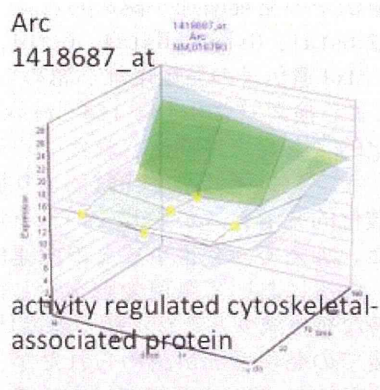


図1 パラジクロロベンゼン[22時間/日×7日間]反復暴露時の「海馬」における前初期遺伝子(Immediate early gene: IEG)である Arc、Fos、Dusp1 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動

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。

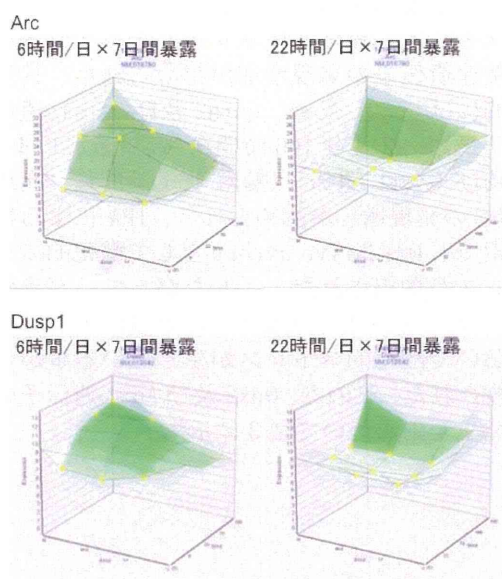


図2 「海馬」における初期応答遺伝子(Immediate early gene: IEG)である Arc (上段) 及び Dusp1 遺伝子(下段)のパラジクロロベンゼン[6時間/日×7日間]反復暴露の場合(左)、及び[22時間/日×7日間]反復暴露の場合(右)の発現変動の比較

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。

「肝」では、発現が有意に増加するものとして 1,647 ps、このうち目視確認により 240 ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 1,135 ps、このうち目視確認により 41 ps を抽出した。増加分及び減少分ともに現時点で有害影響に関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。

「肺」では、発現が有意に増加するものとして 897 ps、このうち目視確認により 26ps を抽出した。他方、発現が有意に減少するものとして 1,232 ps、このうち目視確認により 48 ps を抽出した。有害影響に関

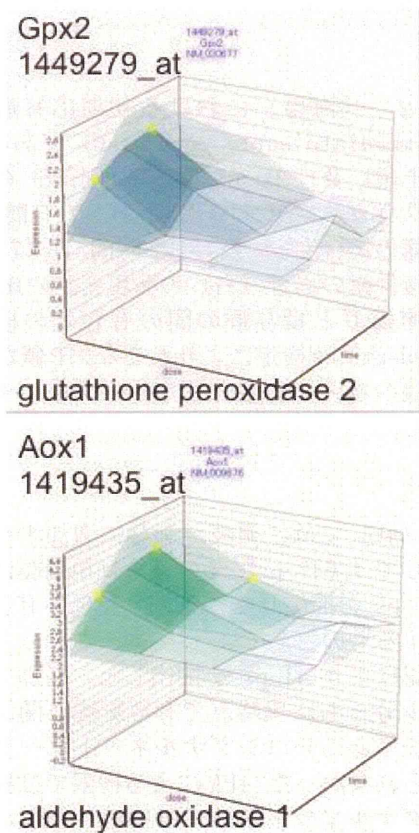
係する遺伝子あるいはシグナルネットワークとして、酸化ストレス、グルタチオン関連遺伝子の発現増加が認められた。具体的には Gpx2、Aox1、Gsta2 及び Gsta1 遺伝子(暴露 22 及び 166 時間後、高用量)、Prdx1 及び Gstm1 遺伝子(暴露 166 時間後、高用量)の発現増加が認められた。IPA による検索でも Oxidative stress として酸化ストレスが抽出された。したがって、パラジクロロベンゼンの極低濃度暴露により肺において酸化ストレスが生じている事が示唆された。この内、Gpx2 及び Aox1 遺伝子の発現変動について図 3 に示す。

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。

加えて、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。これもホルムアルデヒド及びキシレンの場合と同様であった。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 4 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。



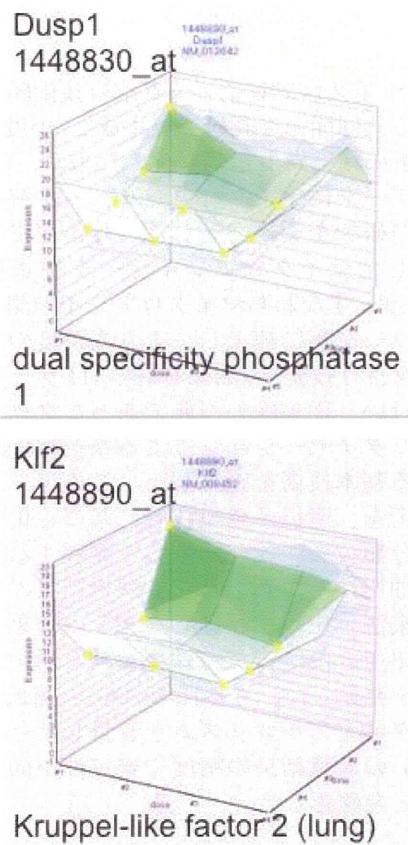


図4 パラジクロロベンゼン[22時間/日×7日間]反復暴露時の「肺」における IEG である Dusp1 (上段) 及び Klf2 遺伝子 (下段) の発現変動

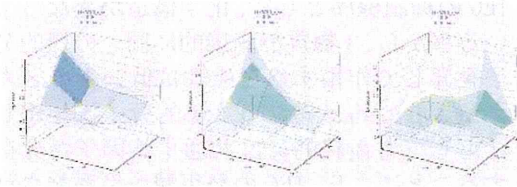
C-4: IEG の抑制機序解明に向けた 3 物質についての海馬・肝・肺の連関解析:

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考ええる。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、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た。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た。

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

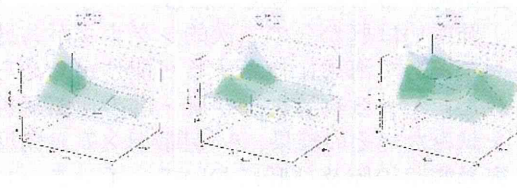


図5 3物質の[6時間/日×7日間]反復暴露時の肺(A)及び肝(B)におけるinterleukin 1 beta (I11b)遺伝子の発現変動

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

解明できるものと考える。

C-5: マイクロアレイデータ解析技術開発に関する共同開発委託研究(平成23年度):

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解析技術開発研究を業務委託した。昨年度までに開発した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)の開発を(株)NTT データと共に行い、従来除去不能であったクロスハイブリダイゼーションによる系統誤差を補正する基本技術を確立した。このデータ補正技術を、遺伝子発現誘導に基づく化学物質の分類技術、及び同期して発現する遺伝子の抽出技術に適用して、解析結果の精度を従来法と比較、評価した。その結果、従来抽出できなかった特殊な挙動を示す遺伝子群を発見した。さらに MLANG の補正パラメータ設定アルゴリズムを改良したところ、MLANG の計算結果の精度や安定性が向上することを確認した。

D. 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。

海馬において、この3物質に共通して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。

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1β (I11b)遺伝子が挙げられた。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, Duspl, 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、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。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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1-1) 書籍等

K. Aisaki and J. Kanno

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

J. Kanno, K. Aisaki, K. Igarashi, N. Nakatsu, Y. Kodama, K. Sekita, A. Takagi and S. Kitajima

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

菅野純：高濃度にジアシルグリセロールを
含む食品（エコナ）の毒性学的な考え方
について
臨床栄養, 118 (2), 177-183 (2011)

菅野純：Percellome トキシコゲノミクスの
進捗
医学のあゆみ, 236 (12), 1125-1126 (2011)

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.

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.

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.;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.

Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima,
Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Yuhji
Taqahashi, Noriko Moriyama, Eriko Ikeno,
Nae Matsuda, Yumiko Saga, Bruce Blumberg,
and Jun Kanno, 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.

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama
A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He
HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F,
Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S.,
GlcNAcylation of histone H2B facilitates
its monoubiquitination. *Nature*. 2011 Nov
27. doi: 10.1038/nature10656.

Hokari T, Tsuboi I, Harada T, Oshima H,
Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa
S., Mast cell development and
biostresses: different stromal responses
in bone marrow and spleen after treatment
of myeloablater, 5-fluorouracil, and
inflammatory stressor,
lipopolysaccharide., *Biol Pharm Bull*.
2011;34(10):1533-41.

Fujimoto N, Kitamura S, Kanno J.,
Androgen dependent transcription of a
mouse prostatic protein gene, PSP94:
Involvement of estrogen receptors., *J
Steroid Biochem Mol Biol*. 2011
Nov;127(3-5):301-6.

Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K,
Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo
K, Sato N., Genistein promotes DNA
demethylation of the steroidogenic
factor 1 (SF-1) promoter in endometrial

stromal cells., *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 26;412(2):366-72.

Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S., PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B., *Nat Cell Biol.* 2011 Jun;13(6):668-75.

Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno
Yoshida T, Sekine T, Aisaki K, Mikami T, Kanno J, Okayasu I., CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid., *J Gastroenterol.* 2011 Mar;46(3):339-49.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus., *Biol Reprod.* 2011 Apr;84(4):734-42.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Tsuda H, Sakamoto Y, Ogata A, Nakae D, Hino O, Kanno J., [Importance of researches on chronic effects by manufactured nanomaterials]., *Yakugaku Zasshi.* 2011 Feb;131(2):195-201. Review. Japanese.

Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T, Suzuki T, Narita M., Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment., *Hippocampus.* 2011 Feb;21(2):127-32. doi: 10.1002/hipo.20775.

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

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

菅野 純, 相崎健一, 北嶋 聡、パーセルローム (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) (宇都宮)、口演

菅野 純, 高木篤也, 西村哲治, 広瀬明彦、Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Nanomaterials、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.4, 名古屋、口演

菅野 純、化学物質の発がん性のリスク評価について、第70回日本癌学会学術総会 特別企画 市民公開講座「放射線発がん化学発がんー原発事故から学ぶこと」、愛知県がんセンター国際医学交流センター、2011.10.1、口演

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics Project and its application to the studies on anticancer agents., 47th Congress of the European Societies of Toxicology, (2011.8.30) (Paris, France), poster

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial Toxicology - Importance of Chronic Toxicity Assessment, Attendance at 5th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, (2011.8.10) (Boston, USA), Oral

相崎健一、五十嵐勝秀、種村健太郎、安彦行人、高橋祐次、高木篤也、北嶋 聡、菅野純、Percellome プロジェクト・オンライン解析システム、第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.13) (横浜)、ポスター

菅野 純、イントロダクション: コリンエステラーゼ阻害物質による遅発性の中枢神経毒性ーサリンの臨床から学ぶ動物モデルの機構解析一、第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.13) (横浜)、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、中枢神経系の発生-発達期における神経活動かく乱による遅発性中枢影響解析ー幼若期雄マウスへのアセフェートによる成熟後の脳高次機能障害について一、第

38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.13) (横浜)、口演

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暴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(2011.7.13) (横浜)、口演

五十嵐勝秀、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純、ヒト型 PXR 生理的発現マウス系の全身臓器トランスクリプトーム解析、第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7.13) (横浜)、口演

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) (横浜)、口演

菅野 純、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、種村健太郎、ヒト型リガンド結合ドメインノックイン PXR マウスの遺伝子発現応答特性、第29回内分泌代謝学サマーセミナー(2011.7.8) (仙台)、ポスター

種村健太郎、五十嵐勝秀、佐藤英明、菅野 純、発生・発達期のビスフェノール A 暴露による遅発中枢影響解析、第29回内分泌代謝学サマーセミナー(2011.7.8) (仙台)、ポスター

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) (福岡)、口演

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its application to studies on anticancer agents., the 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. (2011.3.8) (Washington D.C., USA), poster

F. 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

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—
平成23年度～25年度 総合研究報告書
分担研究報告書

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、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）による高精度解析を行って、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。H23年度は、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）を対象とし、極低濃度下（0、0.1、0.3及び1.0 ppm）、H24年度は、キシレン（指針値：0.2 ppm）を対象とし、極低濃度下（0、0.2、0.7及び2.0 ppm）、H25年度は、パラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）を対象とし、極低濃度下（0、0.04、0.12及び0.40 ppm）それぞれ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）したマウス肺での微細な毒性兆候の把握を研究課題とした。

TEMによる肺の形態学的解析には本分担研究でH24年度前半まで気化性物質の有害性検証と平行して基盤技術確立した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による高精度解析のみならず、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。一方で、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。なお、これら3物質の全身諸臓器に一般的な病理組織学的検索で毒性影響は認められなかった。

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。

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）、キシレン（0、0.2、0.7及び2.0 ppm；指針値:0.2 ppm）及びパラジクロロベンゼン（暴露濃度:0、0.04、0.12、0.40 ppm；指針値:0.04 ppm）をそれぞれマウ

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・北嶋等により実施）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透過型電子顕微鏡（TEM）による詳細検索を行った。

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な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の上記3物質、すなわちホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼンの28日間暴露試験のTEM検索に応用して極低濃度のこれらの3物質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について検討した。