

## ⑤ 脳の露出

脳が傷つかない様に爪をひっかけるように指を使って、頭蓋骨を正中から左右に開き（観音開き）、脳を露出させた。

## ⑥ 脳の摘出

先曲ピンセットを、横から頭蓋と脳の間に入れ（右側の方が容易）（脳をできるだけ触らないように頭蓋にあてる感じで）、硬膜の付着の有無を確認しつつ、硬膜の付着がある場合は除去し、徐々に頭蓋と脳の隙間を拡げていき、視交差を切断し、最終的に先曲部分全体で脳底部を反転するようにして脳を摘出し、これを氷冷した硝子シャーレ上にある、生理食塩水で十分に湿らせたろ紙(ADVANTEC Filter paper 2)上においた。※嗅球は切除し、脳としては採取しなかった。

## 6) 脳サンプリング

## ① 脳の左右の分離

切断しやすい様に、脳を適当な位置にシャーレの回転やピンセットを利用し置き、カミソリ刃にて正中で左右に切断し、右半分をピンセットにてろ紙に貼り付け、ホルマリンに入れ、左半分をろ紙上に、切断面を下側にして置いた。

⇒作業員Bに渡した。

## ② 小脳の分離「作業員B分担分」

あらかじめ氷冷したピンセット2本を使用した。

延髄部分にピンセットを添えながら、先曲ピンセットを、小脳とその他との境界部に入れ、底面までおろし、ろ紙上を滑らせるようにして小脳を分離し、ろ紙上に置いた（最後にはRNA用サンプルチューブに入れた）。

## ③ 脳幹の分離

延髄部分にピンセットを添えながら、大脳皮質と脳幹部の境界に、優しく先曲ピンセットの先曲部分を添え、両部位を少し剥離する様、境界を少しあけるようにし、海馬を見据えた後、脳幹部の底部のみを先曲ピンセットで挟み込む様につまみ、脳幹部を分離し、ろ紙上に置いた（最後にはRNA用サンプルチューブに入れた）。

## ④ 海馬と大脳皮質の分離

残った脳部分の（小脳側に）海馬がみえる。海馬の境界をしっかりと認識した後に、大脳皮質と海馬の境界部分に優しく先曲ピンセットの先曲部分を添え、海馬部位を軽くめくるように反転することにより海馬を分離し、ろ紙上に置いた（最後にはRNA用サンプルチューブに入れる）。白い部分は線条体であり、先曲ピンセットにてつまむように剥離し、大脳皮質の方に付着させた。

## ⑤ RNAサンプル

各サンプルをRNA用サンプルチューブに入れ、RNAlaterに浸かっていることを確認しサンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移した。登録用シールは、登録台紙に貼った。

## ⑥ 器具の洗浄

使用した器具を、生食で洗浄し水気を取り、次のサンプリングに用いた。

## ⑦ 解剖終了後のサンプル管理・RNA用サンプル

氷上のRNA用サンプルを氷上の一時保管用箱にラベルシールを確認しながら移した。同時に、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。全てを移し終えたら箱の中のサン

プル数を数え、tube check sheetにチェックを入れた。サンプリング担当者以外の人に同様にサンプル数をチェックしてもらい、問題がなければサンプルの入った一時保管用箱を4℃の冷蔵庫に保管した。

⑧ 解剖終了後のサンプル管理・病理標本用サンプル

サンプルの入った標本瓶をしんとう機に移し60分しんとうした。

7) 注意事項

全ての作業は作業着、手袋及びマスクを着用して行った。作業台をRNase AWAYで清拭し、RI実験用の紙（ポリエチレンろ紙）を敷いて作業した。臓器摘出、秤量以外の操作は氷上で行った。

サンプルに動物の毛、血液、他の臓器が混入しないようにした。日内変動で遺伝子発現量が変わるため、各採取時期のサンプル採取は約30分以内（2分半/匹）に終わらせた。

8) 試料の処理

肝のマイクロレイ用サンプルは、RNAlater入りのサンプルチューブ内で一晩冷蔵（4℃）後、サンプル重量を測定し、-80℃で保存した。

(3) マイクロレイ用サンプル（RNAlaterに浸かっているもの）重量測定

マイクロレイ用サンプルは、RNAlaterに4℃で一晩静置した後（全ての解剖が終了した翌日）、重量測定を行った。

（サンプルチューブに入った状態で重量測定し、その値から風袋を差し引いたものをサンプル重量とした。）

使用した器具及び試薬類

マイクロレイ用サンプル（RNAlaterに浸かったもの）

マイクロレイ用サンプルは、RNAlaterに4℃で一晩静置した後（全ての解剖が終了した翌日以降）、重量測定を行った。

フリーズボックス（フリーズボックスは新しいものを準備し、ラベルした）

手袋

マスク

氷

Ice box（マイクロレイ用サンプルを収納している箱と新しいフリーズボックスがいれられる大きさのもの）

手順（作業は、手袋とマスクを着用し行うこととした。）

① Ice boxに氷をいれ、この上に、マイクロレイ用サンプルを収納している箱と新しいフリーズボックスをおいた。

② サンプルは、1種類ずつ、一番小さいSample No.から測定しはじめた。

③ サンプル1本をとり、番号を確認し、重量を測定した。

④ 測定後、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認し、サンプルを新しいフリーズボックスに収納した。

同様に次のサンプルを測定した。

⑤ 測定後のサンプルは、-80℃で保存した。

⑥ この測定値から、風袋を差し引いたものをサンプル重量とした。

## (4) マイクロアレイ用サンプルの保存及び送付

肝、肺及び脳のmRNA測定用サンプルは4℃で一晩保存後、肝はサンプル重量測定し、超低温庫 (-80℃) で凍結して保存した。

これらの保存サンプルは、解剖から1週間以内にドライアイスを入れて、下記宛先に送付した。

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

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 高橋 裕次

## 2-3-4 病理学的検査

## (1) 剖検

全ての解剖動物について、肝、肺及び脳の肉眼的観察を行った。

## (2) 臓器重量

全ての解剖動物について、肝の湿重量を測定した。

## (3) 病理組織学的検査

2-3-3に記載した病理組織学検査用に採取した肝、肺及び脳について、切り出し、パラフィン包埋した。その後、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査し、病理組織診断結果のみを報告した。なお、病理標本（パラフィンブロックとプレパラート）は日本バイオアッセイ研究センターで保管する。

## 2-4 数値の取り扱いと表示

各数値データは、測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として測定し、表示した。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 位まで測定し、表示した。

臓器湿重量は、g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示す桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

### 3 試験成績

#### 3-1 被験物質の特性

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。

#### 3-2 吸入チャンバー内の被験物質濃度

吸入チャンバー内の被験物質濃度を表4に、不純物であるエチルベンゼン濃度を表5に示した。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標投与濃度0.2、0.7及び2 ppmに対し、測定値の平均±標準偏差は、それぞれ $0.210 \pm 0.005$  ppm、 $0.766 \pm 0.017$  ppm及び $2.07 \pm 0.05$  ppmであった。また、キシレンの不純物である吸入チャンバー内のエチルベンゼン濃度は、キシレンの目標投与濃度0.2、0.7及び2 ppmに対し、測定値の平均±標準偏差は、それぞれ $0.0503 \pm 0.0013$  ppm、 $0.183 \pm 0.005$  ppm及び $0.492 \pm 0.012$  ppmであった。

#### 3-3 動物の生死及び一般状態

全ての動物が、定期解剖時まで生存した。また、いずれの動物も特記すべき一般状態の変化を認めなかった。

#### 3-4 体重

解剖時の体重(g)を表6に示した。

#### 3-5 病理学的検査

##### 3-5-1 剖検観察

肝、肺及び脳の剖検所見を表7に示した。

いずれの動物も特記すべき変化を認めなかった。

##### 3-5-2 臓器重量

肝臓湿重量(g)を表6に示した。

##### 3-5-3 病理組織学的検査

肝、肺及び脳の病理組織学的検査の結果を表8に示した。

いずれの動物も被験物質の影響は特に認めなかった。

表 1 吸入チャンバー内環境の測定結果：温度（2時間／日、単回暴露）

単位：℃

チャンバー	CH-5	CH-6	CH-7	CH-8
群	対照群	0.2 ppm 群	0.7 ppm 群	2 ppm 群
全期間				
時間別平均値				
投与開始～投与終了時	22.5	23.0	23.1	23.2
投与開始～投与開始 4 時間目	22.4	22.6	22.8	22.7
投与開始～投与開始 8 時間目	22.5	22.5	22.7	22.6
投与開始～投与開始 24 時間目	22.5	22.5	22.6	22.5

表 2 吸入チャンバー内環境の測定結果：湿度（2時間／日、単回暴露）

単位：%

チャンバー	CH-5	CH-6	CH-7	CH-8
群	対照群	0.2 ppm 群	0.7 ppm 群	2 ppm 群
全期間				
時間別平均値				
投与開始～投与終了時	53.4	51.7	51.0	53.1
投与開始～投与開始 4 時間目	53.4	51.9	51.0	53.5
投与開始～投与開始 8 時間目	52.9	51.7	50.7	53.2
投与開始～投与開始 24 時間目	53.5	52.3	51.3	53.7

表 3 吸入チャンバー内環境の測定結果：換気量と換気回数（2時間／日、単回暴露）

単位：換気量 L/min 換気回数 回/時

チャンバー 群	CH-5		CH-6		CH-7		CH-8	
	対照群		0.2 ppm 群		0.7 ppm 群		2 ppm 群	
	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数
全期間								
平均値	213.4	12.1	212.3	12.0	211.1	11.9	211.9	12.0
標準偏差	1.0	0.1	1.0	0.1	0.1	0.1	0.5	0.0
時間別平均値								
投与開始～ 曝露終了時	213.1	12.1	212.1	12.0	211.1	11.9	212.3	12.0
投与開始～ 投与開始4時間目	214.5	12.1	213.4	12.1	211.3	12.0	212.2	12.0
投与開始～ 投与開始8時間目	213.7	12.1	212.5	12.0	211.1	11.9	211.7	12.0
投与開始～ 投与開始24時間目	212.2	12.0	211.0	11.9	211.0	11.9	211.3	12.0

表 4 吸入チャンバー内の被験物質濃度 (2時間/日、単回暴露)

	単位: ppm			
	対照群	0.2 ppm群	0.7 ppm群	2 ppm群
平均濃度	0	0.210	0.766	2.07
標準偏差	0	0.005	0.017	0.05

表 5 吸入チャンバー内のエチルベンゼン濃度 (2時間/日、単回暴露)

	単位: ppm			
	対照群	0.2 ppm群	0.7 ppm群	2 ppm群
平均濃度	0	0.0503	0.183	0.492
標準偏差	0	0.0013	0.005	0.012

表 6 解剖時体重及肝臓重量 (2時間/日、単回暴露)

## 投与終了時解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)	肝臓重量 平均値(g)	肝臓重量 標準偏差(g)
対照群	1001	25.1	1.291	1.286	0.022
	1002	23.9	1.261		
	1003	25.8	1.305		
0.2 ppm 群	1101	24.1	1.302	1.326	0.040
	1102	26.2	1.373		
	1103	24.9	1.304		
0.7 ppm 群	1201	24.5	1.294	1.366	0.126
	1202	24.7	1.292		
	1203	26.8	1.511		
2 ppm 群	1301	27.6	1.493	1.297	0.183
	1302	24.9	1.267		
	1303	23.8	1.130		

## 投与開始4時間目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)	肝臓重量 平均値(g)	肝臓重量 標準偏差(g)
対照群	1004	24.3	0.835	1.159	0.289
	1005	26.0	1.389		
	1006	25.3	1.253		
0.2 ppm 群	1104	24.4	1.232	1.247	0.030
	1105	24.7	1.227		
	1106	25.0	1.282		
0.7 ppm 群	1204	24.2	1.310	1.297	0.079
	1205	24.3	1.212		
	1206	24.8	1.369		
2 ppm 群	1304	23.7	0.929	1.217	0.254
	1305	24.8	1.411		
	1306	25.9	1.311		



## 投与開始 8 時間目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)	肝臓重量 平均値(g)	肝臓重量 標準偏差(g)
対照群	1007	23.7	1.123	1.053	0.064
	1008	23.6	0.998		
	1009	22.9	1.039		
0.2 ppm 群	1107	24.6	0.808	1.009	0.208
	1108	26.7	1.224		
	1109	23.8	0.996		
0.7 ppm 群	1207	24.1	0.931	1.068	0.123
	1208	25.7	1.167		
	1209	24.7	1.106		
2 ppm 群	1307	23.9	1.173	1.170	0.004
	1308	25.7	1.171		
	1309	24.1	1.166		

## 投与開始 24 時間目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)	肝臓重量 平均値(g)	肝臓重量 標準偏差(g)
対照群	1010	25.2	1.397	1.383	0.288
	1011	28.5	1.663		
	1012	27.0	1.088		
0.2 ppm 群	1110	27.3	1.091	1.282	0.393
	1111	27.1	1.020		
	1112	24.1	1.734		
0.7 ppm 群	1210	26.1	1.527	1.322	0.244
	1211	25.9	1.052		
	1212	25.4	1.388		
2 ppm 群	1310	27.0	1.557	1.410	0.157
	1311	25.2	1.429		
	1312	24.4	1.245		

表 7 剖検所見 (2時間/日、単回暴露)

## 投与終了時解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1001	著変なし	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし	著変なし
0.2 ppm 群	1101	著変なし	著変なし	著変なし
	1102	著変なし	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし	著変なし
0.7 ppm 群	1201	著変なし	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし	著変なし
2 ppm 群	1301	著変なし	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし	著変なし

## 投与開始4時間目解剖

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

## 投与開始 8 時間目解剖

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

## 投与開始 24 時間目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1010	著変なし	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし	著変なし
0.2 ppm 群	1110	著変なし	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし	著変なし
	1112	著変なし	著変なし	著変なし
0.7 ppm 群	1210	著変なし	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし	著変なし
2 ppm 群	1310	著変なし	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし	著変なし

表 8 病理組織所見 (2時間/日、単回暴露)

## 投与終了時解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1001	軽度な変化： 炎症性細胞集簇	著変なし	著変なし
	1002	著変なし	著変なし	著変なし
	1003	著変なし	著変なし	著変なし
0.2 ppm 群	1101	著変なし	軽度な変化： 肉芽性炎症	著変なし
	1102	著変なし	著変なし	著変なし
	1103	著変なし	著変なし	著変なし
0.7 ppm 群	1201	著変なし	著変なし	著変なし
	1202	著変なし	著変なし	著変なし
	1203	著変なし	著変なし	著変なし
2 ppm 群	1301	著変なし	著変なし	著変なし
	1302	著変なし	著変なし	著変なし
	1303	著変なし	著変なし	著変なし

## 投与開始 4 時間目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	軽度な変化： 炎症性細胞集簇	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.2 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.7 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
2 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	軽度な変化： 炎症性細胞集簇	著変なし	著変なし
	1306	軽度な変化： 炎症性細胞集簇	著変なし	著変なし

## 投与開始 8 時間目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	軽度な変化： 炎症性細胞集簇	著変なし	著変なし
0.2 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.7 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
2 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

## 投与開始 24 時間目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1010	著変なし	著変なし	著変なし
	1011	著変なし	著変なし	著変なし
	1012	著変なし	著変なし	著変なし
0.2 ppm 群	1110	著変なし	著変なし	著変なし
	1111	著変なし	著変なし	著変なし
	1112	軽度な変化： 炎症性細胞集簇	著変なし	著変なし
0.7 ppm 群	1210	著変なし	著変なし	著変なし
	1211	著変なし	著変なし	著変なし
	1212	著変なし	著変なし	著変なし
2 ppm 群	1310	著変なし	著変なし	著変なし
	1311	著変なし	著変なし	著変なし
	1312	著変なし	著変なし	著変なし

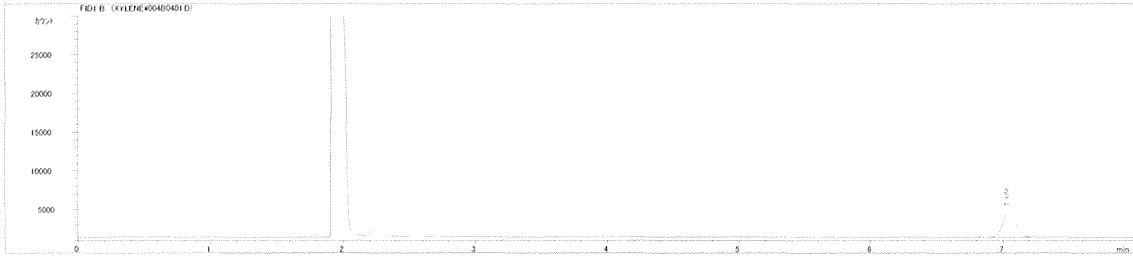


図 1-1 *o*-キシレン標準品



図 1-2 *m*-キシレン標準品



図 1-3 *p*-キシレン標準品

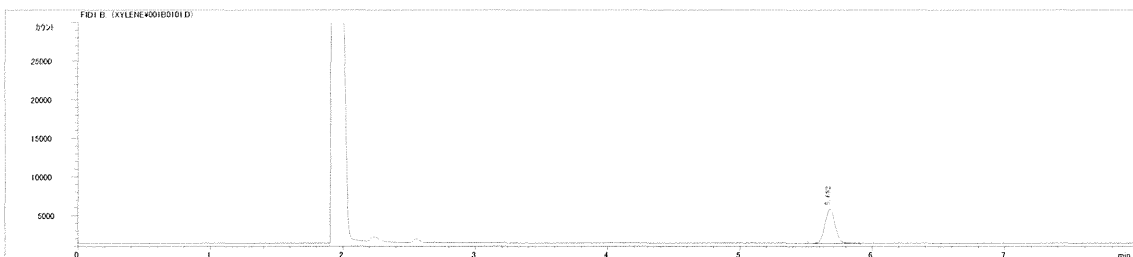


図 1-4 エチルベンゼン標準品

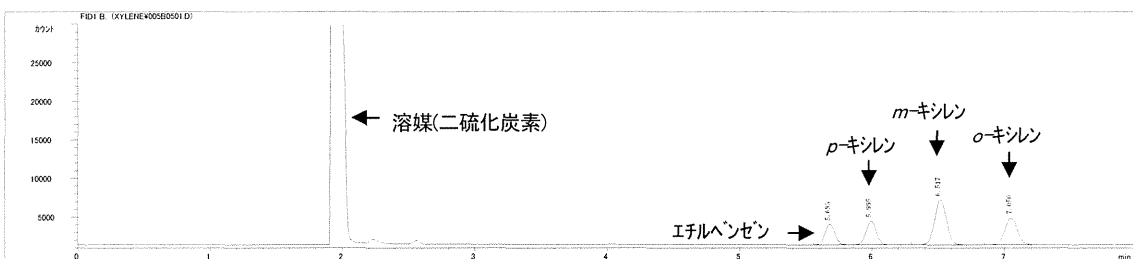
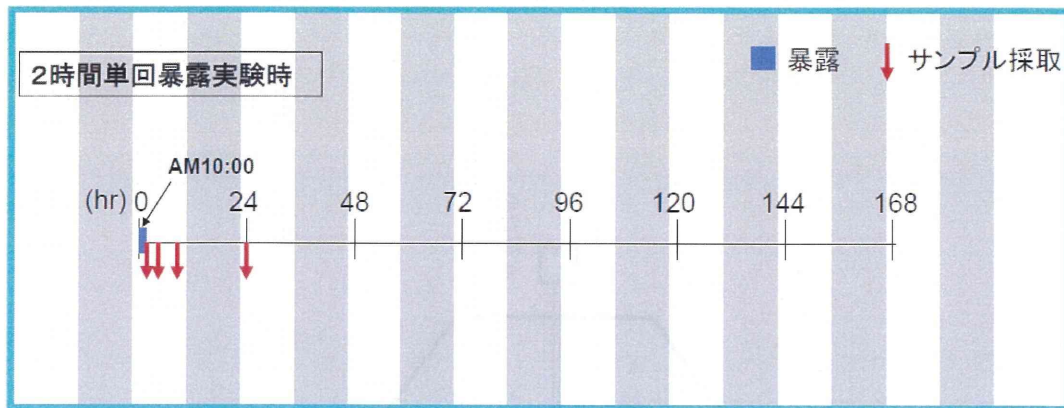


図 1-5 被験物質 (キシレン ロット番号: KQR1283)



暴露2、4、8、24時間後に観測 [刻：12時、14時、18時、10時]

図 2 試験スケジュール (2 時間/日, 単回暴露)

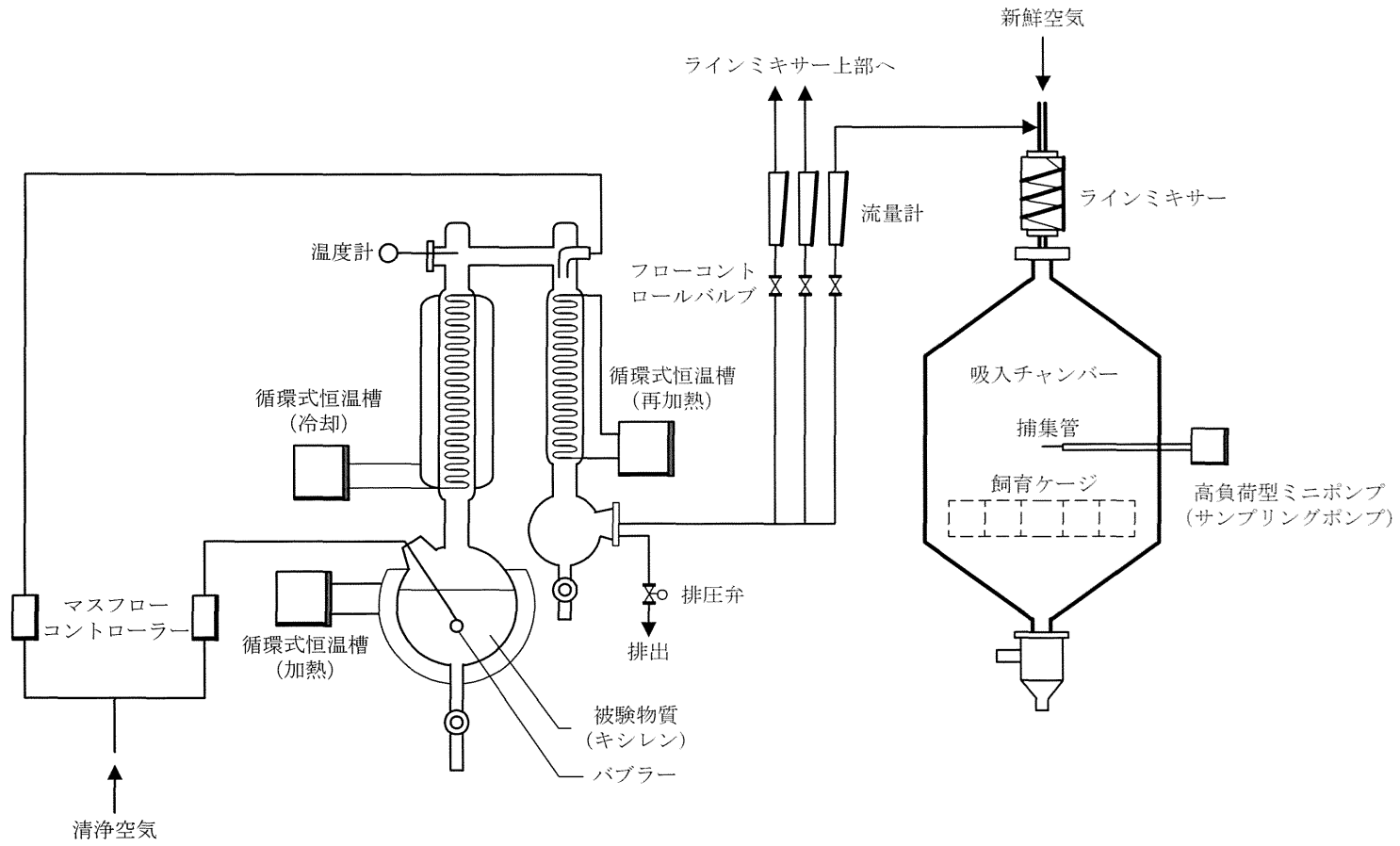


図 3 吸入装置のシステム



別紙-1-1

### 検査成績書

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 御中

2014年5月22日  
和光純薬工業株式会社

Code No.244-00081

キシレン



規格/等級	和光特級	
Lot No.	KQR1283	
数量	3L × 1	
検査項目	検査成績	規格値
外観	無色透明の液体	無色透明の液体
含量(o-,m-,p-キシレンの含量)(キャピラリーカラムGC)	84.55%	80%以上
吸光度 300nm	1.0以下	1.0以下
吸光度 320nm	0.2以下	0.2以下
吸光度 340nm	0.05以下	0.05以下
吸光度 360~400nm	0.01以下	0.01以下
水分	0.012%	0.03%以下
酸(HClとして)	0.001%以下	0.001%以下
塩基(NaOHとして)	0.001%以下	0.001%以下
硫黄化合物	試験適合(Sとして約6ppm以下)	試験適合(Sとして約6ppm以下)
テオフェン類	試験適合(C4H4Sとして約1ppm以下)	試験適合(C4H4Sとして約1ppm以下)
硫酸着色物質	試験適合	試験適合
検査年月日	2014/01/27	

判定	合格	検査責任者	吉田憲生
----	----	-------	------

(1/1)

成績書発行番号 9201050

別紙-1-2

被験物質であるキシレンの純度(%)

<i>o</i> -キシレン	<i>m</i> -キシレン	<i>p</i> -キシレン (%)	エチルベンゼン	計
24.1	39.1	17.5	14.3	95.0

製造元：和光純薬工業株式会社

カタログ番号：244-00081

ロット番号：KQR1283

測定方法：ガスクロマトグラフ法

測定条件

機器：HP5890A (アジレントテクノロジーズ)

カラム：Xylene Master (0.32 φ × 50m 信和化工株式会社)

温度：65°C

流量：5mL/min

注入量：1 μL

注入方法：スプリット法(1:10)

溶液処理：キシレンを二硫化炭素に溶解し、標準物質である *o*-、*m*-、*p*-キシレン及びエチルベンゼンと面積値を比較することにより、純度を測定した。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題： 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 ―経気道曝露モデルに対応した化学物質  
のヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響―

研究分担者 慶長直人（公財）結核予防会 結核研究所 生体防御部 部長

研究協力者 松下育美、土方美奈子 同部

**研究要旨** 化学物質が気道を通じて吸入される場合、低濃度でも人体に有害な影響を与えることが知られているが、どのような機構が背景にあるかは十分に明らかにされていない。シックハウス症候群について、ヒトの細胞モデル系を構築することは、そのメカニズムを知る上で重要な研究方法の一つと考えられる。ヒトの肺は常に外界の吸入粉塵や微生物に曝されており、そこに吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が惹起される可能性があり、我々はこれまでヒト気道上皮細胞株を用いて炎症応答に対するホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を検討してきた。本年度、ヒト気道上皮細胞株（BEAS2B 細胞）を用いた *in vitro* の炎症応答検出系により、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。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。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。複数の化学物質の吸入曝露動物モデルにより遺伝子発現の上昇傾向が認められた IL-1 $\beta$  の発現量を測定してみたところ、高濃度のパラジクロロベンゼンにおいては、IL-1 $\beta$  mRNA の発現が上昇していた。クロロピリホスにおいては、IL-8 発現増強効果が認められたが、さらに IP-10 の培養上清中の著しい濃度上昇が認められた。このように化学物質の種類により、シックハウス症候群における炎症応答・発症機序が異なっていることが推測される。多種多様なメカニズムを解析する為には、化学物質ごとにマーカーを検索することが必要であると思われる。

#### A. 研究目的

ヒトの肺は、外界の吸入粉塵や微生物に曝されている。さらに吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が誘発される可能性がある。環境中の微量な化学物質に反応して心身の不調を引き起こす「シックハウス症候群」に関連して指針に定められている13種の化学物質のうち、これまで我々はホルムアルデヒドを中心に検討を重ねてきた。すなわち、気道上皮細胞の炎症応答に及ぼす影響を

検討するため、ヒト気道上皮細胞株

BEAS2B を用いて、日常的な経気道性のウイルス曝露などを念頭に置いた poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する化学物質添加による *in vitro* での影響を定量 RT-PCR で検出する系を確立してきた。ホルムアルデヒドの系ではさらに、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン類を測定し、さらにシグナル伝達に関するタンパクのリン酸化について検討を行ない、poly I:C による IL-8 遺伝子発現がそれら

3つの主要なシグナル伝達系に依存していること、特に JNK 系が IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示した。これまで確立したヒト気道上皮細胞系による poly I:C の低濃度刺激下での化学物質添加による炎症応答への影響を検討する *in vitro* 実験系において、シックハウス症候群関連 13 化学物質のうち、ホルムアルデヒド以外に 4 種類の化学物質の影響を検討してきたが、本年度はさらに 5 種類の化学物質について検討、IL-8 以外に分泌される生理活性物質についても多項目、同時定量を行い、poly I:C とホルムアルデヒドの複合効果について検討した。

## B. 研究方法

### 「刺激物質」

外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、自然免疫系が病原体（特にウイルス）を認識する際のレセプターの agonist として知られる Poly I:C (P9582、Sigma-Aldrich) を選択した。

### 「化学物質」

シックハウス症候群関連 13 化学物質のうち、パラジクロロベンゼン (047-01315、和光純薬工業)、ダイアジノン (040-31891、和光純薬工業)、スチレン (191-08206、和光純薬工業)、テトラデカン (207-10705、和光純薬工業)、フェノブカル (45488、Sigma-Aldrich) の 5 種の化学物質を用いた。

### 「細胞」

これまでの検討から、ヒト気道上皮細胞株の中で最も正常の細胞に近い応答性を維持している安定した株化細胞として、BEAS2B (CRL-9609、ATCC) を用いた。

### 「培養および刺激」

細胞株を 25 cm<sup>2</sup> コラーゲンコートフラスコ (4100-010、IWAKI) を用い、気管支上皮細胞用増殖培地 BEGM (CC-3170、三光

純薬) で培養し (5 × 10<sup>5</sup> cells /flask)、90% confluent で、poly I:C (1, 10 µg/ml) で 24 時間刺激後、各化学物質を段階希釈して各々数段階の濃度で 3 時間添加した後、細胞を回収、total RNA を抽出した (74106、RNeasy Mini Kit、Qiagen)。これまでの系と同様に、1 µg の total RNA を random primer (3802、Takara) を用いて逆転写反応を行い、反応液量の 1/20 を 1 PCR 反応に持ち込み、IL8 の mRNA 発現レベルを TaqMan Gene Expression Assay (Hs00174103\_m1)、DUSP1 については、TaqMan Gene Expression Assay (Hs00610256\_g1)、IL-1b については、TaqMan Gene Expression Assay (Hs01555410\_m1) を用いた定量的 RT/PCR (Real-Time PCR System Step One Plus、Life Technology) で測定した。内在性コントロールには Human GAPDH を用い、 $\Delta\Delta Ct$  法で非刺激細胞での発現を 1 としたときの各細胞での相対発現量を求めた。

### 「生理活性物質の測定」

poly I:C とホルムアルデヒドの複合効果については、培養上清に分泌される生理活性物質を、Bio-Plex サスペンションアレイシステム (Bio-Plex200、Bio-Rad) を用いた。対象は、27 種類のサイトカイン等の生理活性物質 (IL-1 $\beta$ , 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- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF) を選択、同時測定した (27-plex GroupI、MSO-OKCAFOY、Bio-Rad)。

### (倫理面への配慮)

個人に由来するヒト検体を用いておらず、公に入手される細胞株のみを用いている。