

別添 3

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28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（SH）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、先行研究では平成14年「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SH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、SH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、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28年度は、テトラデカン（指針値：0.04 ppm）について、目標通りにSHレベル（0、0.04、0.12及び0.40 ppm）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）。テトラデカン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。平成26年度実施のキシレンと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とアセトアルデヒドとあわせ計5物質に共通して、テトラデカンにより海馬において、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5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。検出されるIEG抑制の機序として、肺或いは肝から二次的シグナルとしてIL-1が海馬に働く可能性が高いものと考えている。その理由は、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、Il1b遺伝子の発現増加が、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）に共通して認められたためである。この3物質に加え、新たにテトラデカン（指針値：0.04 ppm）及びアセトアルデヒド（指針値：0.03 ppm）についてSHレベル（テトラデカン：0、0.04、0.12及び0.40 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10、0.30 ppm）での6時間/日×7日間反復暴露時の肺について解析したところ、Il1b遺伝子の有意なIl1b遺伝子の有意な発現増加を見だし、この事は、IL-1が海馬に働く可能性を強く支持するものと考えられる。SHレベル(0、1.0 ppm: 1.0 ppmは指針値の10倍濃度)でのホルムアルデヒド7日間反復暴露期間中のIL-1の血液中濃度測定を検討したが（北嶋）現行法では検出限界（1.03 pg/mL）以下であったため、今後、より感度のよい測定法を検討する。

また、ホルムアルデヒドについては平成27年度、キシレンの場合と異なり、幼若期暴露の際に情動認知行動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、遅発影響が見られなかった原因として、母動物の被毛に吸着され、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、幼若動物に吸入されなかった可能性が考えられた。そこで離乳後（4週齢）の個別飼いによる、SHレベル(0、1.0 ppm: 1.0 ppmは指針値の10倍濃度)でのホルムアルデヒド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が（種村）遅発影響は認められず、この理由として、幼若期影響として検討するには4週齢では遅すぎる事が考えられた。

他方、ヒト気道上皮細胞株を用いるin vitro解析系において、現行のBEAS2B細胞より、炎症応答が正常細胞により近いといわれるHBE1細胞においても、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を確認できた（慶長）。

本研究の成果として、新規物質について、それらがSHの原因物質として問題となった際に、少なくとも平成14年度の検討会が掲げる化学物質（ガス体11種）との生体影響の異同は、網羅的な遺伝子発現解析により高精度に判定可能となった。今後は、SHが疑われる物質に本手法を適用し、肺、肝、海馬の毒性連関性を検討するとともに、情動認知行動異常の分子機序に関わる共通因子の追加探索を行うことで、予測性の分子基盤を堅固なものとする。

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
客員研究員
種村健太郎 東北大学大学院 農学研究科
動物生殖科学分野 教授

A. 研究目的

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群（SH）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、先行研究では平成14年「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SH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、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、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。

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SHレベルの暴露の有

害性を、規制に向けて検証することが困難であった。その様な極低濃度での有害性の検証を可能とするために、本研究が提示する試験系の整備が必要である。本研究では、人の「不定愁訴」に当たる脳機能所見が規制決定の毒性情報として採用されるための、バリデーションに耐える新評価体系を提案する。また、肺・肝影響との関連性を明らかにする。これにより、急増中の新規物質について、SH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SH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、SH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、SH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 28 年度は、トキシコゲノミクスに向けてテトラデカンについて、また情動認知行動解析についてはホルムアルデヒドの幼若期暴露方法の再検討をおこない、離乳後(4 週齢)の個別飼いで検討を実施中である。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。テトラデカン(tetradecane; 分子量 198.4、CAS No. 629-59-4、和光純薬工業)は、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、テトラデカンはバブリングし気化させる方法を用いて行った。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 日間反復吸入暴露(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([2 週齢])マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に群飼いにし吸入暴露を実施する。ただし、ホルムアルデヒドの幼若期吸入暴露の際、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。すなわち母マウス同居下の群飼いにし、ホルムアルデヒドが被毛などに吸着してしまったことが考えられた。そこで、母マウスとの同居が不要で、個別飼いが可能となる条件下、できるだけ若齢である 4 週齢の雄性マウスを用いた検討(個別飼育)も実施する。

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 に加えて、ヒト気道上皮細胞株の中でも特に IL-17 の発現応答性が良いと言われる株化細胞 HBE1 を浜松医科大学第二内科、藤澤朋幸先生より供与を受けて実験に用い、*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 (Sigma-Aldrich: P9582) 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: Bio-Plex200)を用い、27 種類のサイトカイン等の生理活性物質(IL-1, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7,

IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF) を選択、同時測定を行う(27-plex Group 、Bio-Rad : M50-OKCAFOY)。

IL-1 の経時的な血中濃度測定 : ホルムアルデヒドについて、SHレベルの22時間/日×7日間反復吸入暴露(2用量[指針値の10倍濃度の1 ppm、及び0 ppm]、4時点、各群4匹)の際に、心臓採血により得た血清について、IEGの転写を調節し得る候補分子であるIL-1のELISA法による測定をRayBiotech社に委託し実施した(抗マウスIL-1抗体はELM-IL1b(RayBiotech社)を使用)。採血の4時点は、22時間/日×7日間反復吸入暴露の際の組織サンプル採取のタイミングと同じく、暴露22、70、166及び190時間後であり、暴露190時間後は、暴露休止24時間後にあたる。

(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

C-1 : SHレベルの極低濃度吸入暴露実験の実施(北嶋):

平成28年度はテトラデカン(指針値:0.04 ppm)について目標通りに極低濃度下(0、0.04、0.12及び0.40 ppm)でのトキシコゲノミクスの為のマウス2時間単回吸入暴露実験(4用量、16群構成、各群3匹)を実施した。また、ホルムアルデヒド(指針値:0.08 ppm)について、目標通りに極低濃度下(0、1 ppm)でのIL-1の経時的な血中濃度測定のために、22時間/日×7日間反復暴露(2用量、8群構成、各群4匹)を実施した。加えて、ホルムアルデヒドについて、目標通りに極低濃度下(0、1.0 ppm)での幼若期暴露方法の再検討に向けた離乳後(4週齢)の個別飼いによ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、2群構成、各群8匹)を実施し

た。テトラデカンについては、98.8～102.5%の濃度で暴露でき、ホルムアルデヒドについては、目標濃度に対し97.5～118.3%の濃度で暴露できた。

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28年度は、テトラデカン(指針値:0.04 ppm)を対象とし、雄性マウスに極低濃度下(0、0.04、0.12及び0.40 ppm)2時間単回吸入暴露(4用量、各群3匹、[暴露2、4、8、24時間後に観測])を実施し、平成26、27年度と同様に、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につき解析した。

海馬では、平成26年度実施のキシレンと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とアセトアルデヒドとあわせ計5物質に共通して、テトラデカンにより、神経活動の指標となるImmediate early gene (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、一部のIEG遺伝子(Arc、Dusp1、Nr4a1およびIer2遺伝子)について暴露終了24時間後に有意に認められた。したがって、化学構造の異なる5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を示唆する遺伝子発現変化を誘発したことを示唆する。

本研究の成果として、急増中の新規物質について、それらがSHの原因物質として問題となった際に、少なくとも、平成14年の検討会が掲げる化学物質(ガス体11種)との生体影響の異同は、網羅的な遺伝子発現解析により高精度に判定可能となったものと考えられる。

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 IL-1 が海馬に働く可能性が高いものと考えているが、その理由は、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 (IL1b) 遺伝子の発現増加が、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) に共通して認められたためである。この点、3 物質に加え、新たにテトラデカン (指針値: 0.04 ppm) 及びアセトアルデヒド (指針値: 0.03 ppm) について SH レベル (テトラデカン: 0、0.04、0.12 及び 0.40 ppm、アセトアルデヒド: 0、0.03、0.10、0.30 ppm) での 6 時間/日×7 日間反復暴露時の肺について解析したところ、IL1b 遺伝子の有意な発現増加を見いだした。

今後は、SH が疑われる物質に本手法を適用し、肺、肝、海馬の毒性連関性を検討するとともに、情動認知行動異常の分子機序に関わる共通因子の追加探索を行う。

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 (0、1.0 ppm: 1.0 ppm は指針値の約 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、暴露終了日には、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。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。

そこで平成 28 年度はまず、ホルムアルデヒドの幼若期暴露方法の再検討をおこない、個別飼いで吸入暴露を実施できる、できるだけ若齢の週齢を検討したところ、一般

状態の変化や体重減少が認められない 4 週齢 (28 日齢) を選択し、離乳後 (4 週齢) の個別飼いで検討を実施した。具体的にはホルムアルデヒドについて極低濃度下 (0、1.0 ppm) (1.0 ppm は指針値の 10 倍濃度) 雄性マウス ([4 週齢]) について 22 時間/日×7 日間反復吸入暴露実験 (2 用量、2 群構成、各群 8 匹) を実施し、成熟後 ([12 週齢]) の解析を検討したが、遅発影響は認められなかった。

C-4 : 人への外挿にかかわる臨床的解析、及びヒト気道上皮細胞系による毒性応答メカニズムの研究 (慶長):

平成 28 年度はヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* 解析系において、現行の BEAS2B 細胞より、炎症応答が正常細胞により近いといわれる HBE1 細胞においても、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を確認でき、キシレンを高濃度添加した場合、polyI:C 刺激に関わらず、IL1 遺伝子の発現増加が認められた。

C-5 : IL-1 の経時的な血中濃度測定 (北嶋):

SH レベルの吸入暴露期間中の、IEG の転写を調節し得る候補分子である IL-1 の血液中濃度測定を検討する為に、ホルムアルデヒドについて極低濃度下 (0、1.0 ppm)、22 時間/日×7 日間反復暴露 (2 用量、8 群、各群 4 匹) の際に、経時的 (4 時点) に心臓採血により得た血清について、ELISA 法による測定したところ、対照群、暴露群共に全てのサンプルについて検出限界 (1.03 pg/mL) 以下の濃度であった。

D . 考察

以上の通り、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、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、以上 2

つの目的につき検討した。

一つ目の目的の為に実施した遺伝子発現変動解析では、SH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、アセトアルデヒド及びテトラデカンの5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、また先行研究での反復暴露(7日間)での場合と同程度に強く抑制され、海馬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。

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・肺の関連解析において、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IL-1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。3物質に加え、新たにテトラデカン及びアセトアルデヒドについてSHレベルでの6時間/日×7日間反復暴露時の肺について解析したところ、I11b遺伝子の有意な発現増加を見だし、この事は、IL-1が海馬に働く可能性を強く支持するものと考えられる。

なおIL-1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、IL-1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、SH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の血液中濃度を経時的に測定したが、対照群、暴露群共に全てのサンプルについて検出限界以下の濃度(1.03 pg/mL)であったため、今後、IL-1を濃縮する等、より感度の良い他の測定法を検討する。

他方、2つ目の目的に向け実施した、情動認知行動解析については、ホルムアルデヒド幼若期暴露の際、情動認知行動異常が誘発されなかった。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、哺乳動物であるため、本実験では金網ケージに、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、離乳後(4週齢)の個別飼いで検討を実施し、SHレベル(0、1.0 ppm: 1.0 ppmは指針値の10倍濃度)でのホルムアルデヒド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が、遅発影響は認められず、この理由として、幼若期影

響として検討するには 4 週齢では遅すぎる事が考えられた。

ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の解析系では、平成 28 年度は、BEAS2B 細胞より、さらに炎症応答が正常細胞に近いと最近になって報告された、ヒト気道上皮系の細胞株 HBE1 細胞を用いて、発現増強作用及び IL-1 遺伝子の発現変動についての検討し、先行研究で見いだした微生物関連物質 (polyl:C) とホルムアルデヒドとの IL-8 遺伝子の発現増強作用を確認でき、ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* 解析系の実用性が示され、肺を仲介した影響を含む人への外挿性の向上を計ることが可能となった。キシレンを高濃度添加した場合、polyl:C 刺激に関わらず、IL-1 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 IL-1 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

昨年度の研究により、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、脳発達への有害影響が認められた。このことから、SH レベルの吸入暴露であっても、SH 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。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、離乳後 (4 週齢) の個別飼いで検討を実施したが、遅発影響は認められなかった。この理由として、幼若期影響として検討するには 4 週齢では遅すぎる事が考えられた。

また、SH 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、アセトアルデヒド及びテトラデカンの 5 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 5 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 IL-1b 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。また、肝および肺に対しての毒性を示唆する遺伝子発現変動が明らかとならないレベルの濃度曝露が、肝あるいは肺からのシグナル分子の放出を惹起し遠隔に位置する海馬の機能に影響を与える「シグナルを介した毒性」が捉えられたものと考察する。ホルムアルデヒドについて極低濃度下、7 日間反復吸入暴露期間中の、IEG の転写を調節し得る候補分子である IL-1 の血液中濃度測定を検討したが、現行法では検出限界以下であったため、今後、より感度のよい測定法を検討する。

本研究の成果として、新規物質が、SH の原因物質として問題となった際に、少なくとも平成 14 年度の検討会が掲げる化学物質 (ガス体 11 種) との異同は、網羅的な遺伝子発現解析により高精度に判定可能となった。今後は、SH が疑われるガス状物質に本手法を適用し、肺、肝、海馬の毒性関連性を検討するとともに、情動認知行動異常の分子機序に関わる共通因子の追加探索を行うことで、予測性の分子基盤を堅固なものとする。

F. 研究発表

1 . 論文発表 (抜粋)

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and memory deficits in male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. *Front Neurosci* 10: 339- ,2016.

Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K., The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Mol Cell* 64(2): 251-266, 2016.

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H., Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci* 107(7): 924-935, 2016.

Hijikata M, Matsushita I, Hang NTL, Thuong PH, Tam DB, Maeda S, Sakurada S, Cuong VC, Lien LT, 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* 17: 207-212, 2016.

Ohtani N, Iwano H, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Adverse effects of maternal exposure to bisphenol F on the anxiety- and depression-like behavior of offspring. *J Vet Med Sci*. 2016 Dec 25. doi: 10.1292/jvms.16-0502. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28025458.

Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. *PLoS One*. 2016 Nov 23;11(11):e0167127. doi: 10.1371/journal.pone.0167127. PubMed PMID: 27880848; PubMed Central PMCID: PMC5120852.

2. 学会発表 (抜粋)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity. 第43回日本毒性学会学術年会(2016.6.29)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress

of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016.10.3), Merida, Mexico

Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study, Society of Toxicology 55th Annual Meeting (2016.3.16), New Orleans, USA.

菅野 純

Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems biology. 第105回日本病理学会総会(2016.5.13)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Projectの進捗 - 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 - 第43回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study. The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016.9.6), Seville, Spain.

Jun Kanno, Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology.

第14回国際毒性学会(ICT2016)(2016.10.3), Merida, Mexico

Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health. the 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016.11.29), Seoul, Korea,

土方美奈子、松下育美、慶長直人

次世代シーケンサーを用いた結核患者全血中マイクロRNAの網羅解析 第91回日本結核病学会総会(2016.5.26-27.)

Kentaro Tanemura, Late effects on CNS with behavioral disturbance induced by early exposure of environmental chemicals. *Neuro* 2016 (2016.7.), Kanagawa

Kentaro Tanemura and Jun Kanno,
Neurobehavioral toxicity at adult period
Induced by pesticide exposure at juvenile
period. 14th International Congress of
Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016.10.5),
Merida, Mexico

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純
キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行
動影響解析
第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30)

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純
キシレン吸入暴露によるマウスへの中枢機
能影響解析
第 159 回日本獣医学会学術集会(2016.9.)

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