

C. 研究結果

ヒト気道上皮細胞株を用いてシックハウス症候群関連の化学物質の潜在的な炎症増強作用を解析する *in vitro* の系において、インターロイキン8 (IL-8) の mRNA 発現量を指標にして、微生物関連物質 (polyI:C) と各種化学物質との複合効果が見られるか否かを検討した。

本年度は化学物質として、A: パラジクロロベンゼン (10, 100, 1000 μ M)、B: ダイアジノン (9.84, 98.4, 984 μ M)、C: スチレン (10, 100, 1000 μ M)、D: テトラデカン (10, 100, 1000 μ M)、E: フェノブカルブン (10, 100, 1000 μ M) を選択し、BEAS2B 細胞株を poly I:C (10 μ g/ml) で 24 時間刺激後、各種化学物質を 3 時間添加することにより、IL-8 mRNA の定量を実施し、同様な効果が認められるか否か、検討した。

初めに 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が、低濃度では明らかな効果が認められなかった。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 (図 1A, B, C, D, E)。

図 1 A

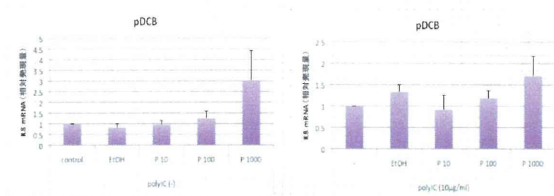


図 1 B

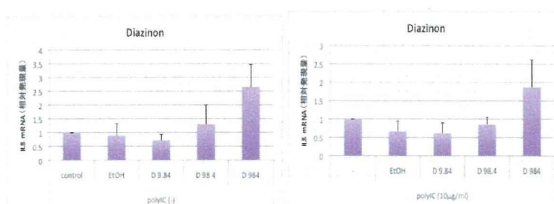


図 1 C

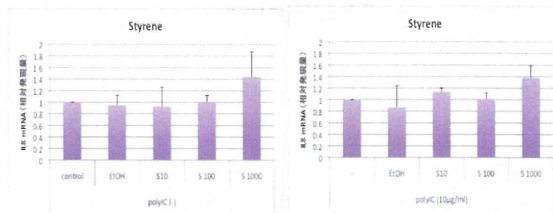


図 1 D

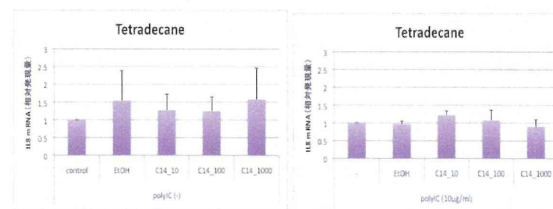


図 1 E

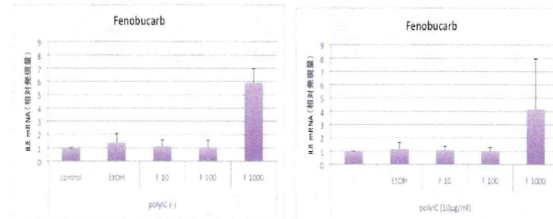


図 1 Poly I:C (10 μ g/ml) 非存在 (左)、存在 (右) 24 時間後、(A) パラジクロロベンゼン、(B) ダイアジノン、(C) スチレン、(D) テトラデカン、(E) フェノブカルブ添加して、3 時間後の IL-8 の遺伝子発現量について、化学物質無添加を 1 としたときの相対発現レベル (3 回の実験の平均と土標準偏差) を表示した。

次に、吸入曝露動物モデルで変動の見られる、炎症関連遺伝子発現についても、ヒト気道上皮細胞株を用いた細胞モデルにおいても比較検討した。動物モデルの肺において遺伝子発現の差異が認められた IL-1 β の mRNA 発現量を指標にして、微生物関連物質 (polyI:C) と各種化学物質との複合効果が見られるか否かを検討した。

図 2A

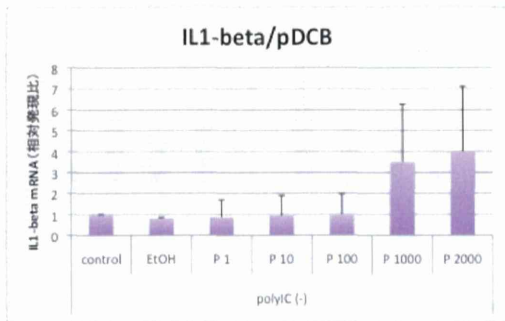


図 2B

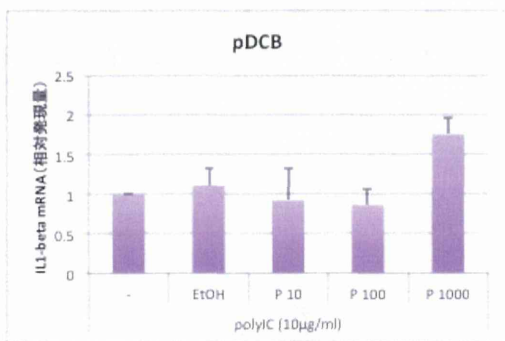


図 2 (A) Poly I:C 非存在、(B) Poly I:C (10 µg/ml) 存在下 24 時間、パラジクロロベンゼン添加後 3 時間の IL-1 β の遺伝子発現レベル

化学物質としては、昨年度まで検討してきた、ホルムアルデヒド、キシレン、アセトアルデヒド、クロロピリフォス、トルエン、パラ時クロルベンゼンについて、スクリーニングを行い、その結果、IL-8 で見られたものと同様、polyI:C 刺激に関わらず、高濃度のパラジクロロベンゼンを添加した場合には、IL1 β mRNA の発現が上昇した。

微生物関連物質 (polyI:C) と化学物質との複合効果が気道上皮細胞より分泌されるサイトカイン、ケモカインなどのタンパクレベルにおいても見られるか否か、培養上清中の生理活性物質の同時定量を行なった。今回、刺激に用いた化学物質は、微生物関連物質 poly I:C 曝露により、ホ

ルムアルデヒド以外で、IL-8 の遺伝子発現増強効果の認められたクロロピリホスと、IL-1 β の遺伝子発現の上昇を含めて、効果の見られたパラジクロロベンゼンを選択した。poly I:C 曝露により IL-8 や IL-1 β 以外の多数のサイトカイン・ケモカイン類が誘導されたが、化学物質として poly I:C にクロロピリホスを加えた場合には、poly I:C 単独に比べて、多種類の免疫細胞に作用するケモカインである IP-10 の、明らかな産生増強効果が認められた (図 3A)。一方、パラジクロロベンゼンを添加した場合、poly I:C 曝露単独に比べて、明らかな産生増強効果は認められなかった (図 3B)。

図 3A

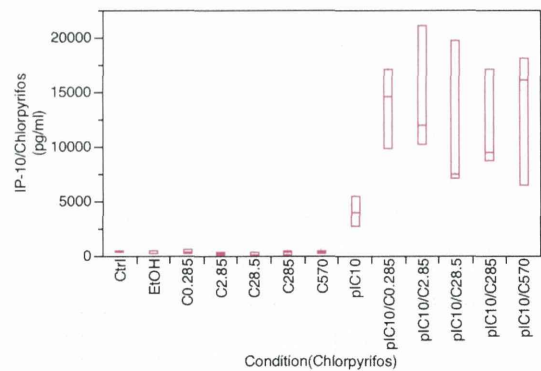


図 3B

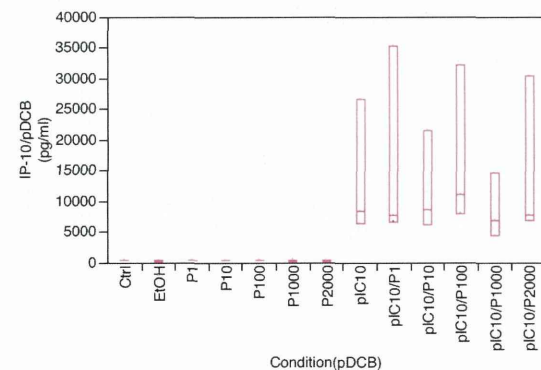


図 3 Poly I:C (10 µg/ml) 非存在 (左)、存在 (右) 24 時間後、(A) クロロピリホス、(B) パラジクロロベンゼン、添加 3 時間後の培養上清中の IP-10 量

同様のパターンが、好酸球性炎症に関与するケモカインとして知られる RANTES においても認められた (図 4A, B)。

図 4A

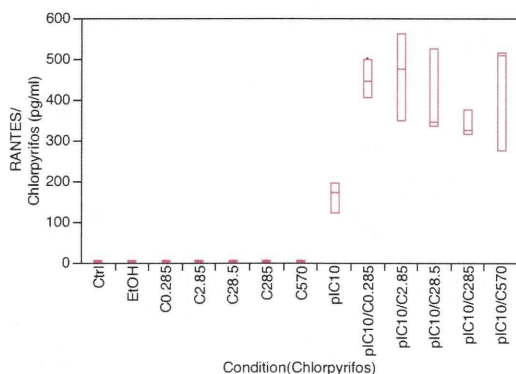


図 4B

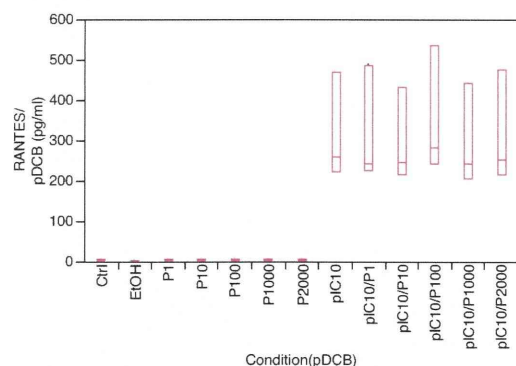


図 4 Poly I:C (10 µg/ml) 非存在 (左)、存在 (右) 24 時間後、(A) クロロピリホス、(B) パラジクロロベンゼン添加 3 時間後の培養上清中の RANTES 量

D. 考察

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

吸入曝露動物モデルにより遺伝子発現の有意な差異が認められた IL-1 β 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-8 遺伝子発現増強効果は見られなかったが、IL-1 β mRNA の発現は上昇した。逆に、IL-8 遺伝子発現増強効果の見られたホルムアルデヒドでは、IL-1 β mRNA の産生増強の効果は確認されなかった。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、IP-10 では、さらに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。

E. 結論

ヒト気道上皮細胞株を用いた *in vitro* 系においては、微生物由来物質の存在により、複数の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おり、化学物質のヒトへの影響を見る際の細胞モデルとして有用と思われる。吸入曝露動物モデルにより得られた遺伝子発現様式と比較するための基礎データを得ることができるものと考え

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1. Hijikata M, Matsushita I, Hang NT, et al. Age-dependent association of mannose-binding lectin polymorphisms with the development of pulmonary tuberculosis in Viet Nam. *Hum Immunol.* Aug 2014;75(8):840-846.
2. Hang NT, Matsushita I, Shimbo T, et al. Association between tuberculosis recurrence and interferon-gamma response during treatment. *The Journal of infection.* Jun 21 2014;69:616-626.

2. 学会発表

国際学会発表

1. Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Keicho N. An in vitro model of sick building syndrome using human bronchial epithelial cells Paper presented at: 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology; Nov 13-16, 2014; Bali, Indonesia.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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、H26-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-

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

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枢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。

本分担研究では上記①に対応する雄性マウスを用いたSHSレベルでの2時間単回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。

平成26年度（今年度）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。その結果、化学構造の異なる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、2時間の暴露の終了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、海馬での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。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、先行研究で実施した6時間/日×7日間反復暴露実験時の肺のデータを見ると、I11b遺伝子の発現増加が認められた事から、I11bがIEGの抑制分子である可能性を支持するものと考えた（但し、アセトアルデヒドは例外である可能性が同時に明らかとなった）。以上は、頭記①の目的であ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。また、キシレン2時間単回吸入暴露の際、肺において酸化的ストレスが誘発される事が示唆された。

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。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を考え、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1 β （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。

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、肝の暴露早期の遺伝子発現変動

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、上記第一の目的に向け、雄性マウス（成熟期）を対象としたSHSレベルでの先行研究で設定した2時間単回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。今年度（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℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化する。肝は5mm径の生検トレパンにより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℃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 μ L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ールに従い、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、ビオチン化 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、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 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。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。

吸入暴露実験

今年度 (平成 26 年度) は、キシレン

(Xylene; 分子量 : 106.17、CAS No. : 1330-20-7) 及び、パラジクロロベンゼン (paradichlorobenzene; 分子量 147.0、CAS No. 106-46-7) についてデータ解析を進めた。それぞれ先行研究と同一のものを使用した (キシレン : カタログ番号 : 244-00081、和光純薬工業、パラジクロロベンゼン : 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) を対象とした吸入暴露試験 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) を、2 時間単回暴露 (暴露開始から 2、4、8 及び 24 時間が経過した時点で観測) させた際の脳 (海馬)、肺及び肝を採取して網羅的に遺伝子発現変動を解析した。マウスへの暴露濃度 (目標値) は、室内濃度の指針値 (キシレン : 0.2 ppm、パラジクロロベンゼン : 0.04 ppm) を参照し、公比 $\sqrt{10}$ でそれぞれ、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) と設定した。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「RSort」を用いて網羅的に解析した。このソフトウェアは、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各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、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。また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を参照した。

(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、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、キシレン及びパラジクロロベンゼン、それぞれについて2時間単回暴露の際の海馬、肝及び肺における解析結果を示す。

C-1: SHSレベルでのキシレン [2時間単回] 暴露時の遺伝子発現変動解析:

C-1-1: キシレン [2時間単回] 暴露時の「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして4,390 ps、このうち目視により生物学的な変化を反映すると判定されたもの(Visually selected ps; VSP)として255 psが見いだされた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また神経系の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークとして、GABA受容体(Gabrb2、Gabrb3)遺伝子の発現増加が24時間に用量依存的に認められ、このこと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。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*)を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)における

Upstream Analysisを用いて検討した。この内、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tgfβ1が抽出されてきた。しかし、Tgfβ1の顕著な発現変動は、肺・肝ともに、また先行研究を含む3つの暴露プロトコルともに認められなかった。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして4,160 ps、VSPとして24 psが見いだされた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかったが、神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG)の発現が、2時間に指針値レベルの濃度から、また先行研究での反復暴露([6時間/日×7日間及び22時間/日×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、Fos、Duspl、Nr4a1及びIer2遺伝子の有意な発現減少、またArc、Junb、Egr4及びKlf2遺伝子の発現減少傾向が認められた。また、これらの遺伝子の発現抑制は、その2時間後の4時間の観測時点には回復していた。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認められなかった。

このIEGの遺伝子の内、Fos及びDuspl遺伝子の発現変動を図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。

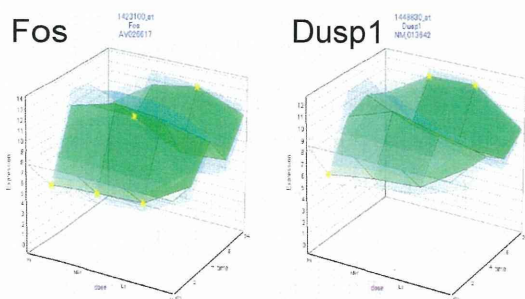


図1 キシレン2時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Fos 及び Dusp1 遺伝子の発現変動

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。

IEG 遺伝子を含む発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。この内、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tnf 及び I11β が抽出されてきた。この内、I11β は先行研究での 6 時間/日×7

日間反復暴露の際に、肺・肝ともに増加が認められたが 2 時間単回暴露の場合は 3 臓器共に顕著な発現変動は認められず、また Tnf の顕著な発現変動は、肺・肝ともに、また先行研究を含む 3 種類の暴露プロトコールともに認められなかった。

C-1-2: キシレン [2 時間単回] 暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 2,345 ps、VSP として 301 ps が見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークとして、酸化ストレス、ユビキチン化、グルタチオン代謝系が見いだされた。酸化ストレス関連遺伝子として具体的には、Aox1 (2 及び 4 時間、高用量)、Hmox1 (2、4 及び 8 時間、中・高用量)、Nfe2l2 (2 時間、高用量)、Prdx1 (2、4 及び 24 時間、高用量)、Txnrd1 (2、4 及び 8 時間、高用量) 及び Srxn1 遺伝子 (2、4 及び 8 時間、中・高用量; 24 時間、高用量)、またグルタチオン代謝関連遺伝子として、Gss、Gsta4、Gsta2 (4 及び 8 時間、中・高用量; 24 時間、高用量)、Gsto1 (4、8 及び 24 時間、中・高用量)、Gsta1 (2 及び 24 時間、高用量; 4 及び 8 時間、中・高用量)、Gsta2、Gpx2 (2 及び 24 時間、高用量; 4 及び 8 時間、中・高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。IPA による検索でもこれらのネットワークが抽出された。したがって、SHS レベルのキシレン 2 時間単回吸入暴露の肺において、酸化ストレスが生じている事が示唆された。この内、Hmox1、Srxn1、Gsta4 及び Gpx2 遺伝子の発現変動について図 2 に示す。

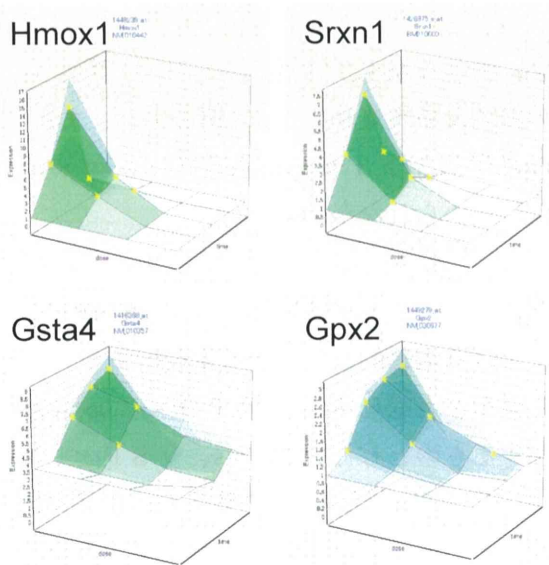


図2 キシレン2時間単回暴露時の「肺」における酸化ストレス関連遺伝子 *Hmox1* 及び *Srxn1* 遺伝子、及びグルタチオン代謝関連遺伝子 *Gsta4* 及び *Gpx2* 遺伝子の発現変動 溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の *t* 検定によりおこない *P* 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に★を付した。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPAにおける Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、転写因子として *Nfe2l2* (*Nrf2*) 及び *Atf4* が認められ、酸化ストレスは、*Nrf2* あるいは *Atf4* を介して生じていることが示唆された。一方、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、*Tgfb1*、*Pdgf bb*、*Tnf* 及び *Il1β* が抽出されてきた。この内、*Il1β* は先行研究での6時間/日×7日間反復暴露の際に、肺・肝とも増加が認められたが、*Tnf* 遺伝子では顕著な発現変動は、いずれの暴露プロトコールでも認められなかった。

増加が認められたが、それ以外の各遺伝子では顕著な発現変動は、3臓器に亘り、いずれの暴露プロトコールでも認められなかった。

他方、発現が有意 (*t* 検定での *P* 値 < 0.05) に減少するものとして 2,151 ps、V S P として 14ps が見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワーク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-1-3: キシレン [2時間単回]暴露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意 (*t* 検定での *P* 値 < 0.05) に増加するものとして 836 ps、このうち V S P として 154 ps が見いだされた。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認められなかった。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPAにおける Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、*Il1β* と *Tnf* が抽出されてきた。この内、*Il1β* は先行研究での6時間/日×7日間反復暴露の際に、肺・肝とも増加が認められたが、*Tnf* 遺伝子では顕著な発現変動は、いずれの暴露プロトコールでも認められなかった。

発現が有意 (*t* 検定での *P* 値 < 0.05) に減少するものとして 1,019 ps、このうち V S P として 120 ps が見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワーク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。

以上のキシレン [2 時間単回] 暴露時の海馬、肺及び肝の遺伝子発現変動解析の結果をまとめると、海馬では 24 時間に、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。また、神経活動の指標となる IEG の発現が、2 時間に指針値レベルの濃度から、また先行研究での反復暴露 ([6 時間/日×7 日間及び 22 時間/日×7 日間]) 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。また、これらの遺伝子の発現抑制は、その 2 時間後の 4 時間の時点には回復していた。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認められなかった。*in silico*でのプロモーター解析の結果、IEG を含む発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子として I11 β が抽出され、I11 β が海馬での神経伝達を抑制する可能性が示唆された。また少なくとも暴露開始 2 時間以内に IEG を抑制する因子が海馬に作用する可能性が示唆された。肺では、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、ユビキチン化、グルタチオン代謝系が見いだされ、肺において酸化的ストレスが生じている事が示唆された。肝では、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現時点では見いだせなかった。興味深い事に、肺および肝ともに、発現増加が認められた遺伝子についての、*in silico*でのプロモーター解析の結果、発現調節因子として I11 β が抽出され、I11 β が肺および肝において当該

遺伝子の発現増加に関与する可能性が示唆された。

C-2: S H S レベルでのパラジクロロベンゼン [2 時間単回] 暴露時の遺伝子発現変動解析 :

C-2-1: パラジクロロベンゼン [2 時間単回] 暴露時の「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析 :

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 2,496 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆された V P S として 397 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また神経系の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークとして、GABA 受容体 (Gabbr1、Gabbr2 及び Gabbr3) 遺伝子の増加が、24 時間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。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、サイトカイン、ケモカインに関するものは抽出されてこなかった。

他方、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 3,246 ps、このうち V S P として 19 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかったが、神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) の発現が、2 時間に指針値レベルの濃度から、また先行研

究での反復暴露（[6時間/日×7日間及び22時間/日×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、Fos、Dusp1、Nr4a1 及び Ier2 遺伝子の有意な発現減少、また Arc、Junb、Egr4 及び Klf2 遺伝子の発現減少傾向が認められた。また、これらの遺伝子の発現抑制は、その2時間後の4時間の観測時点には回復していた。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、Fos、Dusp1、Junb、Egr4 及び Ier2 遺伝子については、24 時間に認められた。この IEG の遺伝子の内、Fos 及び Dusp1 遺伝子の発現変動について図 3 に示す。

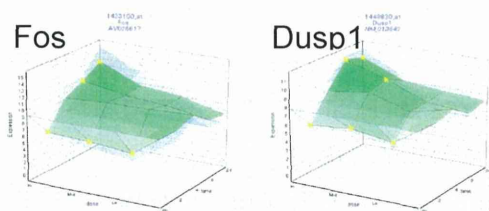


図3 パラジクロロベンゼン2時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Fos 及び Dusp1 遺伝子の発現変動

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。

IEG 遺伝子を含む発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。この内、サイトカイン、ケモカインに関するもの

として、I11β が抽出されてきた。I11β は先行研究での 6 時間/日×7 日間反復暴露の際に、肺・肝ともに増加が認められたが、2 時間単回暴露時には 3 臓器ともに、顕著な発現変動は認められなかった。

C-2-2: パラジクロロベンゼン [2 時間単回] 暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 5,520 ps、このうち V S P として 231 ps が見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tgfb1 が抽出されてきたが、Tgfb1 遺伝子の顕著な発現変動は、3 臓器に亘り、いずれの暴露プロトコルでも認められなかった。I11β は抽出されなかった。

他方、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に減少するものとして 702 ps、このうち V S P として 3 ps が見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった

C-2-3: パラジクロロベンゼン [2 時間単回] 暴露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 1,736 ps、このうち V P S として 228 ps が見いだされた。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認められなかった。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tgfb1 が抽出されてきたが、Tgfb1 遺伝子の顕著な発現変動は、3臓器に亘り、いずれの暴露プロトコルでも認められなかった。I11β は抽出されなかった。

他方、発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 776 ps、このうち V S P として 16 ps が見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワーク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

以上のパラジクロロベンゼン [2時間単回] 暴露時の海馬、肺及び肝の遺伝子発現変動解析の結果をまとめると、海馬ではキシレンの 2 時間単回暴露の際と同様に、24 時間に、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。また、神経活動の指標となる IEG の発現が、これもキシレンの 2 時間単回暴露の際と同様に、2 時間の時点で指針値レベルの濃度から、また先行研究での反復暴露 ([6 時間/日×7 日間及び 22 時間/日×7 日

間]) 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。また、これらの遺伝子の発現抑制は、その 2 時間後の 4 時間の時点には回復していた。先行研究における反復暴露の際に認められ、神経活動の活性化を示唆する IEG 遺伝子発現のリバウンド現象は、この実験では一部の IEG 遺伝子について 24 時間に認められた。*In silico* でのプロモーター解析の結果、IEG を含む発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子としてキシレンの 2 時間単回暴露の際と同様に、I11β が抽出され、I11β が海馬での神経伝達を抑制する可能性が示唆された。また少なくとも暴露開始 2 時間以内に IEG を抑制する因子が海馬に作用する可能性が示唆された。肺・肝ともに、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現時点では見いだせなかった。また肺および肝ともに、発現増加が認められた遺伝子についての、*in silico* でのプロモーター解析の結果、キシレンの 2 時間単回暴露の際に発現調節因子として抽出された I11β は抽出されてこなかった。

キシレン、パラジクロロベンゼンの両物質について、海馬における IEG 各遺伝子の発現減少の程度につき、2 時間単回暴露の場合と、6 時間/日×7 日間及び 22 時間/日×7 日間反復暴露の場合との比較したものを図 4 に示す。例としてここでは、Fos 遺伝子について示す。2 時間に IEG の発現抑制が、反復暴露の場合と同程度に認められた。

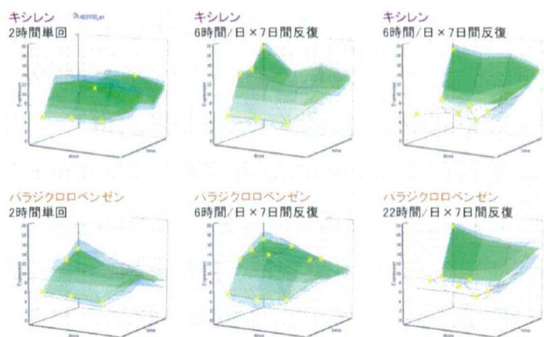


図4 Fos 遺伝子の発現状況。キシレン（上段）及びパラジクロロベンゼン（下段）について、「海馬」における IEG の内、Fos 遺伝子の発現変動を、2 時間単回暴露時の場合（左）と 6 時間/日×7 日間反復（中）及び 22 時間/日×7 日間反復暴露（右）の場合とを比較したもの

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。縦軸（発現コピー数）のスケールは同一に揃えた。

2 時間に、IEG 遺伝子は、指針値レベルの濃度から、また先行研究での反復暴露での場合と同程度に強く抑制された。

C-3: SHS 関連物質についての 6 時間/日×7 日間反復吸入暴露における I11b 遺伝子の肝・肺での比較解析:

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 (I11b) 遺伝子の発現増加が 3 物質に共通して認められたため、この分子が共通因子の候補と考えられることを報告した。

本実験において、キシレン及びパラジクロロベンゼン共に、2 時間単回暴露の際に I11b 遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。他方、両物質共に、2 時間単回吸入暴露の海馬において IEG の発現抑制が認められたことから、2 時間の時点では遺伝子発現変動を伴わずに IL1β が海馬において IEG に作用し、この発現を抑制する可能性が示唆された。

先行研究において実施した SHS 関連厚生労働省検討会 11 物質（13 物質中、気化させることが困難なフタル酸 2 物質を除く）の 6 時間/日×7 日間反復暴露実験で得た肺・肝の遺伝子発現データを参照し、ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン以外の物質についても I11b 遺伝子の発現増加が認められるか否かにつき、肺・肝について再解析した。その結果、肺ではトルエン、アセトアルデヒド以外の物質について、肝ではスチレン、アセトアルデヒド以外の物質について皆、I11b 遺伝子の発現増加が有意に認められた。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は、海馬の IEG の発現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。今後、アセトアルデヒドについて吸入暴露を実施し、この際の実験での遺伝子発現変動解析を検討予定である。

例として、ホルムアルデヒド、クロルピリホス、アセトアルデヒドについて、6時間/日×7日間反復暴露時の肺における I11b 遺伝子の発現変動について、図 5 に示す。

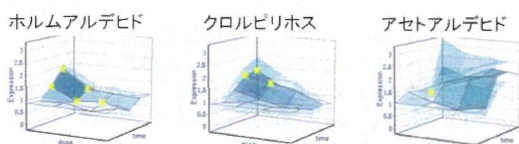


図 5 SHS 関連物質ホルムアルデヒド (左)、クロルピリホス (中)、アセトアルデヒド (右) について、6 時間/日×7 日間反復暴露時の肺における I11b 遺伝子の発現変動比較

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。縦軸 (発現コピー数) のスケールは同一に揃えた。

アセトアルデヒド以外の物質について、I11b 遺伝子の発現増加が有意に認められた。

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) があり、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。また、I11b が血液脳関門を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) は、肝・肺から放出された I11b が血液を介して海馬に影響を与える可能性を支持するものとする。

D. 結論

平成 26 年度 (今年度) 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、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、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。その結果、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 日間反復暴露とほぼ同様に、2 時間単回暴露の際でも、暴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が確認されたことから、海馬の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するが、検討会が掲げる 13 物質のうちの気化可能な 11 物質中、アセトアルデヒド以外の 10 物質について、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する。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。

また本解析により、SHS レベルの低濃度域でのキシレン 2 時間単回吸入暴露の際、肺において酸化ストレスが誘発される事が示唆された。

来年度は、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め、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。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR γ signaling is required for vertebrate axial elongation. *Development*. (2014);141(11):2260-70.

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. (2013) Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci*. 38(4):643-54.

Fujimoto, N, Takagi, A, Kanno, J. (2013) Neonatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the mRNA expression of prostatic proteins in C57BL mice. *J Toxicol Sci*. 38(2):279-83.

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

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. (2012)

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(2):373-80.

Aisaki K, Tsuboi I, Harada T, Oshima H, Yamashita A, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. (2012) Neopterin, inflammation-associated product, prolongs erythropoiesis suppression in aged SAMP1 mice due to senescent stromal-cell impairment. *Exp Biol Med (Maywood)*. 237(3):279-86.

2. 学会発表

Jun Kanno, “Taquann” Dispersion Method with Direct Injection Whole-Body Inhalation System for Engineered Nano Materials Toxicity Studies, the 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3.25) San Diego, USA, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014)(2014.9.9)Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, 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, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学—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) 東京、シンポジウム

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) 神戸、口演

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)神戸、シンポジウム

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抽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)神戸、シンポジウム

G. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予

定も含む)

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究分担者 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

研究要旨

平成 26 年度(初年度)は、吸入暴露実験に対応した情動認知行動解析系の整備を行った後、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 日間反復暴露をマウス(成熟期)に実施し、情動認知行動を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により解析した。その結果、暴露終了日に実施した際には空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められたが、暴露 3 日後に実施した際には全ての試験に有意な変化は認められなかった。この結果から、キシレンの暴露による学習記憶異常は可逆的であったが、海馬に対する有害性が実証された。

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。

本分担研究では、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、情動認知行動解析と神経科学的物証の収集による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、を目的とする。この際、脳が高感受性期に当たる可能性から子どもの特性に配慮した遅発性影響も検討する。

B. 研究方法

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:

雄マウス(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。

平成 26 年度はキシレン(244-00081、和光純薬工業)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)を検討した。尚、その前段階として吸入暴露装置と行動解析装置を可能な限り近接させることによって、行動解析時の混交要因としての移動ストレスを軽減させるため、移動式の行動解析装置を整備した(行動バッテリーユニット マウス2個体用: Mobile-M2、小原医科産業)。

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から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。

(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、所属機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守し遂行した。

C. 研究結果

吸入暴露装置に隣接した移動式行動解析装置によるマウス行動解析は、従来の結果を再現可能であり、本研究遂行に支障がないことが確認された。

吸入暴露後の行動影響解析の結果、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。

D. 考察

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では、空間-連想記憶及び音-連想記憶について有意な低下が認められ、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。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、海馬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考える。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。

E. 結論

先行研究での7日間反復暴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日間反復暴露後の情動認知行動解析を実施した結果、暴露終了日には、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められ、暴露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暴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海馬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がこの異常に対する予見性有することを確認し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、幼若期暴露の際には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ことが急務と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N, Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, Roh SG, Uchida T, Katoh K, Yoshida M, Sato E, Tanemura K. Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice. *Biol Reprod.* 2014 Aug;91(2):53.

Ohtake J, Sakurai M, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Expression of focal adhesion kinase in mouse cumulus-oocyte complexes, and effect of phosphorylation at Tyr397 on cumulus expansion. *Mol Reprod Dev.* 2015 Mar;82(3):218-31.

2. 学会発表

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.)

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