

201428011A

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不定愁訴の分子実態の把握と
情動認知行動影響を包含する新評価体系の確立—

(H26-化学-一般-001)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 27(2015)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不定愁訴の分子実態の把握と
情動認知行動影響を包含する新評価体系の確立-

(H26-化学-一般-001)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 27(2015)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不定愁訴の分子実態の把握と
情動認知行動影響を包含する新評価体系の確立-
(H26-化学-一般-001)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書 (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 ーシックハウス症候群を考慮した不定愁訴の分子実態の把握と 情動認知行動影響を包含する新評価体系の確立ー 北嶋 聡 1
II. 分担研究報告書(別添 4)	
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 聡 11
2. 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 95
3. 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 101
4. 吸入暴露影響の情動認知行動解析と神経科学的物証の収集 種村 健太郎 115
III. 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 5) 129
IV. 研究成果の刊行物・別刷(別添 6) 131

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
平成26年度総括研究報告書

化学物質の経気道暴露による毒性評価の迅速化、定量化、高精度化に関する研究
-シックハウス症候群を考慮した不定愁訴の分子実態の把握と
情動認知行動影響を包含する新評価体系の確立- (H26-化学-一般-001)

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

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群（SHS）の指針濃度をはるかに超える濃度であることから、そこから得た毒性情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。これに対し、先行研究では「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質をその指針値レベルでマウスに反復吸入暴露（7日間）し、病理組織所見が得られない段階での遺伝子発現変動をPercellome トキシコゲノミクス法により測定し、肺、肝において化学物質固有及び共通のプロファイルを網羅的に捕えた。加えて、海馬に対し化学構造の異なる3物質が共通して神経活動抑制を示唆する遺伝子発現変化を誘発したことから、これが人のSHSにおける「不定愁訴」の原因解明の手がかりとなる可能性が示された。

本研究は、反復暴露の結果の検証とその判定根拠の一般化を目指し、SHSレベルでの単回暴露実験を実施し、①同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析し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、②情動認知行動解析と海馬における神経科学的物証の収集による中枢に対する有害性の実証、及び遺伝子発現変動データの中核影響に関する予見性の確認、を目的とする。この際、脳が高感受性期にある子どもの特性に配慮した遅発性影響も検討する。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。

平成26年度（初年度）は、キシレン（指針値：0.2 ppm）及びパラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について目標通りにSHSレベル（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2時間単回吸入暴露を成熟期マウス（11週齢）に実施し（北嶋）、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）。両物質ともに海馬において、神経活動の指標となるImmediate early gene (IEG)の発現の抑制が、暴露2時間直後の時点で指針値レベルの濃度から先行研究での反復暴露（7日間）での場合と同程度に観測され、海馬神経活動の抑制を示唆する所見が再確認された。この抑制は、その2時間後には回復していた。平成27年度は、今年度実施予定であったホルムアルデヒドと共に、アセトアルデヒド等3物質について同様の検討を実施予定である。キシレン（0、2.0 ppm：2.0 ppmは指針値の10倍濃度）について、22時間/日×7日間反復暴露を成熟期マウス（11週齢）に実施し（北嶋）、情動認知行動を3種類の試験により解析（種村）した結果、暴露終了直後に実施した際には空間-連想記憶及び音-連想記憶の有意な低下が認められた。この影響は暴露3日後に実施した際には消失していた。この結果から、低濃度のキシレンの持つ海馬に対する有害性が実証され、かつ、遺伝子発現変動データの予見性が確認されたものと考えられる。今後、幼若期マウスに暴露した際に遅発性影響が残るか否かを検討する予定である。人への外挿性向上を目指したヒト気道上皮細胞を用いた研究では、多種類のサイトカイン産生を測定する実験系を構築し、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相乗効果について、5種類の関連化学物質を検討した結果、各物質の高濃度の適用により同様な傾向が認められ、また高濃度のパラジクロロベンゼンにおいては、I11b 遺伝子の発現増加が認められた（慶長）。以上、ほぼ計画通りに進捗している。

本研究の成果を通して、急増中の新規物質について、SHSレベルの低濃度域での中枢影響を含む有害性を見落としなく検出可能な吸入毒性評価系の構築が期待される。

研究分担者

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

種村健太郎 東北大学大学院 農学研究科
動物生殖科学分野 教授

A. 研究目的

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群（SHS）の指針濃度をはるかに超える濃度であることから、毒性試験から得た情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。これに対し、先行研究では「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質をその指針値レベルでマウスに反復吸入暴露（7日間）し、病理組織所見が得られない段階での遺伝子発現変動を Percellome トキシコゲノミクス法により測定し、肺、肝において化学物質固有及び共通のプロファイルを網羅的に捕えた。加えて、海馬に対し化学構造の異なる3物質が共通して神経活動抑制を示唆する遺伝子発現変化を誘発したことから、人のSHSにおける「不定愁訴」の原因解明の手がかりとなる可能性が示された。

本研究は、反復暴露の結果の検証とその判定根拠の一般化を目指し、SHSレベルでの単回暴露実験を実施し、①同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析し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、②情動認知行動解析と海馬における神経科学的物証の収集による中枢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、を目的とする。この際、脳が高感受性期にある子どもの特性に配慮した遅発性影響も検討する。

従来の吸入毒性試験では、病理組織学的変化が観測されないSHSレベルの暴露の有害性を、規制に向けて検証することが困難であった。その様な極低濃度での有害性の検証を可能とするために、本研究が提示する試験系の整備が必要である。本研究で

は、人の「不定愁訴」に当たる脳機能所見が規制決定の毒性情報として採用されるための、バリデーションに耐える新評価体系を提案する。また、肺・肝影響との関連性を明らかにする。これにより、急増中の新規物質について、SHSレベルの低濃度域での中枢影響を含む有害性を見落としなく検出可能な吸入毒性評価系の構築が期待される。尚、本法は従来法に比較し短期に少数の動物を使用し動物実験に関する3Rに資するとともに、化学物質に共通する分子機構の開示はカテゴリーアプローチの分子基盤を提供するもので、今後、国際的にも貢献する内容を有する。

B. 研究方法

先行研究にて確立したSHSレベルでの吸入暴露条件及び、肺・肝・脳における遺伝子発現経時データベースを基に、本研究では海馬での神経活動抑制が示唆されたホルムアルデヒド等3物質を主対象に、SHSレベルでの暴露（成熟期及び幼若期）の後のマウス個体の高精度な情動認知行動解析の実施と海馬のタンパク発現変動などの神経科学的物証の収集を行う。これと並行し、上記3物質を含むシックハウス問題に関する検討会が掲げる物質につき、SHSレベルでの単回暴露実験を実施し、同一個体の海馬、肺、肝の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。独自開発になる教師無しクラスター化法と既知機能クラスター化法を基にしたインフォマティクス解析により予測システム機能の精度を継続的に向上させて行く。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つの分担課題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）、吸入暴露影響の情動認知行動解析と神経科

学的物証の収集（種村）。

平成 26 年度は、トキシコゲノミクス解析に向けてキシレン及びパラジクロロベンゼンを、また情動認知行動解析に向けてキシレンをマウスに吸入暴露した。以下に実験方法の概要を示す。

トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験

11 週齢の雄性 C57BL/6J マウス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 2 時間単回暴露（2、4、8、24 時間後に観測）及び、解析結果に応じて 22 時間/日×7 日間反復暴露（22、70、166、190 時間後に観測）を実施する。採取組織は、肺・肝・脳 4 部位（海馬、皮質、脳幹、小脳）とする。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（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。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（和光純薬工業）。ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、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行った。濃度測定には、捕集管を用いた。

評価システムの構築：吸入暴露後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、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三次元曲面解析法を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、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る。

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、先行研究と同様に Affymetrix 社

GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。

情動認知行動解析と神経科学的物証の収集：雄性マウス（成熟期[11 週齢]及び幼若期[2 週齢])を対象とした 22 時間/日×7 日間反復暴露（2 用量、6 群構成、各群 8 匹）を実施し、暴露終了日（急性影響の検討）及び暴露 3 日後（遅発性影響の検討）に、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験等からなる行動解析バッテリー試験を高精度に実施すると共に、脳における組織化学解析・タンパク発現解析により神経科学的物証の収集を行う。

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（CRL-9609、ATCC）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（P9582、Sigma-Aldrich）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、5 種類のシックハウス症候群関連化学物質を添加 3 時間後に細胞を回収し、遺伝子発現解析のための RT-PCR 及び培養上清に分泌される生理活性物質の測定に供した。5 種類のシックハウス症候群関連化学物質は、パラジクロロベンゼン（10、100、1000 μM）、ダイアジノン（9.84、98.4、984 μM）、スチレン（10、100、1000 μM）、テトラデカン（10、100、1000 μM）、フェノブカルブ（10、100、1000 μM）を選択した。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-Plex200、Bio-Rad）を用い、27 種類のサイトカイン等の生理活性物質（IL-1β、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、Eotaxin、FGF-2、G-CSF、GM-CSF、IFN-γ、IP-10、MCP-1、MIP-1α、MIP-1β、PDGF-BB、RANTES、TNF-α、VEGF）を選択、同時測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、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: SHSレベルの極低濃度吸入暴露実験の実施 (北嶋):

平成 26 年度はキシレン (指針値: 0.2 ppm) 及びパラジクロロベンゼン (指針値: 0.04 ppm) について目標通りに極低濃度下 (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) でのトキシコゲノミクスの為の 2 時間マウス単回吸入暴露実験 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) を実施した。加えて、キシレン (0, 2.0 ppm) (2.0 ppm は指針値の 10 倍濃度) について、成熟期マウスにおける情動認知行動解析の為の 22 時間/日×7 日間反復吸入暴露実験 (2 用量、6 群構成、各群 8 匹) を実施した。いずれの場合も、目標濃度に対し 100~111% の濃度での暴露が実施された事を確認した。

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):

平成 26 年度はキシレン及びパラジクロロベンゼンを対象とした極低濃度下 (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)、雄性マウスに 2 時間単回吸入暴露 (4 用量、各群 3 匹、[暴露 2, 4, 8, 24 時間後に観測]) させ、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実施した。

海馬での解析の結果、両物質ともに神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) の発現が、暴露 2 時間後に指針値レベルの濃度から、また先行研究での反復暴露 (7 日間) での場合と同程度に強く抑制され、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、Klf2 及び Ier2 遺伝子

の発現減少が認められた。また、この抑制は、その 2 時間後には回復していた。先行研究における反復暴露の際に認められた、暴露休止後の IEG 遺伝子発現のリバウンド現象は、キシレン 2 時間暴露の際は認められなかったが、パラジクロロベンゼン 2 時間暴露の際は Fos、Dusp1、Junb、Egr4 及び Ier2 遺伝子について暴露 24 時間後に認められた。ま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、GABA 受容体 (Gabbr1、Gabbr2 及び Gabbr3) 遺伝子の発現の増加が、両物質共に、暴露 24 時間後に用量依存的に認められ、この事から抑制性神経伝達物質 GABA 作動性ニューロンが活性化し、海馬での神経活動が抑制される事が示唆された。

肺での解析の結果、キシレンの場合は、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、ユビキチン化及びグルタチオン代謝系が見いだされ、肺において酸化ストレスが生じている事が示唆された。パラジクロロベンゼンの場合は、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見いだせなかった。

肝の解析の結果、両物質共に、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見いだせなかった。

先行研究において、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、22 時間/日×7 日間反復暴露の際の海馬において IEG の顕著な発現抑制が認められることを報告し、この機序として、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、肝・肺の連関解析から、6 時間/日×7 日間反復暴露時の肺において、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たため、この分子が共通因子の候補と考えられることを報告した。

そこで、この 3 物質以外の検討会が掲げる物質の 6 時間/日×7 日間反復暴露時のデータを再解析した結果、肺において、Il1b 遺伝子の発現増加が、アセトアルデヒド以外の物質に共通して認められることを見い

でした。

C-3：吸入暴露影響の情動認知行動解析と神経科学的物証の収集（種村）：

平成 26 年度はキシレンを対象とし、極低濃度下（0、2.0 ppm）（2.0 ppm は指針値の 10 倍濃度）、22 時間/日×7 日間反復吸入暴露した成熟期マウスについて情動認知行動解析（2 用量、6 群構成、各群 8 匹）を実施した。解析時点として、暴露終了日と暴露 3 日後の 2 つの時点を選択した。前者は急性影響の検討に当たるが、この時点を選んだ理由は、先行研究での海馬における遺伝子発現解析において神経伝達の抑制を示唆するデータを有しており、この時点であれば情動認知行動異常が観察されると予想された為である。具体的には、神経伝達の抑制を示唆する IEG の発現低下は 22 時間暴露直後に、またその次の観測点である暴露休止 24 時間後には逆に発現のリバウンドが認められており、暴露終了日中は、IEG が発現低下している可能性が高いためである。暴露 3 日後は遅発性影響の検討に当たる。この時点を選んだ理由は、この時点が当方で多くの解析データを有する遅発性の情動認知行動解析のプロトコールでの測定時点である為であり、これらのデータとの比較解析が可能となるためである。

解析の結果、暴露終了日の時点（急性影響の検討）では、オープンフィールド試験、明暗往来試験では対照群と比較し有意な変化は認められなかったが、条件付け学習記憶試験において空間-連想記憶及び音-連想記憶の有意な低下が認められた。一方、暴露 3 日後での解析では（遅発性影響の検討）、全ての試験項目で対照群と有意な差は認められなかった。

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（慶長）：

平成 26 年度は、最も正常の気道細胞に近いといわれるヒト気道上皮細胞株（BEAS2B 細胞）を用い、多種類のサイトカイン産生を測定する実験系を構築し、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について、ホルムアルデヒド以外の 5 種類の関連物質につき検討したところ、テトラデカンを除き、それぞれの化学物質の高濃度では、同様な傾向が認められたが、低濃度では、濃度依存的な増強効果は認められなかった。また、poly I:C 刺激を加えない化学物質単独でも、各物質の高濃度では、IL-8 mRNA の上昇が認められた。加えて、本研究班において、複数のシックハウス関連化学物質について、6 時間/日×7 日間反復吸入暴露の際にマウス肺において発現増加が認められた I11b に着目し、この発現量を測定したところ、高濃度のパラジクロロベンゼンにおいて、polyI:C 刺激に関わらず、I11b の発現増加が認められた。クロロピリホスにおいては、IL-8 発現増強効果に加え IP-10 の培養上清中の著しい濃度上昇が認められた。

D. 考察

以上の通り、①同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析し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、②情動認知行動解析と海馬における神経科学的物証の収集による中枢神経に対する有害性の実証、及び遺伝子発現変動データの中枢影響に関する予見性の確認、以上 2 つの目的に向け、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、平成 26 年度は、トキシコゲノミクスに向けて、キシレン及びパラジクロロベンゼンについて目標通りに極低濃度下での 2 時間マウス単回吸入暴露実験を実施し、加えて情動認知行動解析に向けて、指針値の 10 倍濃度のキシレンについて、成熟期マウスにおける 22 時間/日×7 日間反復吸入暴露実験を実施した。

一つ目の目的の為に実施した遺伝子発現変動解析では、SHS レベルの極低濃度の吸入暴露により、キシレン、パラジクロロベンゼン両物質ともに、海馬において神経活動の指標となる IEG の発現が、暴露 2 時間後に指針値レベルの濃度から、先行研究での反復暴露（7 日間）での場合と同程度に強く抑制され、海馬神経活動の抑制を示唆

する所見が再確認された。この抑制は、その次の観測時点である暴露終了 2 時間目には回復していた。先行研究では、6 時間/日×7 日間反復暴露の際、IEG 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 時間目では毎日リバウンド現象が生じていることを示唆する所見を得ていたが、今年度の実験により、IEG の発現抑制は 2 時間暴露直後でも十分に認められ、またこの場合、暴露終了 2 時間後には回復することが見いだされた。暴露終了後 24 時間目までの間のリバウンド現象は、キシレン暴露の際は認められず、パラジクロロベンゼン暴露の際の一部の IEG で暴露終了 8 時間あるいは 24 時間後に認められた。このことから、IEG のリバウンド現象は、暴露時間の長さ依存する事が示唆された。

この IEG の抑制機序として、先行研究では、6 時間/日×7 日間反復暴露時の肝・肺の連関解析において、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）に共通して発現増加が認められ、また *in silico* でのプロモーター解析（Upstream analysis、Ingenuity Pathways Analysis）にて IEG の転写を調節し得る遺伝子として、I11b が示されたことから、これを候補分子として報告し、肺或いは肝からの二次的シグナルとして I11b が海馬に働き IEG の発現を抑制するという可能性を示唆した。今年度、この 3 物質以外の検討会が掲げる物質について再解析した結果、6 時間/日×7 日間反復暴露時の肺において、I11b 遺伝子の発現増加が、アセトアルデヒド以外の物質に共通して認められることを見いだした。この事は、I11b が IEG の抑制分子である可能性を支持するものと考えられる。またアセトアルデヒドでは、I11b 遺伝子の顕著な発現増加が認められなかったことから、アセトアルデヒド暴露の際は、海馬での IEG の発現抑制ならびに神経伝達に影響を与えない可能性が考えられた。そこで平成 27 年度は、今年度実施予定であったホルムアルデヒドと共に、アセトアルデヒドを含む 3 物質について同様な検討を実施し、比較検討する予定である。

なお I11b の海馬内投与により、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）を見いだしており、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示唆される。血中の I11b が血液脳関門を通過できなければ、海馬に影響を与える事が出来ない事となるが、血液脳関門を I11b が通過するという報告（Banks WA ら、J Pharmacol Exp Ther 259(3): 988-996, 1991）（トランスポーターは未同定）を見いだしており、血中の I11b が海馬に影響を与え得るものとする。

2 つ目の目的に向け実施した、情動認知行動解析では、海馬における神経伝達の抑制を示唆する遺伝子発現変動データの予見通り、指針値の 10 倍濃度のキシレン 22 時間/日×7 日間反復暴露の暴露終了日では（急性影響の検討）、オープンフィールド試験、明暗往来試験では対照群と比較し有意な変化は認められなかったが、条件付け学習記憶試験において、空間-連想記憶及び音-連想記憶の有意な低下が認められ、暴露 3 日後までに回復することが示された。従って、キシレンの暴露期間中及び暴露直後では学習記憶異常を示すが、この影響は可逆的であることが示唆された。この事は、目的の一つである、中枢に対する有害性を実証し、海馬での遺伝子発現変動データの予見性を確認したものとする。引き続き、脳における組織化学解析・タンパク発現解析により神経科学的物証の収集を行う。加えて、複数のモデル化合物の幼若期における経口投与により、成熟期に予期せぬ遅発性の情動認知行動異常を誘発する知見を別途得ていることから、本研究において、キシレンについて幼若期暴露の際の遅発性影響を今後検討予定である。

平成 27 年度は、今年度実施予定であったホルムアルデヒドと共に、遺伝子発現変動解析にて海馬での神経伝達抑制が示唆されなかったアセトアルデヒドについても同様な検討を実施し、比較検討する予定である。

ヒト気道上皮細胞株（BEAS2B 細胞）を用いる *in vitro* の解析系では、多種類のサイトカイン産生を測定する実験系を構築し、

パラジクロロベンゼン、ダイアジノン、スチレン、テトラデカン、フェノブカルブの5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結果、poly I:C 刺激を加えない化学物質単独でも、各物質の高濃度では、IL-8 mRNA の上昇が認められ、また poly I:C 刺激後も、テトラデカンを除き、それぞれの化学物質の高濃度では、同様な傾向が認められたことから、微生物由来物質の存在により、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いるものと考えられ、本解析系はヒトへの影響を検討する際のモデルとして有用と考える。また、本解析系において、少なくとも高濃度のパラジクロロベンゼン適用時に、マウスを用いた反復吸入曝露の際に肺において発現増加が認められた I11b の発現増加が認められた事は、動物実験における解析結果がヒトにおいて確認できた事を示唆してものと考えられる。今後も引き続き、実験動物を用いた吸入曝露実験結果との対応をとり、ヒトへの外挿性向上を図る。

E. 結論

このように、先行研究での7日間反復曝露の際の海馬における遺伝子発現解析から予見された情動認知行動の異常を確認すべく、成熟マウスに対して指針値の10倍濃度のキシレンの22時間/日×7日間反復曝露後の情動認知行動解析を実施した結果、曝露終了日には、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められ、曝露3日目には回復することが判明した。SHSレベルでのキシレン曝露により可逆性の学習記憶異常が誘発されることが示された。この事は、本研究の第二の目的である中枢に対する有害性を学習記憶異常として実証し、海馬での遺伝子発現変動データの予見性が確認されたものと考えられる。引き続き、神経科学的物証の収集を行うとともに、幼若期曝露の際に遅発性の影響が残るか否かの検討ならびに、検討会が掲げる他の物質での検討を行い、得られた成果をさらに補強し、中枢神経毒性評価の一般化を進める。

また、SHSレベルでの極低濃度曝露に

より、キシレン、パラジクロロベンゼン共に、先行研究での6時間/日×7日間反復及び22時間/日×7日間反復曝露時だけではなく、2時間単回曝露の際でも、曝露直後に神経活動の指標となる IEG の発現が強く抑制される事から、少なくとも曝露2時間以内に IEG を抑制する因子が海馬に作用し、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 IEG の抑制機序として、肺或いは肝からの二次的シグナルとして I11b が海馬に働く可能性が高いものと考えているが、検討会が掲げるアセトアルデヒド以外の物質について、6時間/日×7日間反復曝露時の肺において I11b 遺伝子の発現増加が認められた事は、I11b が IEG の抑制分子である可能性を支持するものと考えられる。この事は第一の目的である同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析することによる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、に対する成果と考える。ヒト気道上皮細胞株 (BEAS2B 細胞) を用いる *in vitro* の解析系において、高濃度のパラジクロロベンゼン適用時に I11b の発現増加が認められた事から、ヒトにおいてもこの I11b が IEG の抑制分子である可能性が示唆され、ヒトへの外挿性向上につながる成果と考える。今後は、海馬での神経伝達抑制が示唆されなかったアセトアルデヒドを含む検討会が掲げる他の物質についても同様な検討を実施し、これまで得られた結果と比較検討することで評価手法及び基準の一般化を進める。

これらの検討を通して、急増中の新規物質について、SHSレベルの低濃度域での中枢影響を含む有害性を見逃しなく検出可能な吸入毒性評価系の構築が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J and Nakamura T, Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest* 124(7): 3061-3074, 2014.

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J

and Blumberg B, Active Repression by RAR γ Signaling is Required for Vertebrate Axial Elongation. *Development* 141(11): 2260-2270, 2014.

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. *Genomics Data* 2: 296-298, 2014.

Hang NTL, Matsushita I, Shimbo T, Hong LT, Tam DB, Lien LT, Thuong PH, Cuong VC, Hijikata M, Kobayashi N, Sakurada S, Higuchi K, Harada N, Endo H and Keicho N, Association between tuberculosis recurrence and interferon- γ response during treatment. *J Infect* 69: 616-626, 2014.

Shirakata Y, Hiradate Y, Inoue H, Sato E and Tanemura K, Histone h4 modification during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev* 60(5): 383-387, 2014.

Inoue H, Hiradate Y, Shirakata Y, Kanai K, Kosaka K, Gotoh A, Fukuda Y, Nakai Y, Uchida T, Sato E and Tanemura K, Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Lett* 588(11): 2003-2008, 2014.

2. 学会発表 (抜粋)

Kitajima S and Kanno J, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, 2014 Spring International Symposium of Korean Society of Toxicology (KSOT) (2014. 5. 22) Seoul, Korea.

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純
毒性の網羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014. 7. 2)

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吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス-化学構造が異なる 3 物質の比較-、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014. 7. 3)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗-新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析-、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014. 7. 2)

相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
遺伝子発現からみた毒性学-Percellome トキシコゲノミクスの進捗-、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会 (2014. 7. 25)

平賀孔、種村健太郎
マウスへのネオニコチノイド系農薬アセタミプリド単回曝露による遅発中枢影響の性差、第 41 回 日本毒性学会学術年会 (2014. 7.)

Kanno J, Aisaki K and Kitajima S, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014. 8. 27), Prague, Czech Republic.

Kanno J, Aisaki K and Kitajima S, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014) (2014. 9. 9) Edinburgh, UK.

Matsushita I, Hijikata M, Ito H and Keicho N, An in vitro model of sick building syndrome using human bronchial epithelial cells, 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology (2014. 11. 13-16), Bali, Indonesia.

慶長直人、松下育美、Hang NTL、Thuong PH、櫻田紳策、Cuong VC、Lien LT、土方美奈子
潜在性結核感染症における全血中マイクロ RNA と抗結核免疫関連遺伝子発現の関連、第 59 回日本人類遺伝学会 (2014. 11. 20)

種村健太郎、菅野 純
ネオニコチノイド系農薬による中枢神経影響解析および生殖機能影響解析、第 17 回環境ホルモン学会、第 17 回環境ホルモン学会研究発表会 (2014. 12.)

古川佑介、種村健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
アセチルコリンエステラーゼ阻害作用をもつ殺虫剤の曝露による遅発性の中枢神経影響の比較、第 17 回環境ホルモン学会研究発表会 (2014. 12. 10)

平賀孔、種村健太郎
マウスへのネオニコチノイド系農薬アセタ
ミプリド単回曝露による遅発中枢影響の性
差、第 17 回環境ホルモン学会研究発表会
(2014. 12.)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添 4

Ⅱ. 分担研究報告書

平成26年度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不定愁訴の分子実態の把握と
情動認知行動影響を包含する新評価体系の確立-（H26-化学-一般-001）

分担研究報告書

分担研究課題：「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」

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	小川幸男	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	高橋祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	古川佑介	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部
	相磯成敏	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部

研究要旨

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群（SHS）の指針濃度をはるかに超える事から、そこから得た毒性情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。これに対し先行研究では「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質をその指針値レベルでマウスに反復吸入暴露（7日間）し、病理組織所見が得られない段階での遺伝子発現変動を Percellome トキシコゲノミクス法により測定し、肺・肝において化学物質固有及び共通のプロファイルを網羅的に捕えた。加えて、化学構造骨格の異なる3物質が共通して海馬における神経活動の抑制を示唆する遺伝子発現変化を誘発した事から、人のSHSにおける「不定愁訴」の原因解明の手がかりとなる事を示した。

本研究は上記の結果を基礎に、反復暴露の結果の検証とその判定根拠の一般化を目指し、SHSレベルでの単回暴露実験を実施し、①同一個体の海馬・肺・肝の遺伝子発現変動を解析し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、②情動認知行動解析と海馬における神経科学的物証の収集による中枢に対する有害性の実証、及び遺伝子発現変動データの中核影響に関する予見性の確認、を目的とする。この際、脳が高感受性期にある子どもの特性に配慮した遅発性影響も検討する。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、先行研究での暴露条件である2時間単回暴露のプロトコールにより、また第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である22時間/日×7日間反復暴露のプロトコールにより実施する。

平成26年度（今年度）は、トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験に向け、キシレン（指針値：0.2 ppm）及びパラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について、SHSレベル（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2時間単回吸入暴露をマウス（成熟期）に対して実施し、また情動認知行動解析のための吸入暴露実験に向け、キシレン（0、2.0 ppm：2.0 ppmは指針値の10倍濃度）について、SHSレベルでの22時間/日×7日間反復暴露をマウス（成熟期及び幼若期）に対して実施した。その結果、トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験において、キシレンの目標暴露濃度（0.2、0.7及び2.0 ppm）に対して、それぞれ0.21、0.77及び2.07 ppm、パラジクロロベンゼンの目標暴露濃度（0.04、0.12及び0.4 ppm）に対して、0.040、0.126及び0.44 ppm、他方、情動認知行動解析のための吸入暴露実験においては、キシレンの目標暴露濃度（2.0 ppm）に対して、成熟期暴露では2.14 ppm、幼若期暴露では1.93 ppmと、いずれの場合も、目標濃度に対し100～111%の濃度での暴露が実施された事を確認した。

A. 研究目的

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群（SHS）の指針濃度をはるかに超える濃度であることから、毒性試験から得た情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。これに対し、先行研究では「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質をその指針値レベルでマウスに反復吸入暴露（7日間）し、病理組織所見が得られない段階での遺伝子発現変動を Percellome トキシコゲノミクス法により測定し、肺、肝において化学物質固有及び共通のプロファイルを網羅的に捕えた。加えて、海馬に対し化学構造の異なる3物質が共通して神経活動抑制を示唆する遺伝子発現変化を誘発したことから、人のSHSにおける「不定愁訴」の原因解明の手がかりとなる可能性が示された。

本研究は、反復暴露の結果の検証とその判定根拠の一般化を目指し、SHSレベルでの単回暴露実験を実施し、①同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析し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、②情動認知行動解析と海馬における神経科学的物証の収集による中枢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、を目的とする。この際、脳が高感受性期にある子どもの特性に配慮した遅発性影響も検討する。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、先行研究での暴露条件である2時間単回暴露のプロトコールにより、また第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である22時間/日×7日間反復暴露のプロトコールにより実施する。

平成26年度（今年度）は、トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験に向け、雄性マウス（成熟期）を対象とし、先行研究での暴露条件である2時間単回暴露実験（4用量、16群構成、各群3匹）

（2、4、8、24時間後に観測）にて、キシレン（指針値：0.2 ppm）及びパラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について、SHSレベル（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2時間単回吸入暴露を実施し、また情動認知行動解析のための吸入暴露実験に向け、雄性マウス（成熟期及び幼若期）を対象とし先行研究での暴露条件である22時間/日×7日間反復暴露試験（2用量、6群構成、各群8匹）にて、キシレンについてSHSレベル（0、2.0 ppm：2.0 ppmは指針値の10倍濃度）での22時間/日×7日間反復暴露を実施した。

B. 研究方法

B-1：被験物質

B-1-1：キシレン

キシレン（Xylene；分子量：106.17、CAS No.：1330-20-7）は、下記の試薬を使用した。

製造元：和光純薬工業株式会社

試薬名：キシレン

カタログ番号：244-00081（3Lガロン瓶）

ロット番号：KQR1283

沸点：144℃（*o*-体）、139.3℃（*m*-体）、137～138℃（*p*-体）

蒸気圧：0.7kPa（*o*-体、20℃）、0.8kPa（*m*-体、20℃）、0.9kPa（*p*-体、20℃）

比重：0.8801（*o*-体、20℃/4℃）、0.8684（*m*-体、15℃/4℃）、0.86104（*p*-体、20℃/4℃）

使用した被験物質の特性をガスクロマトグラフ法により確認し、その結果を図1-1～図1-5に示した。図1-1に*o*-キシレン標準品、図1-2に*m*-キシレン標準品、図1-3に*p*-キシレン標準品、図1-4にエチルベンゼン標準品及び図1-5に被験物質のキシレンのクロマトグラムをそれぞれ示した。この結果、被験物質中の分離した4つのピークは、先頭から、エチルベンゼン、*p*-キシレン、*m*-キシレン及び*o*-キシレン

の順で溶出し、被験物質のそれぞれのピークは各標準品のピークと保持時間が一致し、被験物質として用いたキシレンは、エチルベンゼン、*p*-キシレン、*m*-キシレン及び*o*-キシレンを含有することが確認された。

B-1-2: パラジクロロベンゼン

パラジクロロベンゼン (paradichlorobenzene; 分子量: 147、CAS No. : 106-46-7) は、下記の試薬を使用した。

製造元: 和光純薬工業株式会社

試薬名: パラジクロロベンゼン

カタログ番号: 047-01315 (500 g 瓶)

ロット番号: PDM2926

沸点 : 174°C

蒸気圧: 0.17kPa (20°C)

純度: 99.9% (和光純薬工業(株)測定値)

使用した被験物質の特性は、GC/MS (日立社製 M-80B) を用いて定性した。図2-1に被験物質のマススペクトルを、図2-2にパラジクロロベンゼンの文献のマススペクトルを示した。その結果、被験物質とパラジクロロベンゼンの文献データとは一致し、かつ分子イオンピーク及びフラグメントピークを確認した。

B-2: 吸入暴露システム

B-2-1: キシレンの吸入暴露システム

B-2-1-1: トキシコゲノミクスのための2時間単回吸入暴露実験:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー) (4用量、16群構成、各群3匹) を用いて、キシレン (指針値: 0.2 ppm) 及びパラジクロロベンゼン (指針値: 0.04 ppm) についてSHSレベル(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2時間単回吸入暴露実験を実施した。吸入暴露装置のシステムを図3に示した。吸入暴露装置は、①キシレンガスの発生装置、②発生および希釈空気の流量制御装置、③一次希釈したキシレンガスを各濃度の吸入チャンバーへ定量供給するフローコントロールバルブと浮子式流量計、④一次希釈したキシレンガスをさらに新鮮空気と混合・希釈するためのラインミキサー、⑤動物をキシレンガスに暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー、⑥濃度測定のためのサンプリング装置を作製した。

吸入チャンバーは全身暴露型であり、上部と下部が角錐状の角型チャンバーで観察窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1,060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。吸入チャンバーは、各群(0.2 ppm暴露群、0.7 ppm暴露群、2.0 ppm暴露群および対照群)につき1台、計4台を用いた。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、5連ケージ(1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H)mm)を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

B-2-1-2: 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復実験:

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

成熟期(11週齢)及び幼若期(2週齢)の雄性C57BL/6Nマウス(日本S L C)(2用量、6群構成、

各群8匹)を用いて、キシレン(指針値: 0.2 ppm)についてSHSレベル(0, 2.0 ppm)(2.0 ppmは指針値の10倍濃度)での22時間/日×7日間反復暴露を実施した。キシレンガスの発生法は先行研究での検討の結果、もっとも安定して発生する事ができる、バブリングにより発生させる装置(柴田科学、Photo 1)を用いてガスを発生する方法を採用した。25℃に加温した発生装置内タンクに入れたキシレン(和光純薬)に発生空気を送りバブリングによりガスを発生させ、15℃の冷水でガスを冷却、空気により一時希釈し、定量供給するフローコントロールバルブと浮子式流量計を用い、横層流型チャンバー(柴田科学、Photo 1)へ混合・希釈するためのラインミキサー内へ空調(温度:25±2℃、湿度:55±5%)された清浄な換気空気とともに希釈導入し、ステンレス製網ケージ(柴田科学、Photo 2, 3)内に収容したマウスに1日あたり22時間(午後12時より午前10時まで)、7日間吸入暴露した。本研究で以後使用するチャンバーは、横層流型(容積3 m³、Photo 1)とし、チャンバー内にサーキュレーター(Photo 2)を設置し強力に空気を攪拌した状態で動物への暴露を行うこととした(Photo 2, 3)。

成熟期(11週齢)マウスに暴露する場合と幼若期(2週齢)マウスに暴露する場合の2種を検討した。幼若期マウス(2週齢時)は哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入暴露を実施した。妊娠11日齢のマウスを購入し出生後、1腹につき産児5匹以上8匹未満で雄児マウスが2匹以上含まれる条件の腹を情動認知行動実験に供した。以上の条件の母児マウスを吸入暴露用金網ケージに収容して吸入暴露を実施した。幼若期吸入暴露のみにおいて、トレイ交換時の騒音などのストレスによる食殺防止の目的で、排泄物を受けるためのトレイ交換を無くすために、トレイ上にパルプ製床敷(パルマス_p)を、床敷と金網ケージ

が密着するように敷いた(Photo 4)。なお、このパルプ製床敷によるキシレン濃度への影響は認められなかった。

B-2-2: パラジクロロベンゼンの吸入暴露システム

B-2-2-1: トキシコゲノミクスのための2時間単回吸入暴露実験:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

吸入暴露装置のシステムを図4に示した。吸入暴露装置は、①パラジクロロベンゼン蒸気の発生装置(図4のA)、②パラジクロロベンゼン蒸気を希釈するための一次希釈装置(図4のB)、③希釈したパラジクロロベンゼン蒸気の流量を制御するための供給バルブ(フローコントロールバルブ)と流量計(図4のC)、④パラジクロロベンゼン蒸気を新鮮空気と混合し二次希釈するためのラインミキサー(図4のD)、⑤動物をパラジクロロベンゼン蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー、⑥濃度測定のためのサンプリング装置(図4のE)によって構成した。

吸入チャンバーは全身暴露型であり、上部と下部が角錐状になった角型のチャンバーで観察窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1,060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、5連ケージ(1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H) mm)を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

B-3：ガス発生方法

B-3-1：キシレンのガス発生方法

B-3-1-1：トキシコゲノミクスのための2時間単回吸入暴露実験：

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

キシレンガスの発生については、キシレンを一定温度下(22℃)でバブリングする方法でキシレンガスを作製した。この時、不要なキシレンを取り除く為に冷却(17℃)し、さらに再加熱(23℃)することで一定濃度のキシレンガスを得た。吸入チャンバーの換気流量は212 L/minでバブリングに使用した発生空気は1.0 L/min、希釈空気は10 L/minとして一定量(0.2 L/分, 0.67 L/分, 1.82 L/分)のキシレンガスを吸入チャンバーに送気して、目的濃度を作製した。(図5)

B-3-1-2：情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復実験：

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

発生方法については、先行研究での検討の結果、キシレンガスの低濃度を安定的に得られるバブリング方式が最適であったため、この手法を選択した。キシレンガスは、キシレンをバブリングすることで目標濃度を達成することが可能であった。発生流量を0.7L/分とし、供給流量はチャンバー内濃度測定結果を考慮し調整し、目標濃度2.0ppmに対して1.62~1.70L/分、一次希釈流量25L/分及びチャンバー換気流量650L/分で希釈し暴露した。

B-3-2：パラジクロロベンゼンのガス発生方法

B-3-2-1：トキシコゲノミクスのための2時間単回吸入暴露実験：

この部分は、日本バイオアッセイ研究センター

に委託することにより実施した。

恒温槽(27℃)に収納したパラジクロロベンゼン入り密封容器に、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(循環式恒温槽で27℃に温度維持)に導入した。さらに、清浄空気(希釈空気)で一定濃度に希釈混合した後、流量計を用いて吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、ラインミキサー上で新鮮空気と混合し、一定濃度のパラジクロロベンゼンガスを得た。吸入チャンバーの換気流量は212 L/minでバブリングに使用した発生空気は0.2 L/min、希釈空気は10 L/minとして一定量(0.80 L/分, 2.60 L/分, 7.5 L/分)のパラジクロロベンゼンガスを吸入チャンバーに送気し、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て使用した。なお、暴露濃度が目標濃度となるように、ガス濃度を毎日測定し、その結果を基にガス供給量を毎日補正し、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。(図6, 7)

B-4：吸入チャンバー内の濃度測定の方法

B-4-1：キシレンの濃度測定の方法

B-4-1-1：トキシコゲノミクスのための2時間単回吸入暴露実験：

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

B-4-1-1-A：被験物質の捕集方法

サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学製)を用い、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管(ORBOTM-91 Tube, Extra-Large、SUPELCO社製)を吸入チャ