

201524007A

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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 28(2016)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-

(H27-化学-一般-001)

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 28(2016)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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

平成 28 (2016) 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
—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—

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 103

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 111

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) 137

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (別添 6) 139

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27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海馬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データと、遺伝子発現変動データの突合による、遺伝子発現情報から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幼児期暴露-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27年度は、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）及びアセトアルデヒド（指針値：0.03 ppm）について、目標通りにSHSレベル（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3及び1.0 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10及び0.3 ppm）下での2時間単回吸入暴露を実施し（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）。平成26年度実施のキシレン、パラジクロロベンゼンの場合と同様に、両物質に共通して海馬において、神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) の発現の抑制（ホルムアルデヒドでは有意ではなく抑制傾向）が、暴露2時間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。したがって、化学構造の異なる4物質に共通して、少なくとも暴露2時間以内にIEGを抑制する共通因子が海馬に影響を与える事が示唆された。平成28年度は、SHSレベルの反復吸入暴露時の、IEGの転写を調節の候補分子IL-1 β の経時的な血中濃度測定を行うとともに、検討会が掲げる物質、テトラデカン等について同様の検討を実施予定である。

加えて、平成27年度はホルムアルデヒド(0、1.0 ppm: 1.0 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のマウスに実施し（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、暴露終了日では、平成26年度実施のキシレンの場合と同様に、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められた。一方、暴露3日後での解析では、キシレンではこれらの低下は回復したが、ホルムアルデヒドでは回復が認められなかった。これらの遺伝子発現低下と情動認知行動の逸脱（異常）の発生が関連していることから、海馬に対する有害性を分子レベルで実証し、海馬での遺伝子発現変動データは上記情動認知行動の逸脱を予見することを確認したものと考える。また、ホルム

アルデヒド（平成 27 年度）について、生後 2 週齢から 3 週齢時（幼若期）に 22 時間/日×7 日間反復暴露を実施し（北嶋）、成熟後 12 週齢時に情動認知行動解析を検討した結果（種村）、平成 26 年度実施のキシレンでは音-連想記憶の低下が認められ、遅発性に情動認知行動に影響することが明らかとなり、周産期の脳発達への有害性が示唆された。ホルムアルデヒドの場合はこの遅発影響が認められなかった。ホルムアルデヒドについては、別途の実験において、マウス被毛への吸着が著しく、気流の弱い場合はほぼ完全に気中濃度がゼロになることを確認していることから、本実験で影響が見られなかった原因の一つとして吸入暴露が不十分であった可能性が考えられた。これが事実である場合、幼若期暴露方法における被毛吸着性の高いガスの実験方法に課題が残った。平成 28 年度は、ホルムアルデヒドの幼若期暴露方法の再検討を中心に、パラジクロロベンゼンについて同様な検討を実施し、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。

他方、人への外挿性の向上を目指し、正常の気道細胞に最も近いとされるヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 細胞を用い、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による IL-8 遺伝子の発現の増強作用に関連して、平成 27 年度は、IL-8 の発現増強効果が微弱ながら認められているキシレンとダイアジノンについて、polyI:C と化学物質との複合効果が IL-8 の産生以外にも認められるかについて検討した。キシレンは、炎症性疾患において単球および T 細胞の組織浸潤に関与するとされる MCP-1、及び、好酸球性炎症に関与するケモカインとして知られる RANTES の産生増強効果が微弱ではあるが認められた。ダイアジノンの場合は、複合効果は認められなかった。また、キシレン、ダイアジノン共に、高濃度添加した場合、polyI:C 刺激に関わらず、I11β 遺伝子の発現増加が認められたことから、ヒトにおいてもこの I11β を介して IEG の抑制が誘発され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。（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

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海馬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データと、遺伝子発現変動データの突合による、遺伝子発現情報から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幼児期暴露-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

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

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）、及び、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）である。

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、また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、極低濃度下で成熟期及び幼若期マウスに吸入暴露し検討した。平成27年度は、トキシコゲノミクスに向けてホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドについて、また情動認知行動解析に向けて指針値の10倍濃度のホルムアルデヒドについて、極低濃度下で成熟期及び幼若期マウスに吸入暴露し検討した。以下に実験方法の概要を示す。

トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験

12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。ホルムアルデヒド（formaldehyde；分子量：30.03、CAS No. 50-00-0）は先行研究と同じく、ホルムアルデヒド液〔ホルムアルデヒド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。アセトアルデヒド（acetaldehyde；分子量44.05、CAS No. 75-07-0、シグマアルドリッチ）も先行研究と同じものを使用した。ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ホルムアルデヒドはバブリングし気化させる方法、アセトアルデヒドはボンベガスを用いて行った。濃度検知は、捕集管を用いる方法で測定し、暴露期間中は毎日、濃度測定をおこなった。

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波面解析等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、Affymetrix社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。

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、成熟期マウスの場合、暴露終了日及び暴露3日後に、幼若期マウスの場合に成熟後（12週齢時）に、オープンフィールド試験、明暗往來試験、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。なお、幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に吸入暴露を実施する。

ヒト気道上皮細胞系を用いた *in vitro* 解析実験：吸入暴露実験との対応を取りつつ、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いる *in vitro* 暴露解析実験を実施した。「刺激物質」は、外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、自然免疫系が病原体（特にウイルス）を認識する際のレセプターの agonist として知られる Poly I:C を選択した。複合影響実験では、細胞株を 25cm² フラスコで培養し（5×10⁵ cells/flask）、90% confluent で、Poly I:C（10 μg/ml）存在下、24時間後にホルムアルデヒド（10 μM）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 及びシグナル伝達分子リン酸化検出のための western blotting に供した。培養上清に分泌される生理活性物質については、Bio-Plex サスペンションアレイシステム（BIO-RAD 社）を用い、27種類のサイトカイン等の因子を選択し、同時測定を行う。

（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の配慮を十分に行い、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。国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程（平成27年4月版）」に則って行い[動物実験承認番号：468、469及び510]、また東北大学大学院農学研究科では、「国立大学法人 東北大学環境・安全委員会 動物実験専門委員会内規」に則って行った[承認番号：2013 農動-041]。なお、結核研究所では実験動物を用いた実験を行わない。

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27年度はホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）及びアセトアルデヒド（指針値：0.03 ppm）について目標通りに極低濃度（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3及び1.0 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10及び0.3 ppm）での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）を実施しトキシコゲノミクスの為の検体を得た。加えて、ホルムアルデヒド（0、1.0 ppm）（1.0 ppmは指針値の10倍濃度）について、成熟期および幼若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。目標濃度に対しホルムアルデヒドの幼若期暴露の濃度は86.5%となったが、他はいずれの場合も、96.6～105%の濃度での暴露が実施された。

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27年度はホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドを対象とした極低濃度（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3及び1.0 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10及び0.3 ppm）2時間単回吸入暴露を実施し、平成26年度と同様に網羅的に遺伝子発現を解析した。

海馬では、キシレン、パラジクロロベンゼンの場合と同様に、ホルムアルデヒド及

びアセトアルデヒドにより IEG の発現が、2 時間の暴露直後において指針値レベルの濃度から抑制され（ホルムアルデヒドでは有意ではなく抑制傾向）、その程度は先行研究での反復暴露（7 日間）と同程度であった。これにより、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、この抑制は、2 時間後（暴露終了後 2 時間目）には回復していた。リバウンド現象は、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドともに一部の IEG 遺伝子について暴露終了 24 時間後に有意に認められた。

他方、肺における解析では、ホルムアルデヒド暴露の場合、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。アセトアルデヒド暴露の場合については、サンプリングは終了しており、今後解析する。

肝における解析では、ホルムアルデヒド暴露の場合、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として、グルタチオン代謝系が見いだされた。アセトアルデヒド暴露の場合については、サンプリングは終了しており、今後解析する。

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 27 年度はホルムアルデヒドを対象とし、極低濃度（0、1.0 ppm）（1.0 ppm は指針値の 10 倍濃度）において、平成 26 年度実施のキシレンの場合と同様に、雄性マウス（成熟期[11～12 週齢]及び幼若期[2～3 週齢]）について 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、成熟期マウスの場合、暴露終了日及び暴露 3 日後に、幼若期マウスの場合成熟後（12 週齢時）に情動認知行動解析を実施した。

成熟期マウスでは、暴露終了日に、平成 26 年度実施のキシレンの場合と同様に、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められた。一方、暴露 3 日後は、キシレンでこれらの低下は回復したのと異なり、ホルムアルデヒドでは回復が認められなかった。生後 2 週齢～3 週齢時の幼若期マウスでは成

熟後 12 週齢時に情動認知行動解析を検討した結果、平成 26 年度実施のキシレンでは音-連想記憶の低下が認められ、遅発性に情動認知行動に影響することが明らかとなり、周産期の脳の発達への有害性が示唆されたが、本年度のホルムアルデヒドについて同様の検討を行った結果、遅発影響が認められなかった。

なお成熟期暴露の場合の解析時点として、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。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。他方、暴露 3 日後を選んだ理由は、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。また幼若期マウスとして 2 週齢を選択した理由は、これも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ルでの暴露週齢である為であり、これらのデータとの比較解析が可能となるためである。

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）：

人への外挿性の向上を目指し、正常の気道細胞に最も近いとされるヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 細胞を用い、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関連して、平成 27 年度は、IL-8 の発現増強効果が微弱ながら認められているキシレンとダイアジノンについて、polyI:C と化学物質との複合効果が IL-8 の産生以外にも認められるかについて検討した。キシレンは、炎症性疾患において単球および T 細胞の組

織浸潤に関与するとされる MCP-1、及び、好酸球性炎症に関与するケモカインとして知られる RANTES の産生増強効果が、微弱ではあるが認められた。ダイアジノンの場合は、複合効果は認められなかった。また、キシレン、ダイアジノン共に、高濃度添加した場合、polyI:C 刺激に関わらず、I11 β 遺伝子の発現増加が認められた。

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海馬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、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、トキシコゲノミクスに向けて、平成26年度はキシレン及びパラジクロロベンゼンに続いて、平成27年度はホルムアルデヒドとアセトアルデヒドについて、目標通りに極低濃度での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（平成26年度）に続いて、ホルムアルデヒド（平成27年度）について、成熟期および幼若期マウスにおける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2時間単回吸入暴露により、ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン及びアセトアルデヒドの4物質に共通して、海馬において神経活動の指標となる IEG の発現が、2時間の暴露直後において指針値レベルの濃度から抑制され（ホルムアルデヒドでは有意ではなく抑制傾向）、その程度は、先行研究での反復暴露（7日間）と同程度であった。これにより、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、2時間後（暴露終了後2時間目）には回復していた。以上、少なくとも暴露2時間以内に IEG を抑制する共通因子が海馬に影響を与える事が示唆された。

アセトアルデヒドによっても IEG の発現減少が認められたことは、今までの3物質と合わせると、化学構造の異なる4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を示唆する。

先行研究では、6時間/日×7日間反復暴露の解析により、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時間目では毎日のリバウンド現象を示唆する所見を得ていたが、平成26、27年度の実験により、IEG の発現抑制は暴露2時間後でも十分に認められ、またこの場合、暴露終了2時間後（暴露開始4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、ホルムアルデヒド、パラジクロロベンゼンおよびアセトアルデヒド暴露の際の一部の IEG で暴露終了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、暴露時間に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 I11b 遺伝子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。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考えられる。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、この点、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）を見いだしており、血中の IL-1 β が海馬に影響を与え得るものと考えられる。

平成 28 年度は、この妥当性を検証するため、SHS レベルの反復吸入暴露時の IL-1 β の血液中濃度を経時的に測定する予定である。このマウス血液中の IL-1 β 濃度の増加が認められれば、人の SHS においても血液中 IL-1 β の濃度増加が認められる可能性が考えられ、この事が脳機能に影響を及ぼし、不定愁訴を誘発する可能性が考えられる。

他方、2 つ目の目的に向け平成 26 年度に実施した、情動認知行動解析では、指針値の 10 倍濃度のキシレン 22 時間/日 \times 7 日間反復暴露の暴露終了日では、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、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。一方、平成 27 年度に実施した、指針値の 10 倍濃度のホルムアルデヒド 22 時間/日 \times 7 日間反復暴露の暴露終了日の時点では、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が、この有意な低下は、暴露 3 日後での解析でも認められた。従って、ホルムアルデヒドの暴露期間中及び暴露直後では学習記憶異常を示すが、この影響はキシレンの場合とは異なり、暴露終了 3 日間では不可逆的であることが示唆された。この結果は、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を確認したものと考える。この両物質による影響の違いの理由は明らかではないが、一つの原因として、ホルムアルデヒドの体内からの消失時間が、キシレンよりも長い可能性が考えられ、このことにより、ホルムアルデヒドの場合、学習記憶異常の回復を遅らせている事が考えられた。

加えて、生後 2 週齢 \sim 3 週齢時の幼若期マウスでは成熟後 12 週齢時に情動認知行動解析を検討した結果、平成 26 年度実施のキシレンでは音-連想記憶の低下が認められ、遅発性に情動認知行動に影響することが明らかとなり、周産期の脳の発達への有害性が

示唆されたが、本年度のホルムアルデヒドについて同様の検討を行った結果、遅発影響が認められなかった。この原因の一つとして、離乳前の仔マウスが母体の被毛に鼻面を埋めていたことにより、低濃度のホルムアルデヒドの殆どが被毛に吸着してしまい、仔動物への吸入暴露が不十分であった可能性が考えられた。平成 28 年度は、ホルムアルデヒドの幼若期暴露方法の被毛吸着を考慮した再検討を中心に、パラジクロロベンゼンについて同様な検討を実施し、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。

ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の解析系では、平成 26 年度実施の高濃度のパラジクロロベンゼン適用時だけではなく、高濃度のキシレン、ダイアジノン共に、I11 β 遺伝子の発現増加が認められたことから、ヒトにおいてもこの I11 β を介して IEG の抑制が誘発される可能性が示唆された。

E. 結論

このように、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 倍濃度のホルムアルデヒド及びキシレンの 22 時間/日 \times 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、両物質共に、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が、暴露 3 日目には、ホルムアルデヒドの場合は回復しないが（不可逆的）、キシレンの場合は回復する（可逆的）ことが判明した。これらの遺伝子発現低下と情動認知行動の逸脱（異常）の発生が関連していることから、海馬に対する有害性を分子レベルで実証し、海馬での遺伝子発現変動データは上記情動認知行動の逸脱を予見することを確認したものと考える。

加えて、指針値の 10 倍濃度のキシレンの幼若期暴露の場合は、成熟期に音-連想記憶の有意な低下が認められ、遅発性に情動認知行動に影響することが明らかとなり、周産期の脳発達への有害性が示唆された。

一方、ホルムアルデヒドの幼若期暴露の場合はこの遅発影響が認められなかった。ホルムアルデヒドについては、別途の実験において、マウス被毛への吸着が著しく、気流の弱い場合はほぼ完全に気中濃度がゼロになることを確認していることから、本実験で影響が見られなかった原因の一つとして、離乳前の仔マウスが母体の被毛に鼻面を埋めていたことにより吸入暴露が不十分であった可能性が考えられた。これが事実である場合、幼若期暴露方法における被毛吸着性の高いガスの実験方法に課題が残った。平成 28 年度は、引き続き、神経科学的物証の収集を行うとともに、ホルムアルデヒドの幼若期暴露方法の再検討を中心に、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 2 時間単回吸入暴露により、キシレン、パラジクロロベンゼン、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの 4 物質に共通して海馬において、神経活動の指標となる IEG の発現の抑制（ホルムアルデヒドでは有意ではなく抑制傾向）が、暴露 2 時間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。したがって、化学構造の異なる 4 物質に共通して、少なくとも暴露 2 時間以内に IEG を抑制する共通因子が海馬に影響を与える事が示唆された。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 IL1b が海馬に働く可能性が高いものと考えているが、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。平成 28 年度は、更に 2 時間暴露時の肺及び肝の連関解析を進め、神経活動抑制の上流に位置する分子機序をより詳細に明らかにする。また、SHS レベルの反復吸入暴露時の、IEG の転写抑制の候補分子 IL-1 β の経時的な血中濃度測定を行うとともに、検討会が掲げる他の物

質、テトラデカン等について同様の検討を実施し、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）

Kanno J., Biomechanism-based innovation of toxicology by the fundamental concept of "Signal Toxicity". Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. 2015;(133):21-8. Review. Japanese.

Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. Stem Cell Reports. 2015 Dec 8;5(6):996-1009.

Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y, Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Nakae D, Hirose A, Kanno J, Tsuda H. (2015) Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. Cancer Sci;106(7):825-32.

Matsushita I, Hang NT, Hong LT, Tam DB, Lien LT, Thuong PH, Cuong VC, Hijikata M, Kobayashi N, Sakurada S, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Dynamics of immune parameters during the treatment of active tuberculosis showing negative interferon-gamma response at the time of diagnosis. Int J Infect Dis 40:39-44, 2015.

2. 学会発表（抜粋）

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun

Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015. 6. 24), Jeju, Korea

Jun Kanno, Construction of “Dynamic Biomarkers” by Percellome Toxicology based on a new Concept of “Signal Toxicity” , The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015. 6. 25) Jeju, Korea, 特別講演

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純
医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、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と遅発性中枢影響解析
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡
Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタログ化とその毒性予測利用
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 7. 1)

松下育美、土方美奈子、慶長直人
微生物関連物質曝露によるヒト気道上皮細胞の炎症応答に化学物質が与える影響について
第 34 回気道分泌研究会 (2015. 7. 11)

菅野 純、種村健太郎
ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるかー有機リン剤等暴露後の遅発性毒性の発現実験よりー
第 37 回日本中毒学会総会・学術集会 (2015. 7. 17)

慶長直人
基調講演 4 サイトカインおよび遺伝子制御系からの解析
第 22 回マクロライド新作用研究会 (2015. 7. 18)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015. 9. 15), Porto, Portugal

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, “Signal Toxicity” to study Endocrine Disruptors Issues and Children’s Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015. 10. 29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology (MycOT2015), Chulan Kuala Lumpur , Malaysia, Keynote

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015. 11. 10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium

Jun Kanno, The concept of “repeated exposure” and possible links to epigenetic regulations. -with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015. 11. 12) ECETOC Workshop “The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity” , Brusseis, Oral

Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of “signal toxicity”, (2015. 11. 12) ECETOC Workshop “The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity” , Brusseis, Oral

Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015. 12. 1), The 63rd NIBB Conference “Environment to Bioresponse”, Okazaki, Symposium

菅野 純
OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み
環境ホルモン学会第 18 回研究発表会 (2015. 12. 11)

平成27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、海馬に対し化学構造骨格の異なる3物質が共通して神経活動抑制の抑制を示唆する遺伝子発現変化を誘発した事から、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海馬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データと、遺伝子発現変動データの突合による、遺伝子発現情報からの中枢影響に関する予見性の確認、を目的とする。この際、脳が高感受性を示す子どもの特性に配慮した幼児期暴露-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27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、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）及びアセトアルデヒド（指針値：0.03 ppm）について、SHSレベル（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3、1.0 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10、0.30 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、ホルムアルデヒド（0、1.0 ppm：1.0 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、ホルムアルデヒドの目標暴露濃度（0.1、0.3及び1.0 ppm）に対して、それぞれ0.0966、0.292及び0.998 ppm、アセトアルデヒドの目標暴露濃度（0.03、0.10及び0.30 ppm）に対して、0.0311、0.105及び0.312 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、ホルムアルデヒドの目標暴露濃度（1.0 ppm）に対して、成熟期暴露では1.040 ppm（104.0%）、幼若期暴露では0.865 ppm（86.5%）と、それぞれほぼ目標暴露濃度にて、マウスに安定して吸入暴露することができた。

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、そこから得た毒性情報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海馬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データと、遺伝子発現変動データの突合による、遺伝子発現情報からの中枢影響に関する予見性の確認、を目的とする。この際、脳が高感受性期に当たる可能性から子どもの特性に配慮した幼児期暴露-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27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、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）及びアセトアルデヒド（指針値：0.03 ppm）について、SHSレベル（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3、1.0 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10、0.30 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6匹）にて、ホルムアルデヒドについてSHSレベル（0、1.0 ppm：1.0 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：ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒド（Formaldehyde；分子量：30.03、CAS No.：50-00-0）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：ホルムアルデヒド液

カタログ番号：064-00406

ロット番号：ECR1935

沸点：-19.2℃

蒸気圧：1.33 kPa（10 mmHg）（-88℃）

比重：0.815

使用した被験物質の特性は、GC/MS（日立製作所 M-80B）を用いて定性した。その結果、ホルムアルデヒドに相当するイオンピークを確認した。

B-1-2：アセトアルデヒド

アセトアルデヒド（Acetaldehyde；分子量：44.05、CAS No.：75-07-0）は、下記の試薬を

使用した。

B-1-2-1 アセトアルデヒド原液

製造元：シグマ-アルドリッチ

試薬名：アセトアルデヒド

カタログ番号：00071

ロット番号：STBD7279V

純度：99.9%

B-1-2-2 アセトアルデヒド標準ガス

製造元：高千穂化学工業株式会社

試薬名：アセトアルデヒド標準ガス

容器番号：CQB13320

ボンベ濃度：50.6ppm

標準ガス製造：B-1-2-1のアセトアルデヒド原液を用いて製造された。

容器種類、材質：47L（アルミニウム）

充填量：11.8Mpa

使用した被験物質の特性は、GC/MS（日立製作所 M-80B）を用いて定性した。その結果、アセトアルデヒドに相当するイオンピークを確認した。

B-2：吸入暴露システム

B-2-1：ホルムアルデヒド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、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）についてSHSレベル（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3、1.0 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。循環式恒温槽（5℃）中のホルムアルデヒド液入り密封容器に、清浄空気（発生空気及び搬送空気）を供給しホルムアルデヒドを気化させた。このホルムアルデヒドを含む空気を被験物質供給装置（柴田科学(株)特注）に導入し、同装置内で清浄

空気（希釈空気）と混合し、循環式恒温槽で一定温度（23℃）にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。対照群は新鮮空気の換気のみとし、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。

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（0.1 ppm暴露群、0.3 ppm暴露群、1.0 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/6NCrSlcマウス（日本エスエルシー）（2用量、6群構成、各群8匹）を用いて、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）についてSHSレベル（0、1.0 ppm）（1.0 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。ホルムアルデヒド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。発生装置内タンクに入れ25℃に加熱したホルムアルデヒド(和光純薬)に清浄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、清浄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 μ)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ホルムアルデヒド濃度への影響は認められなかった。

B-2-2: アセトアルデヒド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。

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、アセトアルデヒド(指針値:0.03 ppm)についてSHSレベル(アセトアルデヒド:0、0.03、0.10、0.30 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4に示した。アセトアルデヒド標準ガスをフローコントロールバルブと流量計を用いて圧力と流量を調整し、一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、実験を行った。

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: 吸入チャンバー内の濃度測定の方法

B-3-1: ホルムアルデヒドの濃度測定の方法

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。

B-3-1-1-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(LpDNPH S10L、カタログ番号: 505361-U、SUPELCO社製)を吸入チャンバー内に挿入し、2時間、吸入チャンバー内のホルムアルデヒドを捕集した。

B-3-1-1-B: 捕集管の前処理及び分析条件

捕集管で捕集したホルムアルデヒドは、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、ホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集管内に生成され、そのホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル(HPLC分析用 和光純薬工業株式会社)10mLによりメスフラスコに抽出し、濃度に応じて希釈調製し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)(LC-10 島津製作所)により分析を実施した。なお、HPLCの分析条件に関して、移動相組成はアセトニトリル:蒸留水=60:40、流量は1mL/min、カラムはL-column ODS(4.6mm φ×150mm、粒径:5μm (財)化学物質評価研究機構)、検出波長はUV260nm、試料注入量は10μLとした。また、検量線はホルムアルデヒドの量を換算したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの標準品ホルムアルデヒド-DNPH(カタログ番号: 4M7177 スペルコ社)を用い、0.1~10μg/mLの範囲で検量線を作成した。

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:

被験物質の捕集の部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施し、捕集管の前処理及び分析は、日本バイオアッセイ研究センターに依頼した。

ホルムアルデヒドガスの濃度検知は、チャンバー内濃度について、定流量ポンプ(MPΣ-30、MPΣ-300(柴田科学)、Photo 5)により活性炭捕

集管(ORBOTM-91;E-L、SUPELCO社)へチャンバー内空気を通し、捕集管内に充填されている活性炭にホルムアルデヒドガスを吸着させ、溶媒(二硫化炭素)で抽出し、ガスマスを用いてその濃度を測定する、「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する方法によりおこなった。捕集管内導入流量は、対照群では500mL/分[660L]、1.0ppm暴露群では100mL/分[132.0L]とした。22時間/日×7日間暴露に際し、暴露期間中の2日終了時と7日終了時に、マウスへの22時間暴露中のチャンバー内空気を捕集した捕集管を測定機関(日本バイオアッセイ研究センター)に送付し、分析を依頼した。

B-3-2: アセトアルデヒドの濃度測定の方法

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。

B-3-2-1-A: 被験物質の捕集方法

アセトアルデヒド濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定することにより算出した。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学株式会社製)を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管(LpDNPH S10L、カタログ番号: 505361-U、SUPELCO社製)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.5 L/分とした。捕集時間は暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ2時間とした。捕集管の前処理及び分析条件は、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、アセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集管内に生成され、そのアセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル(HPLC分析用 和光純薬工業株式会社)10mLによりメスフラスコに抽出し、

濃度に応じて希釈調製し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) (LC-10 島津製作所) により分析を実施した。なお、HPLCの分析条件に関して、移動相組成はアセトニトリル：蒸留水=60：40、流量は1mL/min、カラムはL-column ODS(4.6mmφ×150mm、粒径：5μm (財)化学物質評価研究機構)、検出波長はUV260nm、試料注入量は10μLとした。また、検量線はアセトアルデヒドの量を換算したアセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの標準品アセトアルデヒド-DNPH(カタログ番号：4M7340-U スペルコ社)を用い、0.1～10μg/mLの範囲で検量線を作成した。

(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、所属する研究機関の指針を遵守した。

C. 研究結果及び考察

C-1: トキシコゲノミクスのためのホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド2時間単回吸入暴露実験の場合：

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。

C-1-1:ホルムアルデヒドの場合

C-1-1-A: ホルムアルデヒドの濃度制御の方法の検討

縦層流の1060Lの中型チャンバー(毎分212Lの送気量)でマウス(系統：Crlj:CD1(ICR)・供給会社：日本チャールス・リバー(株) 厚木飼育センター・週齢：6週齢)を平置き均一配置(12匹)にした状態で、ホルムアルデヒドの暴露検討を行った。ホルムアルデヒドの発生は、循環式恒温槽(5℃)中のホルムアルデヒド液入り密封容器に、清浄空気(発生空気及び搬送空気)を供給しホルムアルデヒドを気化させた。このホルムアルデヒドを含む空気を被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)

に導入し、同装置内で清浄空気(希釈空気)と混合し、循環式恒温槽で一定温度(23℃)にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。また、チャンバー内濃度の確認は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管LpDNPH S10L(カタログ番号：505361-U スペルコ社)を吸入チャンバー内に挿入し、6時間、吸入チャンバー内のホルムアルデヒドを捕集した。捕集管で捕集したホルムアルデヒドは、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、ホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集管内に生成させた。反応・生成したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル(HPLC分析用 和光純薬工業株式会社)20mLによりメスフラスコに抽出し、濃度に応じて希釈調製し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)(LC-10 島津製作所)により分析を実施した。HPLCの分析条件は、移動相組成はアセトニトリル：蒸留水=60：40、流量は1mL/min、カラムはL-column ODS(4.6mmφ×150mm、粒径：5μm (財)化学物質評価研究機構)、検出波長はUV260nm、試料注入量は10μLとした。また、検量線はホルムアルデヒドの量を換算したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの標準品ホルムアルデヒド-DNPH(カタログ番号：4M7177 スペルコ社)を用い、0.1～10μg/mLの範囲で検量線を作成した。

その結果、動物のいない空チャンバーでホルムアルデヒドを暴露したチャンバー内のホルムアルデヒドの濃度は、設定濃度を0.1ppmとした暴露チャンバーでは0.12ppm、0.3ppm暴露チャンバーでは0.33ppm、1.0ppmチャンバーでは1.35ppmであった。

一方、動物を入れたチャンバーでホルムアルデヒドを暴露したチャンバー内のホルムアルデヒドの濃度は、0.1ppm暴露チャンバーでは0.11ppm、0.3ppm暴露チャンバーでは0.32ppm、1.0ppmチャ