

図 3A

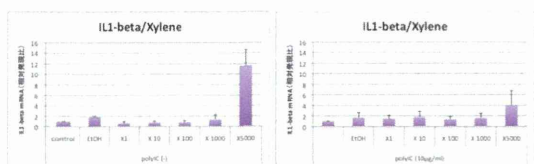


図 3B

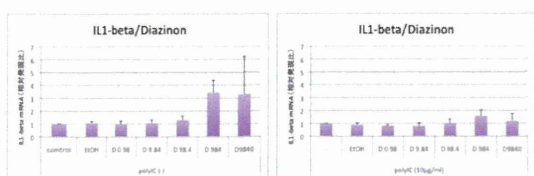


図 3 Poly I:C (10 µg/ml) 非存在(左)、存在(右)24 時間後、(A) キシレン、(B) ダイアジノン添加後3時間の IL-1β の遺伝子発現レベル

DUSP1 についても、キシレン、ダイアジノンどちらの場合も、高濃度添加した場合には、DUSP1 mRNA の発現が上昇した(図 4A、B)。

図 4A

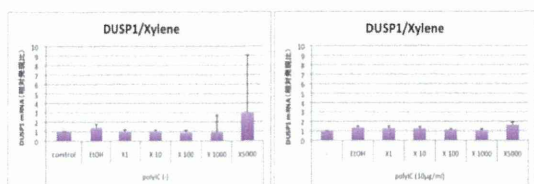


図 4B

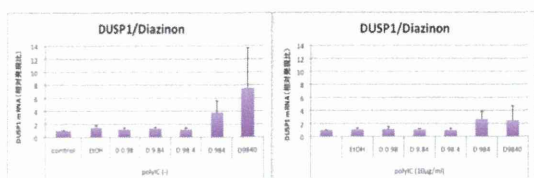


図 4 Poly I:C (10 µg/ml) 非存在(左)、存在(右)24 時間後、(A) キシレン、(B) ダイアジノン添加後3時間の DUSP1 の遺伝子発現レベル

D. 考察

これまで、ヒト気道上皮細胞株(BEAS2B 細胞)を用いた *in vitro* の炎症応答検出系を用い、シックハウス関連化学物質についてそ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てきた。

本年度検討した、IL-1β の発現量については、キシレンを高濃度添加した場合に、BEAS 細胞モデルで、IL-1β mRNA の発現が上昇し、動物モデルと同方向の発現増強傾向が認められた。

細胞内シグナル伝達系関連分子で、MAPK 活性化経路を負に調節する因子として機能する DUSP1 の発現については、動物実験系では抑制の傾向が報告されているが、細胞モデルでは、むしろ高濃度の化学物質による増強効果が認められた。

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・発症機序が異なる可能性はあるが、その中で、動物モデルでも細胞モデルでも、化学物質曝露により変動しやすい炎症関連マーカーとして、IL-1β と DUSP1 が注目された。DUSP1 については、ヒト気道上皮細胞株を用いた *in vitro* 系を用いることにより、DUSP1 の発現誘導・脱リン酸化など分子レベルの解析により、さらに詳細なメカニズムの検討も可能であると思われる。

E. 結論

シックハウス症候群の動物モデル、細胞モデル、ともに変動の認められる遺伝子として、IL-1β と DUSP1 は、今後さらに注意深く検討することが必要と思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

1. Hijikata M, Matsushita I, Hang N T L, Thuong P H, Tam D B, Maeda S, Sakurada S, Cuong V C, Lien L T, Keicho N. Influence of the polymorphism of the DUSP14 gene on the expression of immune-related genes and development of pulmonary tuberculosis. *Genes and Immunity*, in press.
2. Yatagai Y, Hirota T, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Konno S, Makita H, Nishimura M, Hijikata M, Keicho N, Homma S, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Hizawa N. Variants near the HLA complex group 22 gene (HCG22) confer increased susceptibility to late onset asthma in Japanese populations. *J Allergy Clin Immunol*, in press.
3. Nakauchi A, Wong J H, Mahasirimongkol S, Yanai H, Yuliwulandari R, Mabuchi A, Liu X, Mushiroda T, Wattanapokayakit S, Miyagawa T, Keicho N, Tokunaga K. Identification of ITPA as a susceptibility gene to young-onset Tuberculosis on Chromosome 20. *Human Genome Variation*, 2016; 3:15067.
4. Matsushita I, Hang N T, Hong L T, Tam D B, Lien L T, Thuong P H, Cuong V C, 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*, 2015;40:39-44.
5. Jeong S, Patel N, Edlund C, Hartiala J, Hazelett DJ, Itakura T, Wu P-C, Avery RL, Davis JL, Flynn HW, Lalwani G, Puliafito CA, Wafapoor H, Hijikata M,

Keicho N, Gao X, Argüeso P, Allayee H, Coetzee GA, Pletcher MT, Conti DV, Schwartz SG, Eaton AM, Fini ME. Identification of a Novel Mucin Gene HCG22 Associated with Steroid-Induced Ocular Hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:2737-48.

6. Hang NTL, Maeda S, Keicho N, Thuong PH, Endo H. Sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains and unfavorable outcomes of anti-tuberculosis treatment. *Tuberculosis* 2015;95:336-42.

1. 土方美奈子, 慶長直人. 18. 難治性気道疾患(原発性線毛機能不全・びまん性汎細気管支炎). *内科*, 2016;17:267-270.

2. 慶長直人, 土方美奈子. 抗酸菌感染症における感受性遺伝子解析. *Respiratory Medical Research*, 2016;4:41-45.

3. 慶長直人, 松下育美, 土方美奈子. I 結核菌の細菌学と感染・発病 5. 免疫と発病. *日本胸部臨床* 2015;74:S32-S9.

4. 慶長直人, 土方美奈子, 櫻田紳策, 前田伸司. 結核研究の新しい潮流—その制圧に向けて. *医学のあゆみ* 2015;253 111-6.

5. 岡慎一, 大曲貴夫, 慶長直人. 感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)10年のあゆみ ベトナム拠点:エイズ、結核、そして多剤耐性菌と戦う. *最新医学* 2015;70:716-24.

2. 学会発表

国際学会発表

1. Hijikata M, Matsushita I, Hang NTL, Thuong PH, Sakurada S, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Dual-specificity phosphatase 14 gene polymorphism in

Vietnamese patients with pulmonary tuberculosis. European Respiratory Society International Congress 2015; Amsterdam, Netherlands, September 26-30, 2015

2. Hang NTL, Maeda S, Wada T, Thuong PH, Hung NV, Cuong VC, Hoang NP, Sakurada S, Hijikata M, Matsushita I, Lien LT, Keicho N. Influence of mycobacterium tuberculosis strains on recurrence of tuberculosis in Hanoi, Vietnam. European Respiratory Society International Congress 2015; Amsterdam, Netherlands, September 26 - 30, 2015

3. Hijikata M, Matsushita I, Hang NTL, Thuong PH, Tam DB, Maeda S, Sakurada S, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Dual-specificity phosphatase 14 gene polymorphism and protection against tuberculosis. 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID); North Bethesda, MD, January 11-15, 2016

4. Hang NTL, Maeda S, Wada T, Thuong PH, Hung NV, Cuong VC, Hoang NP, Sakurada S, Hijikata M, Matsushita I, Lien LT, Keicho N. Subtypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains and recurrence of tuberculosis in Hanoi, Vietnam. 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID); North Bethesda, MD, January 11-15, 2016

国内学会発表

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; 東京, 7月11日, 2015

2. 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, 7月17日-18日, 2015

3. Chau NQ, Dinh LC, Phuong PT, Hang NTL, Thong PM, Huyen NT, Hijikata M, Matsushita I, Keicho N. Characterization of patients with sinopulmonary disease in a Vietnamese hospital. 第55回日本呼吸器学会学術講演会; 東京, 4月17-19日, 2015

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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、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・部長

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一遅発性影響も検討する。

本分担研究では第一の目的に向け、雄性マウスを対象とした SHS レベルでの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、既に取得した反復暴露データとともに、そのデータベース化を行う。

平成 27 年度（今年度）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、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）での 2 時間単回吸入暴露を実施し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。アセトアルデヒド吸入暴露時の海馬における解析は、7 日間反復暴露を含めて、はじめての解析となる。その結果、平成 26 年度実施のキシレンおよびパラジクロロベンゼンと同様に両物質に共通して、つまり 4 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。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 I11b が海馬に働く可能性が高いものと考えている。平成 28 年度は、SHS レベルの反復吸入暴露時の、IEG の転写調節の候補分子 IL-1 β の経時的な血中濃度測定を行うとともに、検討会が掲げる他の物質、テトラデカン等について同様の検討を実施予定である。

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。

本分担研究では、上記第一の目的に向け、雄性マウスを対象とした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、既に取得した反復暴露データとともに、そのデータベース化を行う今年度（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）について検討した。

B. 研究方法

Total RNA の分離精製

マウス組織を採取後すみやかにRNA later (Ambion 社)に4°Cで一晩浸漬し、RNaseを不活化する。肝は5mm径の生検トレパンにより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°Cにて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除いた後、RNeasyキット（キアゲン社）に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の10 µLを取り、DNA定量蛍光試薬Picogreenを用いてDNA含量を測定した。DNA含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合でSpike cocktail (Bacillus由来RNA 5種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOLにより水層を得、RNeasyキットを用いて全RNAを抽出した。100ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

遺伝子発現変動解析

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。

吸入暴露後、得られたマウスの海馬、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、海馬・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、Affymetrix社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。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.) を用いて行った。

吸入暴露実験

今年度 (平成 27 年度) は、ホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量: 30.03、CAS No. 50-00-0) 及び、アセトアルデヒド (acetaldehyde; 分子量 44.05、CAS No. 75-07-0) についてデータ解析を進めた。それぞれ先行研究と同じ検体を使用した (ホルムアルデヒド: 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)、アセトアルデヒド: acetaldehyde (シグマールドリッチ))。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に吸入暴露 (4 用量にて、2 時間単回暴露 (2、4、8 及び 24 時間後に観測) させた際の脳 (海馬)、肺及び肝を採取して網羅的な遺伝子発現変動を解析した。マウスへの暴露濃度を、室内濃度の指針値 (ホルムアルデヒド: 0.08 ppm)、アセトアルデヒド: 0.03 ppm) を参照し、公比 $\sqrt{10}$ でそれぞれ、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) を暴露目標値とした。

(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・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」。

C. 研究結果

以下に、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド、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 レベルでのホルムアルデヒド [2 時間単回] 暴露時の遺伝子発現変動解析:

C-1-1: ホルムアルデヒド [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:

暴露群の発現が有意に対照群に比べて増加した (t 検定での P 値 <0.05) 439 ps 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ものが 60 ps 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。発現増加が認められた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 を用いて検討した結果、サイトカイン、ケモカインに関するものを含め、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 590 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ものとして 1 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。神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) の発現は、暴露 2 時間後に指針値レベルの濃度から、いずれも有意ではないが、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傾向は、次の観測点である暴露終了 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暴露

24 時間後に有意に認められた。

C-1-2: ホルムアルデヒド [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 136 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ものとして 5 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。サイトカインとしては唯一、Cxcl12 遺伝子の (暴露 24 時間後、高用量) の発現増加が認められた。

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 215 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ものとして 1 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-1-3: ホルムアルデヒド [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 1,103 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ものとして 69 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として、グルタチオン代謝系が見いだされた。Gstm4 (暴露 24 時間後、高用量)、Gstm3 (暴露 24 時間後、高用量) および Gstm2 (暴露 24 時間後、高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。

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 687 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ものとして 1 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: SHS レベルでのアセトアルデヒド [2 時間単回] 暴露時の遺伝子発現変動解析:

C-2-1: アセトアルデヒド [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 961 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ものとして 35 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。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) IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、サイトカイン、ケモカインに関するものを含め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 485 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ものとして 1 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。

神経活動の指標となる IEG の発現は、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1 および Junb 遺伝子について、暴露 2 時間後に指針値レベルの濃度から、有意な発現減少が認められた。また、これらの遺伝子の発現抑制傾向は、次の観測点である暴露終了 2 時間後には回復していたが、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暴露 24 時間後に有意に認められた。

C-2-2: アセトアルデヒド [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:

サンプリングは終了しており、今後解析する。

C-2-3: アセトアルデヒド [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:

サンプリングは終了しており、今後解析する。

D. 考察

以上の通り、SHS レベルの極低濃度の 2 時間単回吸入暴露により、平成 26 年度実施のキシレン、パラジクロロベンゼン及び平成 27 年度実施のホルムアルデヒド、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、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、その後の観測点である暴露終了 2 時間後には回復していた。したがって、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。海馬における IEG の発現減少は、化学構造の異なる 4 物質に共通して認められ、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。平成 26、27 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、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。先行研究では、キシレンにおいても 6 時間/日×7 日間反復暴露の際に、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。この事から、IEG のリバウンド現象は、4 物質いずれにも認められるものの、物質と暴露時間に依存する事が示唆された。

この IEG の遺伝子の内、Arc 及び Dusp1 遺伝子の発現変動について図 1 に示す。図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。具体的には、縦軸(Z 軸)に絶対値化した (細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面 (薄い色) を示す。

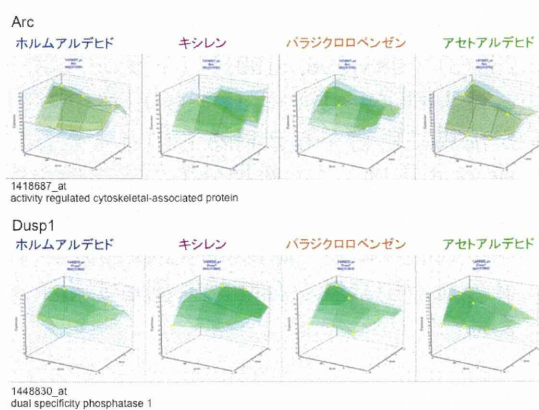


図 1 ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼンおよびアセトアルデヒド 2 時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Arc (上段) 及び Dusp1 (下段) 遺伝子の発現変動

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。

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 I11b 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、この候補分子の妥当性を検証するため、SHS レベルの反復吸入暴露時の、IEG の転写を調節し得る候補分子 IL-1 β の血液中濃度を経時的に測定する予定である。

E. 結論

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) 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 I11b 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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)

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)

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)

種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白形芳
樹、原健士朗、北嶋聡、菅野純
幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬
投与による神経行動毒性発現
第 18 回環境ホルモン学会(2015.12.)

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

分担研究報告書

分担研究課題： 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

本分担研究は、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。

平成 26 年度（昨年度）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。加えて、生後 2 週齢から 3 週齢時（幼若期）にキシレン(0、2.0 ppm)について 22 時間/日×7 日間反復暴露を実施し、成熟後 12 週齢時に情動認知行動解析を検討した結果、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、生後脳発達への有害性が示唆された。

平成 27 年度（今年度）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、情動認知行動を 3 種類の試験により解析した結果、暴露終了日では、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、キシレンの場合に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。以上の事は、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。加えて、生後 2 週齢から 3 週齢時（幼若期）にホルムアルデヒド(0、1.0 ppm)について 22 時間/日×7 日間反復暴露を実施し、成熟後 12 週齢時に情動認知行動解析を検討した結果、遅発影響が認められず、この原因として吸入暴露が不十分であった事が考えられ、幼若期暴露方法における課題が残った。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、検討会が掲げる物質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。

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。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」の原因説明の手がかりとなる可能性が示された。

本分担研究では、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。

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は、暴露終了日及び暴露3日後に、幼若期マウスの場合は成熟後（12週齢時）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。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

平成27年度は、ホルムアルデヒド [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）を対象とし、極低濃度下（0、1.0 ppm）（1.0 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

平成27年度はホルムアルデヒドを対象と

し、極低濃度下（0、1.0 ppm）（1.0 ppmは指針値の10倍濃度）、キシレンの場合と同様に、雄性マウス（成熟期[11週齢]及び幼若期[2週齢]）について22時間/日×7日間反復暴露を実施し、情動認知行動解析を検討した。成熟期暴露の場合の解析の結果、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、この有意な低下は、暴露3日後での解析でも認められた。加えて、幼若期暴露後、成熟期での解析の結果、対照群と比較し有意な低下は認められなかった。

D. 考察

以上の通り、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、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。解析の結果、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倍濃度のホルムアルデヒド22時間/日×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。またこの事は、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する。

加えて、生後2週齢から3週齢時（幼若期）に、指針値の10倍濃度のホルムアルデヒド22時間/日×7日間反復暴露を実施し、成熟後12週齢時に情動認知行動解析を検討した結果、対照群と比較し有意な変化は認

められなかった。この点、ホルムアルデヒドを成熟期マウスに暴露した際の解析では、暴露終了3日後でも学習記憶異常が認められている事、またキシレン幼若期暴露後の成熟期マウスでの解析では不可逆的に情動認知行動異常が認められている事を考慮すると、ホルムアルデヒド幼若期暴露後、成熟期に情動認知行動異常が認められる可能性が非常に高く、これが認められなかった原因として、ホルムアルデヒドの吸入暴露が不十分であった事が考えられ、幼若期暴露方法における課題が残った。

成熟期マウス(11週齢)は吸入暴露の際、吸入暴露用金網ケージに個別飼いで実施しているが、幼若期マウス(2週齢)の場合は、授乳期であるため、金網ケージに、母マウスと共に児マウスを群飼いで実施している。したがって成熟期の場合と異なり、幼若期暴露の場合、この群飼いでより空気の攪拌が不十分となり、ホルムアルデヒドが十分に児マウスに到達しなかった可能性が考えられた。したがって、キシレンの幼若期暴露の場合でも、情動認知行動異常が認められたとはいえ、児マウスへの暴露が不十分であった可能性が考えられた。

そこで平成28年度は、幼若期マウスを個別飼いで吸入暴露を実施できる週齢を検討し(3~4週齢)、あらためてホルムアルデヒド及びキシレンについて幼若期暴露を実施し成熟後の情動認知行動解析を実施するとともに、パラジクロロベンゼンについても同様の検討を実施し、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。

予備検討として、吸入チャンバー内にて、2.5、3あるいは4週齢で金網ケージでの個別飼育を検討したところ、餌、水の摂取は認められるものの、3日後には著しい体重減少が認められた。この原因として、この時期の児マウスでは体温調節機能が不十分である可能性が考えられた。そこで今後、実績のある2週齢時に吸入チャンバー内で、金網ケージ中で母マウスと1週間同居させ、馴化後、3あるいは4週齢で、個別飼育あるいは群飼いで飼育をおこない、体重変化をモニターすることにより、適切な暴露条件

を設定する。また、この幼若期暴露の週齢変更により、情動認知行動解析の背景データとの比較ができなくなることから、並行し、陽性対象物質(幼若期暴露後、成熟期に情動認知行動影響が認められるが、成熟期暴露の際は、この影響が認められない物質)での検討も並行する

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(平成27年度)及びキシレン(平成26年度)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、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る。

加えて、指針値の10倍濃度のキシレン(平成26年度)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、脳発達への有害影響が認められた。この事から、SHSレベルの吸入暴露であっても、SHS関連物質暴露による子どもの脳発達への影響が懸念された。一方、ホルムアルデヒド(平成27年度)の幼若期暴露の場合は遅発影響が認められず、この原因として吸入暴露が不十分であった事が考えられ、幼若期暴露方法における課題が残った。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表 (抜粋)

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、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曝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)

種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白形芳樹、原健士朗、北嶋聡、菅野純
幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬投与による神経行動毒性発現
第 18 回環境ホルモン学会 (2015. 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

平成27年度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)

分担研究課題

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

本分担研究の目的

中枢に対する有害性の実証と、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:

⇒ 情動認知行動解析の実施と神経科学的物証の収集

平成26年度の対象物質：キシレン

平成27年度の対象物質：ホルムアルデヒド

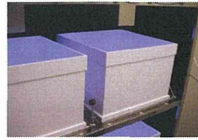
22時間/日×7日間反復暴露実験(SHSレベル):ホルムアルデヒド

→ 情動認知行動解析 (成熟期暴露と幼若期暴露の2種)

#成熟期暴露: 暴露当日影響と3日後影響の2種

情動認知行動解析

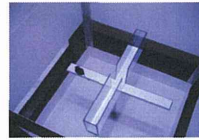
情動行動 状況に対応して急激に生じる行動変化



オープンフィールド試験



明暗往来試験



高架式十字迷路試験

認知行動-学習記憶

経験によって蓄積された意識の再生



条件付け学習記憶試験

認知行動-情報処理

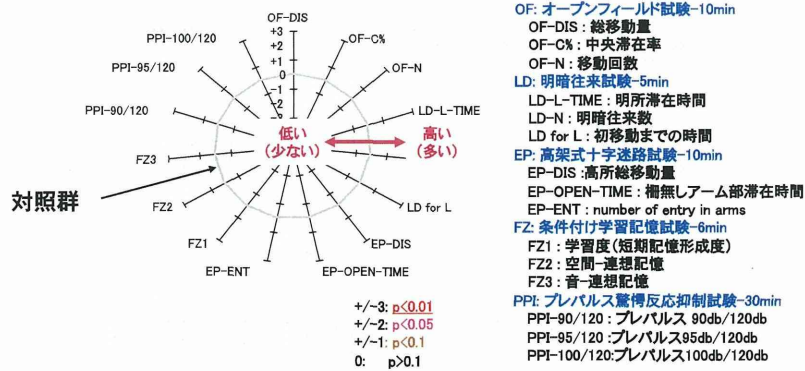
情報の受理・整理・対応



プレパルス驚愕反応抑制試験

3

【行動の逸脱レベルを示すレーダー図】



オープンフィールド試験



明暗往来試験



高架式十字迷路試験



条件付け学習記憶試験

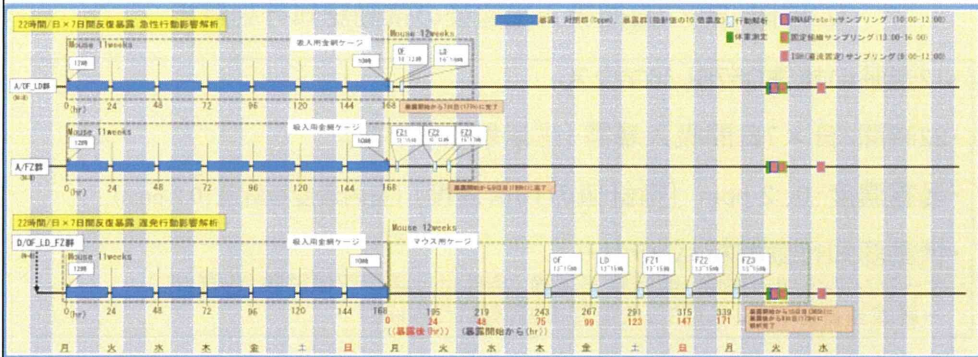


プレパルス驚愕反応抑制試験

4

成熟期吸入暴露後、成熟期での情動認知行動解析：タイムスケジュール

暴露当日影響と3日後影響の2種類を検討

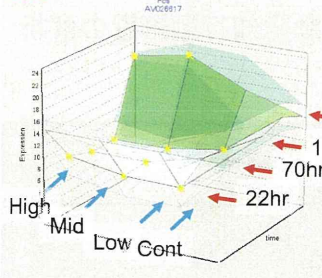


照明周期

PM8:00 AM8:00
(約50lux)

略号	試験名	測定項目	試験に要する時間
OF	Open field test	新奇環境-活動性	N=8, 2群(16匹)で120分
LD	Light / Dark transition test	不安関連行動	N=8, 2群(16匹)で60分
FZ1	Fear conditioning: Conditioning	トレーニング/短期学習	N=8, 2群(16匹)で70分
FZ2	Fear conditioning: Contextual test	空間記憶	N=8, 2群(16匹)で70分
FZ3	Fear conditioning: Cued test	音-連想記憶	N=8, 2群(16匹)で70分

Fos



暴露当日を選択した理由

22時間/日×7日間反復暴露実験 = 生活暴露モデル

190hr → 暴露24時間後

166hr

70hr

22hr

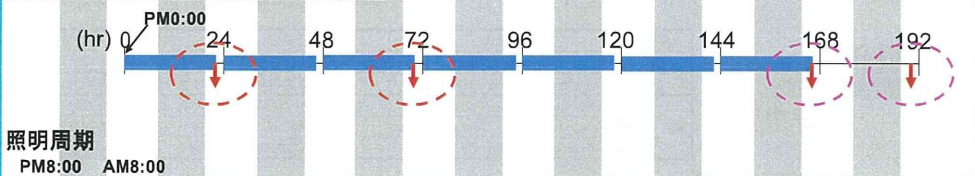
22時間暴露直後

理想：吸入暴露しながら情動認知行動解析

→ 技術的に無理 → 暴露終了日における解析(急性影響)

吸入暴露プロトコール

22時間/日×7日間反復暴露実験



照明周期

PM8:00 AM8:00

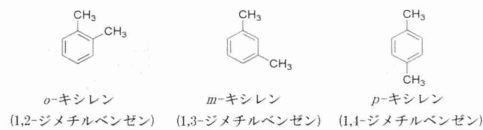
暴露 22、70、166、190時間後に観測 [時刻：10時、10時、10時、10時]

平成26年度研究：キシレンの場合

キシレンについて指針値付近の極低濃度下での
22時間/日×7日間吸入暴露後の情動認知行動解析

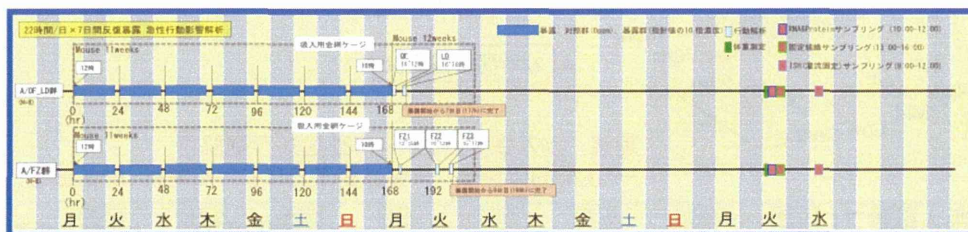
- 12週齢の雄性C57BL/6マウス
- 22時間/日×7日間吸入暴露 [生活暴露モデル]
- 暴露濃度：0、2 ppm [指針値の10倍濃度] (室内濃度指針値：0.2 ppm)
- 情動認知行動解析バッテリー：
オープンフィールド試験、明暗往來試験、条件付け学習記憶試験 (各群8匹)
→ 暴露当日影響と、暴露3日後影響の2種類につき検討

キシレン(異性体混合物)



平成26年度研究：キシレンの場合

成熟期でのキシレン吸入暴露による暴露当日の情動認知行動影響の解析：
タイムスケジュール



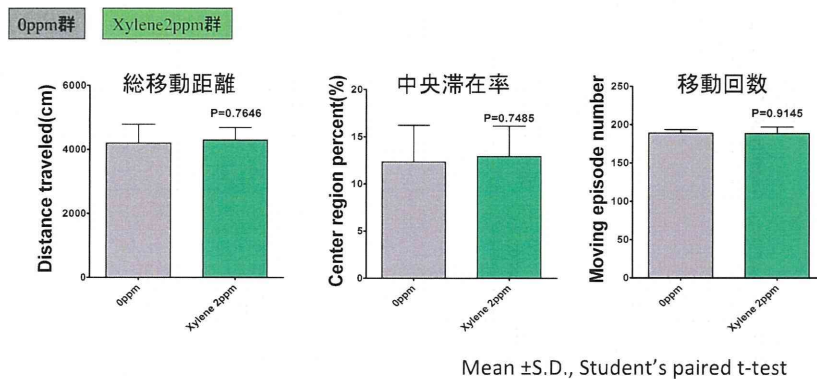
照明周期

PM8:00 AM8:00
(約50lux)

略号	試験名	測定項目	試験に要する時間
OF	Open field test	新奇環境-活動性	N=8, 2群(16匹)で120分
LD	Light / Dark transition test	不安関連行動	N=8, 2群(16匹)で60分
FZ1	Fear conditioning: Conditioning	トレーニング/短期学習	N=8, 2群(16匹)で70分
FZ FZ2	Fear conditioning: Contextual test	空間記憶	N=8, 2群(16匹)で70分
FZ3	Fear conditioning: Cued test	音-連想記憶	N=8, 2群(16匹)で70分

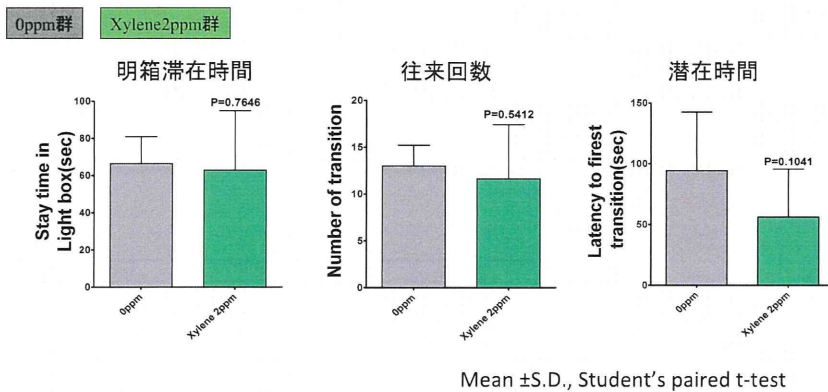
平成26年度研究：キシレンの場合

成熟期 22時間/日×7日間 キシレン 2 ppm吸入暴露直後(0時間)の
オープンフィールド試験結果



平成26年度研究：キシレンの場合

成熟期 22時間/日×7日間 キシレン 2 ppm吸入暴露6時間後の
明暗往来試験結果

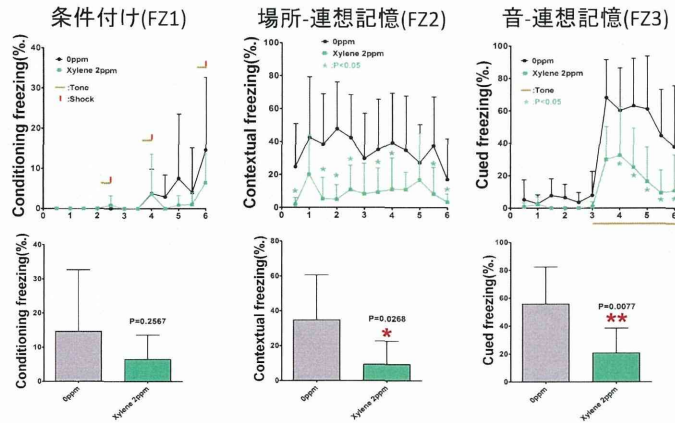


平成26年度研究：キシレンの場合

成熟期 22時間/日×7日間 キシレン 2 ppm吸入暴露3時間後に条件付け(FZ1)を実施し、その翌日に、場所-連想記憶試験(FZ2)と音連想記憶試験(FZ3)を実施した結果

0ppm群

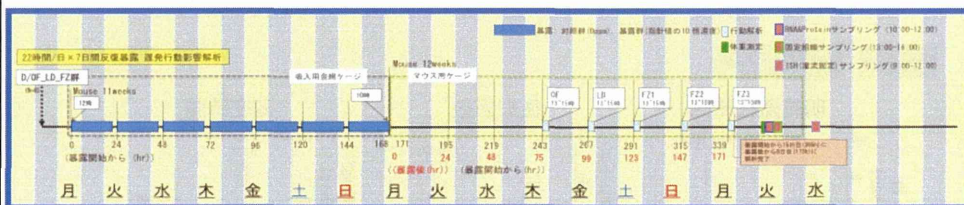
Xylene2ppm群



Mean ± S.D., Student's paired t-test

平成26年度研究：キシレンの場合

成熟期 キシレン吸入暴露による暴露3日後の情動認知行動影響の解析：
タイムスケジュール



照明周期

PM8:00 AM8:00
(約50lux)

略号	試験名	測定項目	試験に要する時間
OF	Open field test	新奇環境-活動性	N=8, 2群(16匹)で120分
LD	Light / Dark transition test	不安関連行動	N=8, 2群(16匹)で60分
FZ1	Fear conditioning: Conditioning	トレーニング/短期学習	N=8, 2群(16匹)で70分
FZ2	Fear conditioning: Contextual test	空間記憶	N=8, 2群(16匹)で70分
FZ3	Fear conditioning: Cued test	音-連想記憶	N=8, 2群(16匹)で70分