

別添 3

## 要約

化学物質の極低濃度暴露による生体影響検出の技術開発を目的として、生活環境中の濃度に即した極低濃度のアセトアルデヒドを C57BL/6J 雄マウスに 6 時間/日、7 日間全身暴露（経気道投与）し、遺伝子発現解析用の肝、肺及び脳の組織を採取した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群 12 匹、合計 48 匹のマウスを用いた。暴露濃度は、0.03、0.10 及び 0.30 ppm とした。対照群は清浄空気による換気のみとした。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着 - 溶媒抽出法により測定した。1 回目暴露終了時、並びに暴露開始後 1 日目、3 日目及び 7 日目に各群 3 匹の動物を解剖し、肝、肺及び脳から遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルを採取するとともに、病理組織学的検査用サンプルを採取した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標暴露濃度 0.03、0.10 及び 0.30 ppm に対し、測定値の平均 ± 標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ  $0.0306 \pm 0.001$  ppm（0.0290 ppm～0.0318 ppm）、 $0.102 \pm 0.002$  ppm（0.100 ppm～0.107 ppm）及び  $0.303 \pm 0.004$  ppm（0.298 ppm～0.309 ppm）であった。

剖検と病理組織学的検査では、全動物とも肝、肺及び脳に特記すべき所見を認めなかった。遺伝子発現解析のための RNA 用サンプルは試験委託者に送付した。

## 1. 試験材料

## 1 - 1 被験物質の性状等

## 1 - 1 - 1 名称等

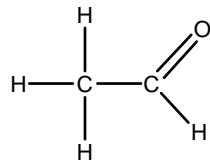
名 称 : アセトアルデヒド

別 名 : 酢酸アルデヒド

CAS No. : 75-07-0

## 1 - 1 - 2 構造式及び分子量

構 造 式 :



分 子 量 : 44.05

アセトアルデヒド

## 1 - 1 - 3 物理化学的性状等

性 状 : 刺激臭のある無色気体

沸 点 : 20.2

蒸 気 圧 : 101kPa(20 )

比 重 : 0.7839(16 )

## 1 - 2 - 1 被験物質のロット等

名 称 : アセトアルデヒド

製 造 元 : シグマ - アルドリッチ

カタログ番号 : 00071

ロット番号 : STBD7279V

純 度 : 99.9%

詳細は別紙 1 - 1参照

## 1 - 2 - 2 アセトアルデヒド標準ガス

名 称 : 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

容 器 番 号 : CQB12831、CQB18953

ボンベ濃度 : CQB12831 : 50.3 ppm、CQB18953 : 50.2 ppm

標準ガス製造 : 11 - 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 : 各11.8MPa

詳細は別紙 1 - 2及び別紙 1 - 3を参照

\*この試験で使用したボンベの本数は2本であった。

## 1 - 3 被験物質の特性

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 (図 1)。

## 1 - 4 試験動物

### 1 - 4 - 1 種、系統及び清浄度

種 : マウス  
系 統 : C57BL/6J  
清浄度 : SPF

### 1 - 4 - 2 性及び導入匹数

雄 : 1回目暴露終了時解剖動物、1日目及び3日目解剖動物 : 40匹  
7日目解剖動物 : 14匹

### 1 - 4 - 3 週齢

導 入 時 週 齢 : 生後10週齢2016年4月12日生まれ (1回目暴露終了時解剖動物、1日目  
及び3日目解剖動物)  
生後9週齢2016年4月19日生まれ (7日目解剖動物)  
投与開始時週齢 : 生後12週齢 (1回目暴露終了時解剖動物、1日目及び3日目解剖動物)  
生後11週齢 (7日目解剖動物)  
解剖サンプリング時週齢 : 生後12週齢

### 1 - 4 - 4 供給業者

日本チャールス・リバー (株) 厚木飼育センター

### 1 - 4 - 5 検疫及び馴化

動物導入後、1週間の検疫を行った。検疫期間後、動物を吸入チャンバーに移動し、1週間の馴化を行った。

検疫期間 : 7日間 (2016年6月21日 ~ 2016年6月27日)

馴化期間 : 7日間 (2016年6月28日 ~ 2016年7月4日)

## 2. 試験方法

### 2 - 1 投与

#### 2 - 1 - 1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

#### 2 - 1 - 2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

### 2 - 1 - 3 投与期間 (図 2参照)

投与期間は1日6時間暴露 (午後0時から午後6時) で最長7日間とした。

### 2 - 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、0.03、0.10及び0.30 ppmの3段階 (公比約3) に設定した。なお、対照群はHEP Aフィルターと活性炭フィルターにより濾過した新鮮空気による換気のみとした。

### 2 - 1 - 5 投与経路、及び投与濃度の設定理由

投与経路は、室内環境におけるヒトへの主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与濃度はアセトアルデヒドの室内濃度指針値である0.03 ppmを考慮して、最高投与濃度を0.30 ppmとし、以下0.10、0.03 ppmの3段階の濃度 (公比約3) を設定した。

### 2 - 1 - 6 アセトアルデヒド暴露に関する国立医薬品食品衛生研究所での経緯

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 毒性部では、アセトアルデヒドを正確にマウスに暴露するために、2種類の吸入チャンバーを用いてチャンバー内アセトアルデヒドの濃度検討を行った。

アセトアルデヒド(99%、MERCK) 0.3%希釈液を容れたバブリングによる発生装置タンク内のガス濃度が 100 ppm 以上を示したことから、希釈倍率を 0.1%に上げたが、100 ppm 以上の濃度であった。この結果からアセトアルデヒドはホルムアルデヒドと異なり揮発性が高く、希釈倍率を上げてアセトアルデヒドガス濃度を低下させることができないことが考えられた。バブリング法では低濃度が得られないため、標準ガスポンペを用いる方法を採用することとし、ガスの供給システムを変更、ガスポンペ用のマスフローコントローラー及び流量計を新たに設置、ポンペガスを希釈することで所定の濃度の暴露が可能となった。高千穂商事から購入した標準ガス濃度は 104 ppm であった。このガスをチャンバー内の総換気空気 650 L/分により希釈した。0.3 ppm 濃度を目標に標準ガス 1.9 L/分をチャンバー内に送気、高感度ホルムアルデヒドガスモニター(理研計器)による濃度測定を試みた。高濃度群のモニター値は  $0.091 \pm 0.011$  ppm (平均値  $\pm$  標準偏差) を示した。

2 回目に行った濃度測定試験では、設定濃度 0.3 ppm に対し標準ガスを 1.87 L/分で流した高濃度群の捕集管(GL-Pak mini AERO DNPH, ジーエルサイエンス)測定による濃度は 0.237 ppm と 21.2%低く、設定濃度 0.03 ppm に対し標準ガスを 0.19 L/分で流した低濃度群の捕集管測定による濃度は 0.027 ppm と 8.3%低く、設定濃度 0.1 ppm に対し標準ガスを 0.63 L/分で流した中間濃度群は 0.094 ppm と 6%低かった。高濃度群のモニター値は  $0.126 \pm 0.009$  ppm (平均値  $\pm$  標準偏差) と捕集管測定値 0.237 ppm との濃度差が大きかった。

3 回目の濃度測定時において 2.37 L/分に増やして流した高濃度群の捕集管測定による濃度は 0.286 ppm と 4.7%低く、設定濃度 0.03 ppm に対し標準ガスを 0.21 L/分で流した低濃度群の捕集管測定による濃度は 0.026 ppm と 13.3%低く、設定濃度 0.1 ppm に対し標準ガスを 0.67 L/分で流した中間濃度群は 0.089 ppm と 11%低かった。チャンバー内濃度の安定性を高感度ホルムアルデヒドガスモニターで測定したところ  $0.185 \pm 0.018$  ppm (平均値  $\pm$  標準偏差) であり、捕集管値 0.286 ppm との濃度差が大きかった。

4 回目の濃度測定試験では、設定濃度 0.3 ppm に対し標準ガスを 2.5 L/分で流した高濃度群の

捕集管測定による濃度は0.323 ppmと7.2%高く、設定濃度0.03 ppmに対し標準ガスを0.25 L/分で流した低濃度群の捕集管測定による濃度は0.033 ppmと8.3%高く、設定濃度0.1 ppmに対し標準ガスを0.76 L/分で流した中間濃度群は0.106 ppmと6%頂かった。高濃度群のモニター値は  $0.093 \pm 0.019$  ppm(平均値 $\pm$ 標準偏差)であり、捕集管値0.323 ppmとの濃度差が大きかった。4回行った高感度ホルムアルデヒドガスモニターの測定結果は、安定性を確認するには使用が可能であるような数値の推移を示すが、捕集管値と比べかなり低い濃度を示していた。本機器は、アセトアルデヒドに対し反応性が悪く信頼性は低いと考えられた。

本試験において4回目の濃度試験データを基に、0.03 ppmでは0.23 L/分、0.1 ppmでは0.72 L/分、0.3 ppmでは2.33 L/分に流量を補正し標準ガスを流入させ、得られた捕集管測定濃度は0.028、0.094、0.277 ppmであり、6.5~8.7%ほど低い目標値に近い一定濃度を安定的に保持し、動物に暴露することができた。また対照群チャンバー内濃度は  $0.0020 \pm 0.0013$  ppm( $3.75 \pm 2.19$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値 $\pm$ 標準偏差)、室内濃度は  $0.0040 \pm 0.0024$  ppm ( $6.83 \pm 4.49$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値 $\pm$ 標準偏差)と低濃度群の0.028 ppmと比し低い濃度であり、一般環境大気濃度0.23~7.9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値2.5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )(環境省、2003)と動物室内は同等であり、一般家庭の室内空气中で検出される平均濃度17 ppb(国土交通省、2003)を下回り、実験に影響はないものと考えられた。

#### 2-1-7 被験物質の暴露方法(暴露濃度0 ppm、0.03 ppm、0.10 ppm、0.30 ppm)

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。(概略図を図3に示した)

#### 2-1-8 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定した。すなわち、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アセトアルデヒドを捕集した。捕集管で捕集したアセトアルデヒドは、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、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た。反応・生成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。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(4.5mm  $\times$  150mm、粒径:5  $\mu\text{m}$  (財)化学物質評価研究機構)、検出波長はUV260nm、試料注入量は10  $\mu\text{L}$ 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、0.05~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検量線を作成した。

### 2-2 動物管理

#### 2-2-1 各群の使用動物数

投与群3群及び対照群1群の計4群を設け、各群12匹の動物を用いた。また、1回目暴露終了時、暴露開始後1日目、3日目及び7日目の解剖期を設けた。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	解剖期	雄 使用動物数(動物番号)
0	対 照 群	1 回目暴露終了時解剖	3 匹 (1001 ~ 1003)
		1 日目解剖	3 匹 (1004 ~ 1006)
		3 日目解剖	3 匹 (1007 ~ 1009)
		7 日目解剖	3 匹 (1010 ~ 1012)
1	0.03 ppm 群	1 回目暴露終了時解剖	3 匹 (1101 ~ 1103)
		1 日目解剖	3 匹 (1104 ~ 1106)
		3 日目解剖	3 匹 (1107 ~ 1109)
		7 日目解剖	3 匹 (1110 ~ 1112)
2	0.10 ppm 群	1 回目暴露終了時解剖	3 匹 (1201 ~ 1203)
		1 日目解剖	3 匹 (1204 ~ 1206)
		3 日目解剖	3 匹 (1207 ~ 1209)
		7 日目解剖	3 匹 (1210 ~ 1212)
3	0.30 ppm 群	1 回目暴露終了時解剖	3 匹 (1301 ~ 1303)
		1 日目解剖	3 匹 (1304 ~ 1306)
		3 日目解剖	3 匹 (1307 ~ 1309)
		7 日目解剖	3 匹 (1310 ~ 1312)

### 2 - 2 - 2 群分け及び個体識別方法

群分けは、投与前日に行った。供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した。なお、7 日目解剖動物は試験番号 4575 として別途群分けを行った。

動物の個体識別は、ケージに個体識別番号を記したラベルを付すことにより行った。動物はバリア区域内の独立した室に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他の試験及び異種動物と区別した。

群分けにより除外された動物は、群分けから投与開始までに事故等により試験群の動物が使用できなくなった場合の補填用として飼育継続し、投与開始が確認され、補填の必要がなくなったら飼育室から搬出して、投与後の解剖シミュレーション用として使用した。

### 2 - 2 - 3 飼育条件

#### (1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（517 室）馴化期間及び投与期間中は吸入試験室（516 室）の吸入チャンパー内で動物を飼育した。投与は吸入試験室の吸入チャンパーを使用した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンパー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。

また、吸入チャンバー内温度・湿度の実測値の範囲<最低値～最高値>を下に、温度・湿度、換気量と換気回数の日別平均値を表 1～3 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温度	: 検疫室; 23±2
	吸入試験室; 21±2
	吸入チャンバー内; 20～24 < 22.5～22.6 >
湿度	: 検疫室; 55±15%
	吸入チャンバー内; 30～70% < 54.0～60.9% >
明暗サイクル	: 12 時間点灯(8:00～20:00) / 12 時間消灯(20:00～8:00)
換気回数	: 検疫室; 15～17 回/時
	吸入試験室; 5～7 回/時
	吸入チャンバー内; 12±1 回/時 < 12.0～12.2 回 >
圧力	: 吸入チャンバー内; 0～ - 15 × 10Pa
吸入チャンバー容積	: 1060L
ケージへの動物の収容方法	: 単飼
ケージの材質・形状・寸法等:	
検疫	; ステンレス製 2 連網ケージ ( 112(W) × 212(D) × 120(H) mm/匹 )
馴化・投与	; ステンレス製 5 連網ケージ ( 100(W) × 116(D) × 120(H) mm/匹 )

## (2) 飼料

飼料は、被験物質暴露中を含む全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)(千葉工場: 千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料(30kGy- 線照射滅菌飼料)を飼料給餌器により自由摂取させた。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株)から分析データを入手し、保管した。

## (3) 飲水

飲水は、被験物質暴露中を含む全飼育期間を通して、市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。

## 2 - 3 観察・検査項目及び方法

### 2 - 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察

#### < 検疫及び馴化期間 >

生死及び瀕死の確認を毎日1回以上行った。一般状態の詳細な観察は、検疫開始日(導入時) 検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に行った。

#### < 投与期間 >

生死及び瀕死の確認、一般状態の観察を毎日 1 回以上行った。

### 2 - 3 - 2 体重測定

#### < 検疫及び馴化期間 >

検疫開始日(導入時) 検疫終了日及び群分け時に体重を測定した。

## &lt;投与期間&gt;

投与開始前及び解剖時に測定した。

## 2 - 3 - 3 試料の採取と検査

- 解剖時期: 1回目暴露終了時解剖動物は暴露終了直後、暴露開始後1日目、暴露開始後3日目及び暴露開始後7日目解剖動物は午前10時から午後0時の間に解剖した。
- 採取対象: 各解剖時期に、各群の(動物番号の小さい順に)3匹から採取した。
- 採取方法: 動物をエーテル麻酔下で、右腋窩動静脈の切断により放血致死させた。肝、肺及び脳よりマイクロアレイ用、病理組織学的検査用の試料を採取した。解剖時間は1匹あたり2分半から3分以内に脱血し、臓器採取を行った。また、肝、肺が摘出され、皮が頭部先端までむかれた状態のマウスを受けとってから各脳サンプルを得るまで、1匹あたり3分以内で試料を採取した。各群、定められた時刻に対して前後約15分(計30分)以内に完了した。解剖開始・終了時刻を記録した。詳しい手順は下記の通りとした。

## (1) マイクロアレイ用サンプルチューブの作製・RNA用チューブの作製

## 1) ラベルシールの切り方

準備したもの

ラベルシール

ハサミ

仕切りのある箱(サンプルの種類別に、収納できるように仕切っておいた。)

ビニール袋

手袋

マスク

手順(作業は、手袋とマスクを着用して行った。)

Sample No.ごとに各種サンプル用ラベルシール一揃い(本体用・登録用)が、1枚の台紙上に連なっている。これを一番小さいSample No.が、一番上になるように番号順に重ねておいた。

番号を確認し、上から3枚をとり、ラベルシールの端と端が揃うように3枚を重ねた。

3枚がずれないようにしっかり指ではさみ、各サンプルの種類ごとにラベルシールを切り分けた。

切ったラベルシールは、一番小さいSample No.が一番上になるように番号順に重ねて、サンプルの種類別に箱に収めた。

不必要なラベルシールは、ビニール袋にまとめて収納し、実験終了後に処分した。

\* 各項の動作は、セルフチェックを兼ねているので、確認してから次の動作に移った。

## 2) マイクロアレイ用サンプルチューブの作製

準備したもの



DNA LoBind Tube 2.0 mL : エッペンドルフ  
 RNAlater  
 分注用ピペット  
 分注用ピペットのチップ(25 mL)  
 100 mL チューブ  
 チューブラック  
 フリーズボックス  
 RNase 除去剤  
 ラベルシール  
 手袋  
 マスク

手順 (作業は、手袋とマスクを着用し、クリーンベンチ内で行った。)

#### 準備

クリーンベンチ内をRNase 除去剤でふき、準備したものを持ち込んだ。

#### チューブを並べた

アルミホイル(25cm幅のものを30cmくらいに切って使用)を敷きRNase 除去剤でふいた。DNA LoBind Tubeを開封してアルミホイルの上にとり出し、必要本数のチューブを蓋のあいた状態でチューブラックに並べた。(一度、袋から出したチューブは袋には戻さないこととした。)

#### RNAlaterの分注

必要量+ のRNAlaterを100 mL チューブに分注した。分注用ピペットで並べたチューブに(Liver : 500  $\mu$ L/tube、Lung : 1,000  $\mu$ L/tube、Brain : B-A : 小脳 (500)、B-B : 脳幹 (1,000)、B-C : 大脳 (1,000)、P-A : 海馬 (500)  $\mu$ L/tube)分注した。

#### チューブの箱詰め

チューブの蓋をしめながらフリーズボックスに収納した。この時、チューブの破損がないか、分注ミスがないかを確認した。(破損しているもの、液量の少ないものは除外した。)

#### 後片付け

持ち込んだものを取り出し、クリーンベンチを70%EtOHでふき、元の状態に戻した。

#### シール貼り

マイクロアレイ用サンプルのラベルシールを貼った。(ラベルシールの切り方・貼り方を参照)

\* 各項目の動作は、セルフチェックを兼ねているので、確認してから次の動作に移ることとした。

#### 3) ラベルシールの貼り方

##### 準備したもの

ラベルシール (サンプル別に切り分けておいたもの)

サンプルチューブ (必要本数をフリーズボックスに詰めた状態にしておいた)

フリーズボックス（前項のフリーズボックスとは別に新しいものを準備した）

手袋

マスク

手順（作業は、手袋とマスクを着用し行った。）

サンプル1種類ずつ、一番小さいSample No. から貼る作業をはじめた。

チューブ1本をとり、チューブに不具合がないかを確認した。

シールの番号を確認し、シール1枚をとり、右側（バーコード側）が上になるように右手でシールを持った。

の状態のまま、シールの台紙を縦半分（本体用と登録用の間）に二つ折りするような感じで軽く曲げ、曲げた方向から本体用シールを左手でめくり、1/3程度を台紙からはがした。

左手でループが左側にくるようにチューブを持ち、その時正面となる位置にバーコードを上にし、本体用シールを貼った。で台紙からはがした部分を先ずチューブに貼り、左手でチューブを半回転させシール全体をしっかりと貼り付けた。本体用シールをはがした後も登録用シールは、右手にもったままの状態とした。

左手でチューブをもったまま、右手の登録用シールをバーコードが下になるように持ちかえた。そのまま、シールの右端（台紙の切れ目より右側）をもち、左手で本体用シールが貼られていた台紙（切れ目より左側）を取り去った。登録用シールは、一部台紙がついた状態とした。

左手でループが右側にくるようにチューブを持ちかえ、その時、正面となる位置にバーコードを下にし、一部台紙のついた状態の登録用シールを貼った。シールがしっかりと貼られているかを確認し、チューブを新しいフリーズボックスに収納した。

#### 4) サンプルチューブ風袋測定

風袋測定は、解剖実施日の2週間以上前に測定すると値が変わってしまう可能性があるため、解剖実施日の10日～1日前に行った。

準備したもの

ラベルシールを貼ったサンプルチューブ（マイクロアレイ用：RNAlaterを分注したもの）をフリーズボックスに詰めた状態とした。

フリーズボックス（前項のフリーズボックスとは別に新しいものを準備した）

手袋

マスク

手順（作業は、手袋とマスクを着用し行った。）

サンプル1種類ずつ、一番小さいSample No.から測定をした。

サンプルチューブ1本をとり、番号を確認し、チューブに不具合がないかを確認した。

サンプルチューブから登録用シールを剥がし、本体用シールだけが貼られた状態のサンプルチューブを天秤にのせ、この重量を測定した。

重量が、一割以上少ないものや2割以上多いものについては、RNAlaterを分注しなおし、再測定した。

測定後、直ちに登録用シールを元の状態になるようサンプルチューブに貼り、本体用と登録用シールの番号が同一であることを確認した。

のサンプルチューブを新しいフリーズボックスに収納した。

同様に次のサンプルチューブを測定した。

\* 各項の動作は、セルフチェックを兼ねているので、確認してから次の動作に移ることとした。

## (2) 採取手順

### 1) 肝の摘出

トレイと生食をいれたカップは、匹数分を準備し、1匹/枚（個）で使用した。

動物を麻酔し、右腋窩動静脈を切断し放血致死させた。

動物を仰臥位にし、70%エタノールをスプレーし、ハサミを用いて、腹部（中央より数mm尾側）の皮膚をリングピンセットでつまみ、正中線に対して垂直方向にハサミで切れ目を入れた。

切れ目の両端を引っ張って皮を剥いだ。この際、指についた動物の毛を生理食塩水（以下、生食）で洗浄、除去した。

筋層にVの字に切れ込みを入れ、肝を露出させた。

横隔膜の方から肝を徐々に切り離し、肝は生食につけた状態でおいておいた。

肝を生食から引き上げ、氷上のバランスディッシュへのせた。

ハサミ、ピンセットを生食で洗浄し、新しいトレイを準備し、次の動物を待った。

### 2) 天秤・麻酔

各解剖の開始・終了時間を記録した。

天秤で肝の重量を測定、記録した。

ピンセットは生食を入れたチューブで洗浄した。（生食は群ごとに交換した）

臓器を担当者に渡し、次の動物を準備し、約2分30秒間隔で動物を麻酔瓶に入れた。

### 3) 肝サンプリング

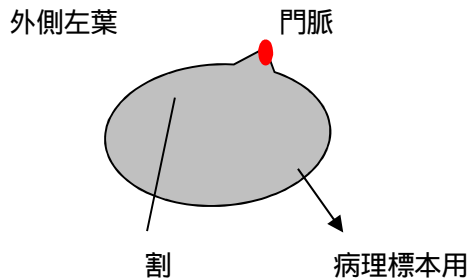
肝を、シルキーテックスを貼ったシャーレ（氷上）にのせた。

肝を背側が上になるようにおき、外側左葉をめくって内側右葉を露出させた（胆嚢のついてる葉）

の状態、胆嚢の左側の葉を1カ所（A）、右側の葉を2カ所（門脈近位：B、門脈遠位：C）トレパンで抜き取った。

3 mm径リングピンセットでAサンプルをマイクロアレイ用チューブに収め、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移し、登録用シールは、登録台紙に貼った。B,Cサンプルについても同様に行った。各サンプルの厚さがなるべく揃うように（重量としては30～40 mg）採取した。

肝の外側左葉を門脈部で他の葉から切り離し、下図の実線の位置で割をいれた。



門脈を含む方を病理標本用サンプルとし、で切り離した他の葉と共に10%ホルマリン液に移した。

使用した器具を生食で洗浄し、水気をふき取り、次のサンプリングに用いた。(生食は群ごとに交換した。) 洗浄する時間がない場合は、もう1セットのハサミおよびピンセットを使用した。

解剖終了後、氷上のマイクロアレイ用サンプルを氷上の一時保管用箱にラベルシールを確認しながら移した。同時にサンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルを収納した一時保管用箱は、4 に移動し保管した。

<腫瘍や白点など限局した病変(変化)部のある個体のサンプル採取について>

病変(変化)部を含まないようにマイクロアレイ用サンプル採取した。その部分を避けて 3カ所から採取することが難しい場合、外側左葉の門脈遠位部(病理標本用サンプルの割を入れる付近)から採取した。

いずれの場合も所見と採取部位を登録台紙に記録した。いずれの場合も病変(変化)の性状を登録台紙に記録した。(動物の番号を丸でかこみ、その番号付近に病変(変化)の性状を記録した。また、指定外の部位から採取したものは、チューブ番号を丸でかこみ、その番号付近に部位を記録した。)

#### 4) 肺サンプリング

マウスの受け取り

解剖担当者から肝摘出後のマウスをトレイごと受け取った。

横隔膜の切離

横隔膜を肋骨弓から切り離した。(食道は切断しても、しなくてもよいこととした。)

肋骨の切断

肺を傷つけないように胸腔内臓器を片側によせ、左右の最後位肋骨から第1肋骨までを切断した。胸骨の延長線は、頸部とつながった状態にし、完全に切り離さないこととした。

気管の露出

片手で尾を固定し、胸骨を頭側方向に手で引き上げ、気管を露出させた。

気管の切断

気管を甲状腺の下で切断し、断端を持ち上げ気管を胸腔前口まで遊離させた。

RNAlaterの注入

気管断端に注射針（18G x 1 1/2 注射針+2.5 mL シリンジ）を針穴が隠れる程度挿入した。液漏れしないよう気管の上からピンセットで針を固定し、一気にRNAlater（2 mL）を注入した。

#### 肺の摘出1

気管をピンセットではさんだまま、注射針を抜き、心臓をつけた状態で肺を摘出した。

#### 肺の摘出2

摘出した肺をディッシュに移した。気管支を切断し左肺と、副葉を切除した右肺を取り出した。

#### RNA用サンプル採取 : 肺の切断

左肺を長軸方向で葉の幅1/2のところを切断し、肺門の遠位側をRNA用サンプルとし速やかにA tubeに収め、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移し、登録用シールは、登録台紙に貼った。

右肺を長軸方向で葉の幅1/2のところを切断し、肺門の遠位側をRNA用サンプルとし、速やかにB tubeに収め、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルチューブから登録用シールをはがし、サンプルチューブは、氷上へ移し、登録用シールは、登録台紙に貼った。

#### 病理標本用サンプル採取

肺門の近位側を病理標本用サンプルとし、左・右肺ともに断面をろ紙に（右肺は3葉の各断面がろ紙に接するように）貼り付け、ホルマリン固定した。

（肺は浮きやすいので、サンプルがホルマリンに浸かっていることを確認した。）

#### 器具の洗浄

使用した器具を、生食で洗浄し水気をふき取り、次のサンプリングに用いた。

特に肺の切断用は、よく水気をふき取ることとした。

#### 解剖終了後のサンプル管理・マイクロアレイ用サンプル

氷上のRNA用サンプルを氷上の一時保管用箱にラベルシールを確認しながら移した。同時にサンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。サンプルを収納した一時保管用箱は、4 に移動し保管した。

#### 解剖終了後のサンプル管理・病理標本用サンプル

サンプルの入った標本びんを、しんとう機に移し60分間しんとうした。

<腫瘍や白点など限局した病変（変化）がある個体のサンプル採取について>

病変（変化）部を含まないようにマイクロアレイ用サンプルを採取した。

いずれの場合も病変（変化）の性状を登録台紙に記録した。（動物の番号を丸でかこみ、その番号付近に病変（変化）の性状を記録した。）

## 5) 脳摘出

### マウスの受け取り

「解剖担当者は剥皮する際に、できるだけ頭部先端までむくこととした」

解剖担当者から肝、肺摘出後のマウスをトレイごと受け取った。

#### 頭部の剥皮

術野を広くとれるようにハサミにて頭部全体の皮をむき、左手にて左右の皮にテンションがかかるようにしつつ、頭部をもった。

#### 延髄部の切断

ハサミにて延髄部を切断した。この際、体部の筋・皮膚は頭部に付着した状態であり、完全に切り離さないようにした。

#### 頭蓋骨の切断

脳を傷つけないように、ハサミを延髄側から頭蓋骨の正中に入れ、目の部位まで切断した。

#### 脳の露出

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

#### 脳の摘出

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

### 6) 脳サンプリング

#### 脳の左右の分離

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

作業者Bに渡した。

#### 小脳の分離「作業者B分担分」

あらかじめで氷冷したピンセット2本を使用した。

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

#### 脳幹の分離

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

#### 海馬と大脳皮質の分離

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

・残りが大脳皮質。

## RNAサンプル

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

## 器具の洗浄

使用した器具を、生理食塩水で洗浄し水気を取り、次のサンプリングに用いた。

## 解剖終了後のサンプル管理・RNA用サンプル

氷上のRNA用サンプルを氷上の一時保管用箱にラベルシールを確認しながら移した。同時に、サンプルがRNAlaterに浸かっていることを確認した。全てを移し終わったら箱の中のサンプル数を数え、tube check sheetにチェックを入れた。サンプリング担当者以外の人に同様にサンプル数をチェックしてもらい、問題がなければサンプルの入った一時保管用箱を4に移動し保管した。

## 解剖終了後のサンプル管理・病理標本用サンプル

サンプルの入った標本びんをしんとう機に移し60分しんとうした。

## 7) 注意事項

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

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

## 8) 試料の処理

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

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

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

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

## 準備するもの

マイクロアレイ用サンプル（RNAlaterに浸かったもの）

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

フリーズボックス（フリーズボックスは新しいものを準備し、ラベルしておいた）

手袋

マスク

氷

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

手順（作業は、手袋とマスクを着用し行うこととした。）

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

サンプルは、1種類ずつ、一番小さいSample No.から測定しはじめた。

サンプル1本をとり、番号を確認し、重量を測定した。

この時、RNAlaterに浸かっていなかったサンプルは、番号を記録した。

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

同様に次のサンプルを測定した。

測定後のサンプルは、-80 で保管した。

この測定値から、風袋を差し引いたものをサンプル重量とした。

#### (4) マイクロアレイ用サンプルの保存及び送付

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

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

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

毒性部 高橋 裕次

### 2 - 3 - 4 病理学的検査

#### (1) 剖検

全ての解剖動物について、肝、肺及び脳の肉眼的観察を行った。

#### (2) 臓器重量

全ての解剖動物について、肝、肺及び脳の湿重量を測定した。

#### (3) 病理組織学的検査

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

### 2 - 4 数値の取り扱いと表示

各数値データは、測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として測定し、表示した。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 位まで測定し、表示した。

臓器湿重量は、g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。

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



### 3. 試験成績

#### 3 - 1 吸入チャンバー内の被験物質濃度

吸入チャンバー内の被験物質濃度を表 4 に示した。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標暴露濃度 0.03、0.10 及び 0.30 ppm に対し、測定値の平均 ± 標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ  $0.0306 \pm 0.001$  ppm（0.0290 ppm～0.0318 ppm）、 $0.102 \pm 0.002$  ppm（0.100 ppm～0.107 ppm）及び  $0.303 \pm 0.004$  ppm（0.298 ppm～0.309 ppm）であった。

#### 3 - 2 動物の生死及び一般状態

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

#### 3 - 3 体重

解剖時の体重を表 5 に示した。

#### 3 - 4 病理学的検査

##### 3 - 4 - 1 剖検観察

肝、肺及び脳の剖検所見を表 6 に示した。

動物番号 1205 に関して、肝臓の変形が認められた。

##### 3 - 4 - 2 臓器重量

肝臓重量(g)を表 5 に示した。

##### 3 - 4 - 3 病理組織学的検査

肝、肺及び脳の病理組織学的検査の結果を表 7 に示した。

いずれの動物も特記すべき変化を認めなかった。

但し、動物番号 1205 に関して、剖検観察で認められた肝臓の変形（構成細胞）は、周囲の正常細胞と同一組織成分の過剰に発育した組織奇形であることが確認された。

表 1 吸入チャンバー内環境の測定結果：温度（6時間暴露）

単位：

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	0.03 ppm 群	0.10 ppm 群	0.30 ppm 群
全期間				
平均値	22.6	22.6	22.6	22.6
標準偏差	0.2	0.2	0.1	0.2
日別平均値				
7月5日	22.6	22.6	22.6	22.6
7月6日	22.6	22.6	22.5	22.6
7月7日	22.6	22.6	22.6	22.6
7月8日	22.6	22.6	22.6	22.6
7月9日	22.6	22.6	22.6	22.6
7月10日	22.6	22.6	22.5	22.6
7月11日	22.6	22.6	22.6	22.6
7月12日	22.6	22.6	22.6	22.5

表 2 吸入チャンバー内環境の測定結果：湿度（6時間暴露）

単位：%

チャンバー	CH-1	CH-2	CH-3	CH-4
群	対照群	0.03 ppm 群	0.10 ppm 群	0.30 ppm 群
全期間				
平均値	54.3	56.4	56.3	58.7
標準偏差	1.9	1.7	2.6	3.0
日別平均値				
7月5日	54.0	56.3	55.7	58.5
7月6日	54.0	56.1	55.6	58.1
7月7日	54.2	56.2	56.1	58.4
7月8日	54.4	56.3	56.4	58.9
7月9日	54.6	56.6	56.6	59.0
7月10日	54.3	56.4	56.5	58.8
7月11日	54.4	56.6	56.6	58.9
7月12日	55.7	57.8	58.1	60.9

表 3 吸入チャンバー内環境の測定結果：換気量と換気回数（6時間暴露）

単位：換気量 L/min 換気回数 回/時

チャンバー	CH-1		CH-2		CH-3		CH-4	
群	対照群		0.03 ppm 群		0.10 ppm 群		0.30 ppm 群	
	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数	換気量	換気回数
全期間								
平均値	212.4	12.0	213.5	12.1	212.9	12.1	213.3	12.1
標準偏差	1.5	0.1	2.6	0.1	2.9	0.2	3.0	0.2
日別平均値								
7月5日	211.7	12.0	213.1	12.1	212.6	12.0	213.2	12.1
7月6日	211.9	12.0	212.8	12.0	212.3	12.0	212.6	12.0
7月7日	212.9	12.1	213.6	12.1	212.7	12.0	213.1	12.1
7月8日	212.5	12.0	214.2	12.1	213.3	12.1	213.6	12.1
7月9日	212.9	12.1	213.5	12.1	213.2	12.1	213.3	12.1
7月10日	213.4	12.1	214.4	12.1	214.3	12.1	215.0	12.2
7月11日	212.2	12.0	213.2	12.1	212.8	12.0	213.2	12.1
7月12日	211.3	12.0	213.2	12.1	211.3	12.0	212.5	12.0

表 4 吸入チャンバー内の被験物質濃度（6時間暴露）

	単位：ppm			
	対照群	0.03 ppm群	0.10 ppm群	0.30 ppm群
7月 5 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0318	0.107	0.309
7月 6 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0315	0.104	0.305
7月 7 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0309	0.102	0.304
7月 8 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0306	0.102	0.303
7月 9 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0290	0.100	0.299
7月 10 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0296	0.101	0.300
7月 11 日午後 0 時から午後 6 時	0	0.0305	0.101	0.298
平均濃度	0	0.0306	0.102	0.303
標準偏差	0	0.001	0.002	0.004

表 5 解剖時体重及び肝臓重量 (6時間暴露)

## 1 回目暴露終了時解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1001	29.5	1.287
	1002	25.7	1.051
	1003	27.7	1.188
0.03 ppm 群	1101	28.2	1.376
	1102	26.5	1.146
	1103	29.1	1.407
0.10 ppm 群	1201	26.6	1.227
	1202	29.1	1.487
	1203	25.3	0.875
0.30 ppm 群	1301	30.8	1.489
	1302	27.7	1.329
	1303	26.0	1.343

## 1 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1004	29.4	0.959
	1005	28.5	1.558
	1006	27.4	1.627
0.03 ppm 群	1104	29.3	1.517
	1105	28.3	1.349
	1106	27.7	1.473
0.10 ppm 群	1204	27.0	1.439
	1205	28.5	1.667
	1206	27.5	1.570
0.30 ppm 群	1304	29.3	1.675
	1305	28.1	1.576
	1306	27.8	1.548

## 3 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1007	28.9	1.319
	1008	28.7	1.486
	1009	26.1	1.183
0.03 ppm 群	1107	28.9	1.409
	1108	27.2	1.468
	1109	28.9	1.256
0.10 ppm 群	1207	29.6	1.370
	1208	28.1	1.323
	1209	25.3	1.217
0.30 ppm 群	1307	27.9	1.256
	1308	28.1	1.508
	1309	28.6	1.631

## 7 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1001	25.0	1.363
	1002	27.1	1.334
	1003	28.1	1.519
0.03 ppm 群	1101	25.9	1.392
	1102	25.8	1.338
	1103	27.0	1.195
0.10 ppm 群	1201	27.9	1.515
	1202	24.7	1.204
	1203	26.9	1.344
0.30 ppm 群	1301	24.6	1.262
	1302	27.3	1.472
	1303	27.5	1.385

表 6 剖検所見 (6時間暴露)

## 1 回目暴露終了時解剖

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

## 1 日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.03 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.10 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	変形	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
0.30 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

## 3日目解剖

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

## 7日目解剖

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



表 7 病理組織所見（6時間暴露）

## 1 回目暴露終了時解剖

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

## 1 日目解剖

群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.03 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.10 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし*	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
0.30 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

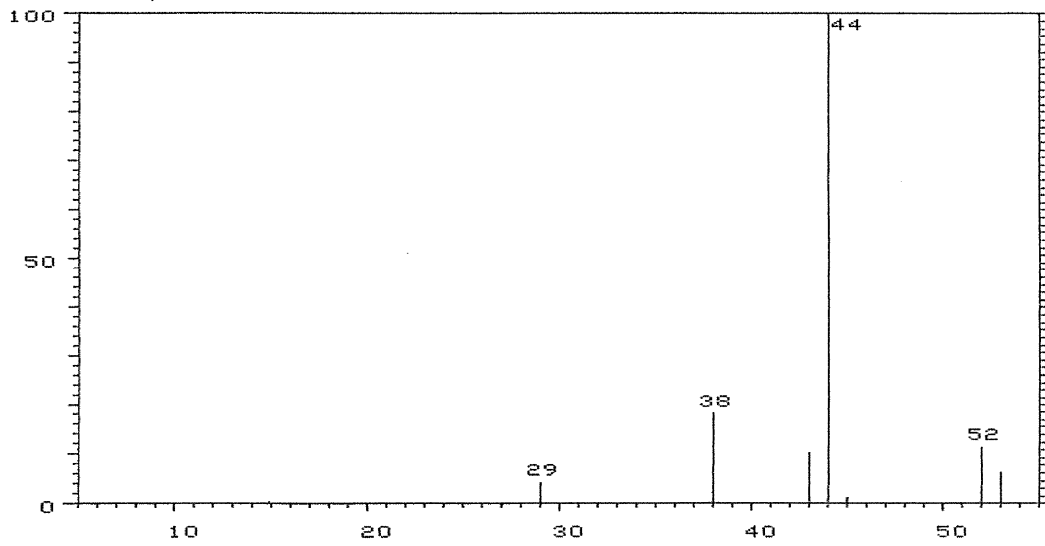
\*剖検観察で認められた肝臓の変形は病理組織学的検査で構成細胞は周囲の正常細胞と同一組織成分の過剰に発育した組織奇形であることが確認された。

## 3日目解剖

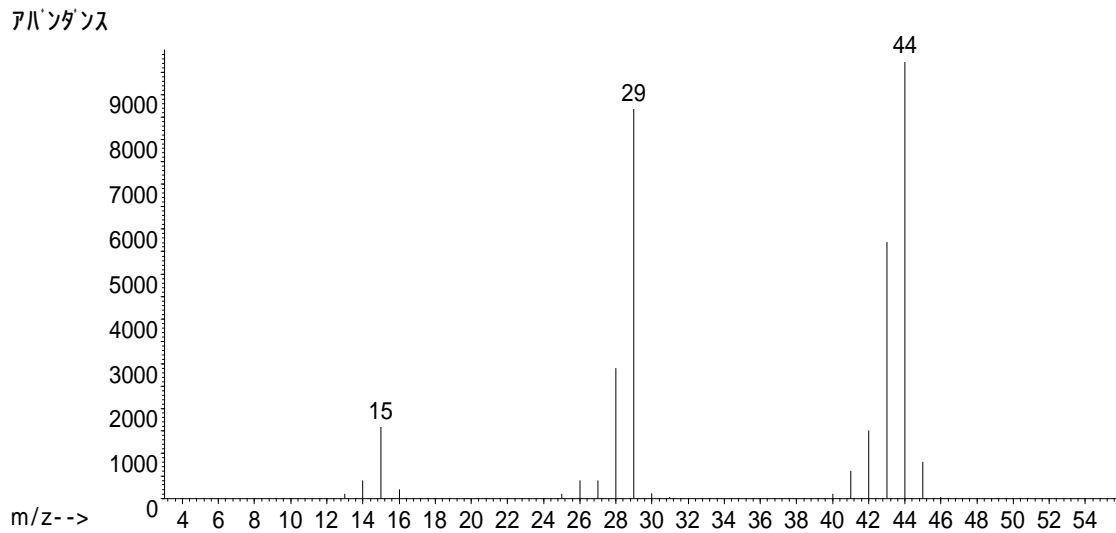
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.03 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.10 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
0.30 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

## 7日目解剖

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



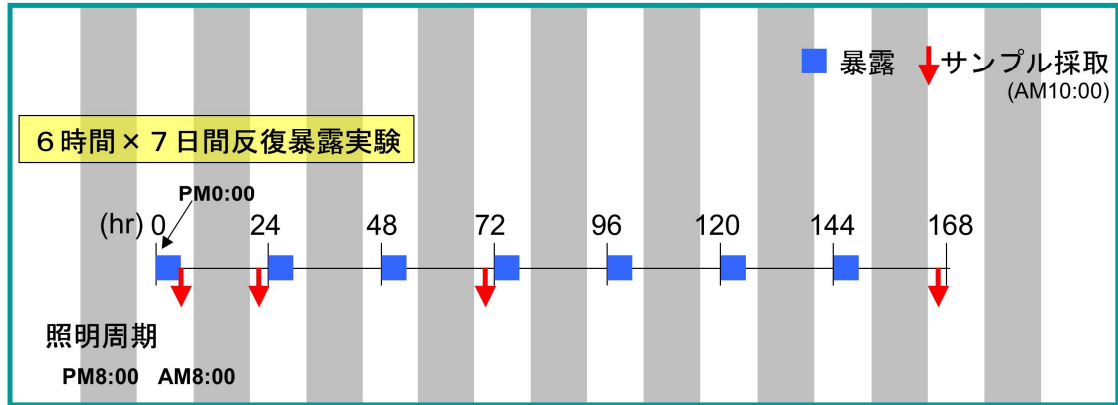
被験物質のマススペクトル



アセトアルデヒドのマススペクトル

McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.  
6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.

図 1 マススペクトル



6時間 x 7日間反復暴露 (投与6、22、70、166時間後に観測) [時刻：18時、10時、10時、10時]

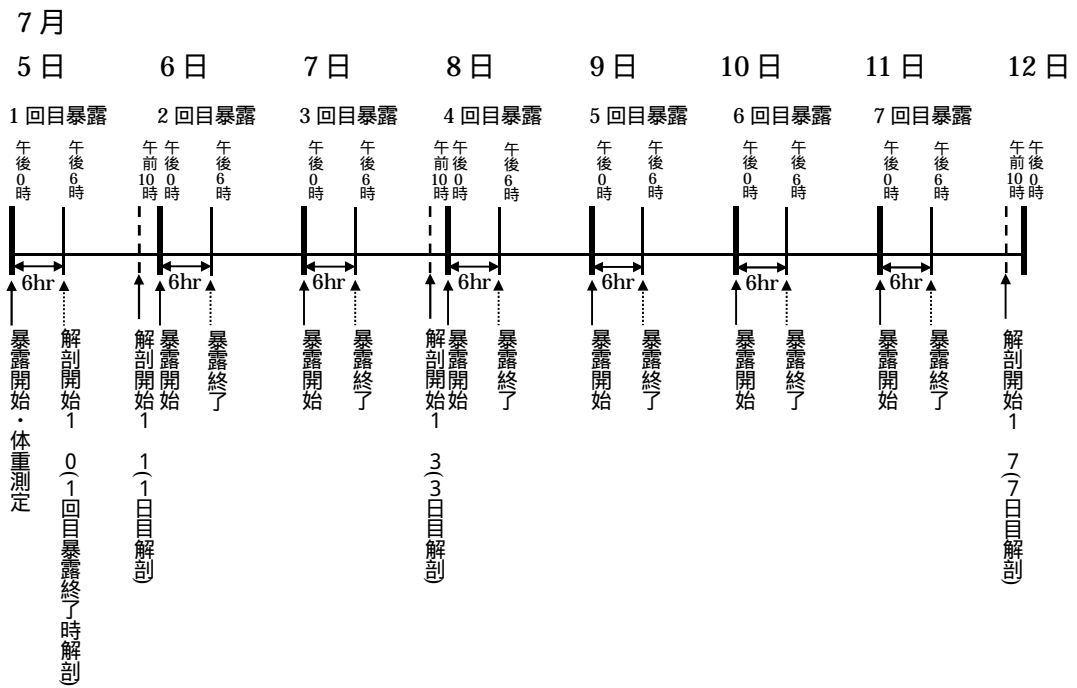


図 2 試験スケジュール (6時間暴露)

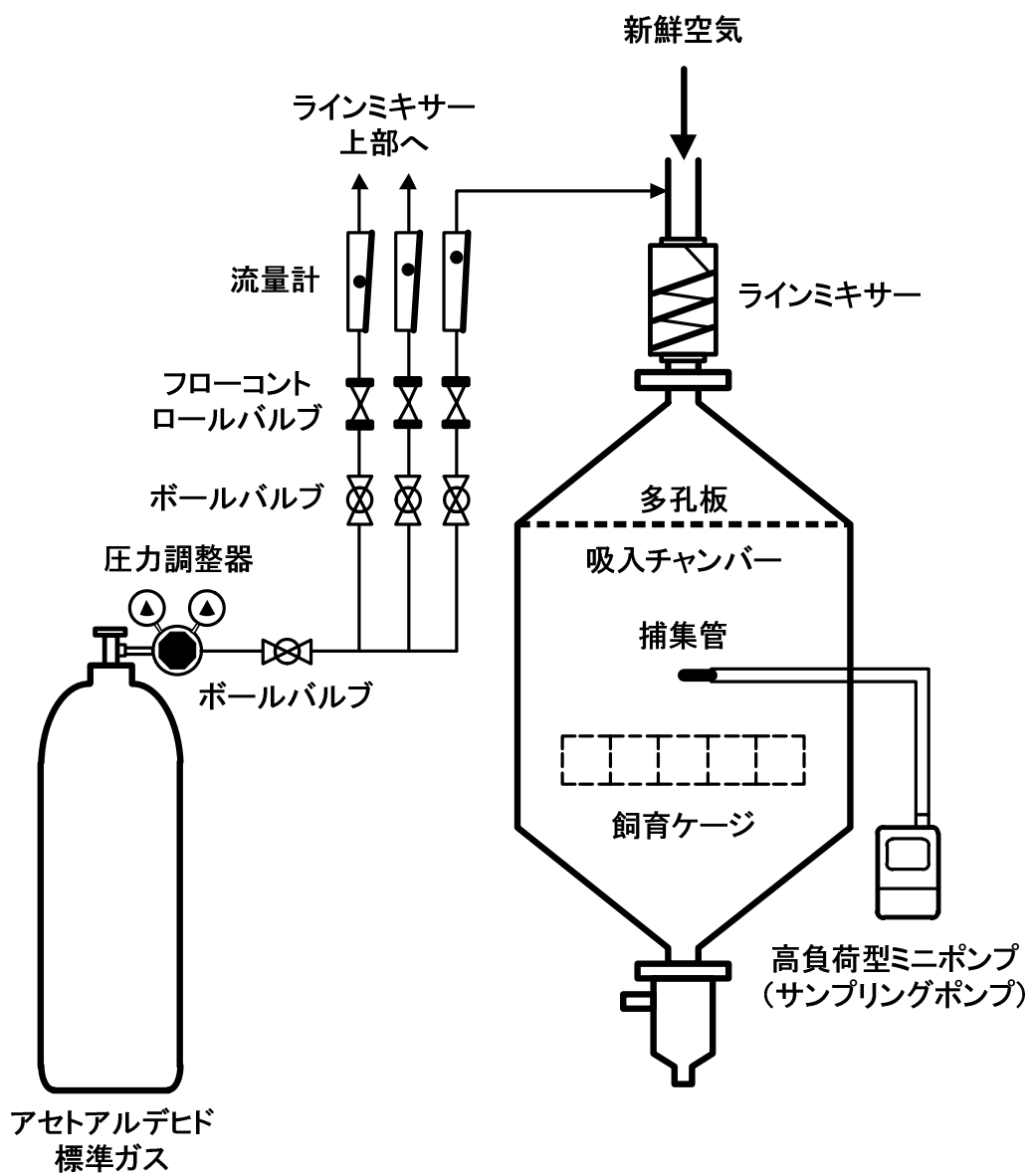


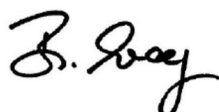
図 3 吸入装置のシステム

別紙 1 - 1

**SIGMA-ALDRICH**3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com**Certificate of Analysis**

**Product Name:** ACETALDEHYDE  
*ReagentPlus™*  
**Product Number:** 00071  
**Batch Number:** STBD7279V  
**Brand:** Fluka  
**CAS Number:** 75-07-0  
**Formula:** CH<sub>3</sub>CHO  
**Formula Weight:** 44.05  
**Storage Temperature:** 2-8 C  
**Quality Release Date:** 19 DEC 2013

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
PURITY (GC AREA %)	≥ 99.0 %	> 99.9 %
REFRACTIVE INDEX N20/D	1.331 - 1.333	1.332
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
ACIDITY	≤ 1 % (AS ACOH)	0.1 %



Dr. Beril Eray, Manager  
Quality Control  
Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ガス分析試験成績書

2016年4月20日

No.16503045002

御注文先


日本バイオアッセイ研究センター 殿

**高千穂化学工業株式会社**  
 町田事業所 計測ガス工場  
 〒194-0004  
 東京都町田市鶴間1557  
 TEL.042-796-5501 FAX.042-795-7168

ガス名	容器番号
GAS MIXTURE	CQB 12831
試験方法	GAS CHROMATOGRAPHY METHOD
容器種類、材質	47 L (アルミ)(アルミニウム)
充填量	11.8MPa
充填日	2016/ 4/13
分析日	2016/ 4/20
室内温度	20℃
貯蔵温度	0℃ ~ 35℃
出荷条件	容器賃貸(2017/ 5迄)
備考	

ガス名	分析値	仕様
Acetaldehyde	50.3 ppm	50 ppm
Nitrogen	Balance	

試験結果

グループ長	総合判定	合格
		

ガス分析試験成績書

2016年4月20日

No.16503045001

御注文先

日本バイオアッセイ研究センター 殿

 高千穂化学工業株式会社  
 町田事業所 計測ガス工場  
 〒194-0004  
 東京都町田市鶴間1557  
 TEL.042-796-5501 FAX.042-795-7163

ガス名	容器番号
GAS MIXTURE	CQB 18953
試験方法	GAS CHROMATOGRAPHY METHOD
容器種類、材質	47 L (アルミ)(アルミニウム)
充填量	11.8MPa
充填日	2016/ 4/13
分析日	2016/ 4/20
室内温度	20℃
貯蔵温度	0℃ ~ 35℃
出荷条件	容器賃貸(2017/ 5迄)
備考	

ガス名	分析値	仕様
Acetaldehyde	50.2 ppm	50 ppm
Nitrogen	Balance	

試験結果

グループ長	総合判定	合格
		



平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金 (H26-化学-一般-001)

(研究分担者) 研究報告書

「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」

研究分担者 慶長直人 (公財)結核予防会 結核研究所 生体防御部

部長

研究協力者 松下育美、土方美奈子 同部

**研究要旨** 化学物質が気道を通じて吸入される場合、低濃度でも人体に有害な影響を与えることが知られており、シックハウス症候群として総称されているが、背景にどのようなメカニズムが存在するか十分に解明されていない。シックハウス症候群について、ヒトの細胞モデル系を構築することは、その発症メカニズムを知る上で重要な研究方法の一つと考えられる。ヒトの肺は常に外界の吸入粉塵や微生物に曝されており、そこに吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が惹起される可能性があり、我々はこれまでそのモデルとして、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いて炎症応答に対するホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を検討してきた。近年、好中球炎症を誘導するサイトカインである IL-17A と polyI:C の共添加が、関連する炎症性サイトカイン・ケモカイン発現を相乗的に増加させることが報告されている。このことより、ウイルス感染時には IL-17 の共存下で、気道上皮における炎症性サイトカイン発現がさらに誘導され、より強力な気道炎症が惹起されると予測される。そこで、本年度、IL-17 系の誘導発現能がこれまでヒト気道上皮系の細胞株として用いてきた BEAS2B 細胞より 10 倍以上高く、炎症応答様式がさらに正常細胞に近いといわれる HBE1 細胞の供与を受けて、関連する遺伝子発現誘導に関わるシグナル伝達経路や転写メカニズムを解析する為の実験系を構築した。新規 *in vitro* 実験系を用いて、化学物質として、まず、ホルムアルデヒドの影響を検討した結果、毒性化学物質と poly I:C の共刺激後は微弱ながら、IL-8 及び IL-1 の濃度依存的な産生増強傾向が認められたものの、単独では高濃度で刺激しても IL-8 mRNA の上昇は認められなかった。IL-8 及び IL-1 以外に分泌される生理活性物質について、気道上皮細胞より分泌される多数の生理活性物質の同時定量を行なった結果、poly I:C 曝露により IL-8 や IL-1 $\beta$ 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 にホルムアルデヒドを加えた場合には、poly I:C 単独に比べて、IL-8 の産生増強傾向が認められた。以上のことより、細胞株の種類によらず、ヒト気道上皮系細胞では、polyI:C 共刺激時に、ホルムアルデヒドに反応することが確認された。今後、ホルムアルデヒド以外の物質の効果を見る上では、炎症応答様式がさらに正常細胞に近く、好中球性炎症の細胞モデルとして、期待される HBE1 細胞を用いた実験系を構築することで、さらに新たな知見が得られる可能性があり、炎症関連遺伝子発現誘導に関わるシグナル伝達経路や転写メカニズムを明らかにすることが有用と考えられた。

## A. 研究目的

ヒトの肺は、常に外界の吸入粉塵や微生物に曝されており、これまで無菌であると考えられていた肺にも microbiome 解析を試みると、従来の方法では分離培養できない微生物の核酸が数多く見いだされることが近年、明らかになっている。ここに吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が誘発される可能性がある。環境中の微量な化学物質に反応して心身の不調を引き起こす「シックハウス症候群」に関連して指針に定められている 13 種の化学物質のうち、これまで我々はホルムアルデヒドを中心に検討を重ねてきた。すなわち、気道上皮細胞の炎症応答に及ぼす影響を検討するため、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いて、日常的な経気道性のウイルス曝露などを念頭に置いた poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する化学物質添加による *in vitro* での影響を定量 RT-PCR で検出する系を確立してきた。ホルムアルデヒドの系ではさらに、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン類を測定し、さらにシグナル伝達に関するタンパクのリン酸化について検討を行ない、poly I:C による IL-8 遺伝子発現がそれら 3 つの主要なシグナル伝達系に依存していること、特に JNK 系が IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示した。

これまで確立したヒト気道上皮細胞系による poly I:C の低濃度刺激下での化学物質添加による炎症応答への影響を検討する *in vitro* 実験系において、シックハウス症候群関連 13 化学物質のうち、9 種類の化学物質の影響を検討してきたが、本年度はこれまでヒト気道上皮系の細胞株として用いてきた BEAS2B 細胞より、好中球性炎症応答が正常細胞に近いといわれる HBE1 細胞による実験系を構築、新規 *in vitro* 実験系を用いた poly I:C と化学物

質との複合効果について検討した。

## B. 研究方法

### 「刺激物質」

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

（Sigma-Aldrich：P9582）を選択した。

### 「化学物質」

シックハウス症候群関連 13 化学物質のうち、これまでの検討から、ホルムアルデヒド（Polysciences Inc.: Cat No. 18814）について検討を始めた。

### 「細胞」

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、実験に用いた。

### 「培養条件の検討」

#### (1) 培地の検討

従来、HBE1 細胞を培養する際に用いられた培地 D-medium（最終濃度 10ng/ml Epidermal Growth Factor(Upstate Biotechnology:Cat#01-407)、4μg/ml Insulin(Sigma: I-6634)、5μg/ml Transferrin(Sigma: T-8158)、0.1μM Dexamethasone(Sigma: D-1756)、20ng/ml Cholera Toxin(WAKO: 030-20621)、40μg/ml 下垂体エキス（極東：20200）、15mMHEPES(Sigma: H0887)、25mg/ml Plasmocine(Invivogen: #ant-mpt) 含有の DMEM/F12(Sigma: D8062)）と、これまでの実験でヒト気道上皮細胞株 BEAS2B（ATCC:CRL-9609）を培養する際に使用していた気管支上皮細胞用増殖培地 BEGM（三光純薬：CC-3170）を比較検討した。

#### (2) 培養容器

25 cm<sup>2</sup> コラーゲンコートフラスコ（IWAKI：4100-010）若しくは、コラーゲ

ンコートなしの通常の細胞培養フラスコ (Falcon: 35-3108) を用いた。

「培養および刺激」

細胞株を 25 cm<sup>2</sup> コラーゲンコートフラスコ (IWAKI : 4100-010) を用い、気管支上皮細胞用増殖培地 BEGM (三光純薬 : CC-3170) で培養し (5 × 10<sup>5</sup> cells /flask)、90% confluent で、poly I:C (10 μg/ml) で 24 時間刺激後、ホルムアルデヒド (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM) を段階希釈して数段階の濃度で 3 時間添加した後、細胞を回収、total RNA を抽出した (RNeasy Mini Kit、Qiagen : 74106)。これまでの系と同様に、1 μg の total RNA を random primer (TakaRa : 3802) を用いて逆転写反応を行い、反応液量の 1/20 を 1 PCR 反応に持ち込み、IL8 の mRNA 発現レベルを TaqMan Gene Expression Assay (Hs00174103\_m1)、IL-17A については、TaqMan Gene Expression Assay (Hs00174383\_m1)、IL-17C については、TaqMan Gene Expression Assay (Hs00171163\_m1) を用いた定量的 RT/PCR (Life Technology : Real-Time PCR System Step One Plus) で測定した。内在性コントロールには Human GAPDH を用い、Ct 法で非刺激細胞での発現を 1 としたときの各細胞での相対発現量を求めた。

「生理活性物質の測定」

poly I:C と キシレンの複合効果については、培養上清に分泌される生理活性物質を、Bio-Plex サスペンションアレイシステム (Bio-Rad : Bio-Plex200) を用いた。対象は、27 種類のサイトカイン等の生理活性物質 (IL-1β, 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-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNF-α, VEGF) を選択、同時測定した (27-plex Group、Bio-Rad :

M50-OKCAFOY)。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

細胞培養の結果、BEGM 培地でコラーゲンコートのフラスコで培養した場合が細胞の増殖率及び細胞の形態としては、適正であると考えられた(図 1A, B, C, D)、以降の実験では、この培養条件で行った。

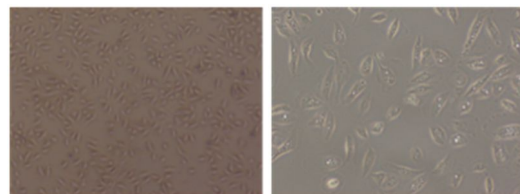


図 1A

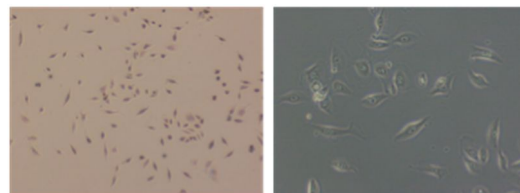


図 1B

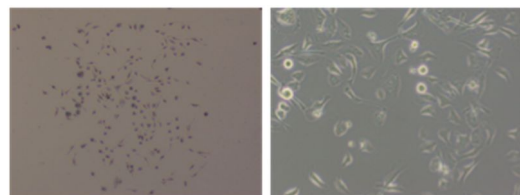


図 1C

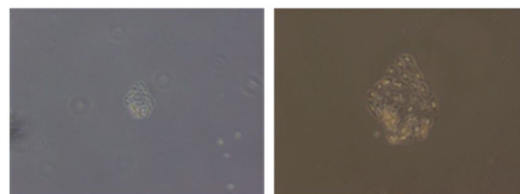


図 1D

図1 培養4日目、A: BEGM/コラーゲンコート、B: D-medium/コラーゲンコート、C: BEGM/コラーゲンコートなし、D: D-medium/コラーゲンコートなし

また、細胞の状態を確認する為、IL-17A, Cの発現量がBEAS2B細胞の10倍以上増強することを確認した(未記載)。

今回は、ホルムアルデヒド添加による複合効果がこれまで明らかなIL-8及び動物モデルで有意な遺伝子発現変化が報告されたIL-1 $\beta$ を指標に、検討を行った。その結果、BEAS2B細胞株を用いた時と同様、poly I:C (10  $\mu$ g/ml)で24時間刺激後、ホルムアルデヒド(0.01-100  $\mu$ M)を3時間添加することにより、IL-8の発現量がやや増強し、高濃度(100  $\mu$ M)では、やや低下する傾向が認められた。IL-1 $\beta$ mRNAについては、値がばらつき、はっきりした傾向が認められなかった(図2A, B)。

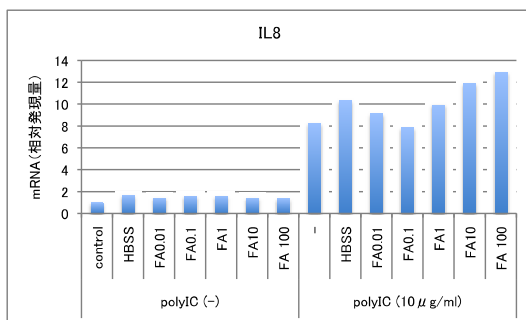


図2A

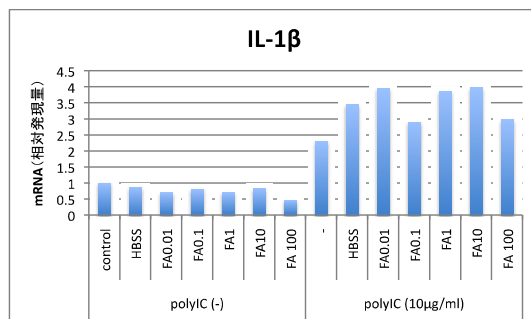


図2B

図2 Poly I: C (10  $\mu$ g/ml) 存在下24時間、ホルムアルデヒド (0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) 添加後3時間のIL-8(A)及びIL-1 $\beta$ (B)の遺伝子発現レベル

また、ヒト気道上皮細胞株としてHBE1を用いた場合の*in vitro*の解析系にて、微生物関連物質 (polyI:C)と化学物質との複合効果がインターロイキン8の産生以外にも見られるかどうか、気道上皮細胞より分泌される多数の生理活性物質の同時定量を行なった結果、poly I:C曝露によりIL-8やIL-1 $\beta$ 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にホルムアルデヒドを加えた場合には、poly I:C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。

#### D. 考察

これまで、ヒト気道上皮細胞株を用いた*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。その結果、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、化学物質ごとに特徴的な遺伝子発現マーカーを検索することが必要であると思われる。これまでヒト気道上皮系の細胞株として用いてきたBEAS2B細胞より、さらに好中球炎症応答を見る上で有用なHBE1細胞を用いた実験系を構築することで、さらに新たな知見が得られる可能性があり、炎症関連遺伝子発現誘導に関わるシグナル伝達経路や転写メカニズムを明らかにすることが有用と考えられた。

## E. 結論

シックハウス症候群の細胞モデルとして、ヒト気道上皮細胞株を用いた毒性化学物質による炎症応答検出系は、BEAS2Bのみならず HBE1 細胞も使用可能であり、この分野における *in vitro* での好中球性炎症の解明に有用である可能性が示された。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

1. 慶長直人. 副鼻腔気管支症候群：日本からアジアへ. *Therapeutic Research*, 2016;37:569-571.

#### 2) 雑誌

1: Thuong PH, Tam DB, Sakurada S, Hang NT, Hijikata M, Hong LT, Ngoc PT, Anh PT, Cuong VC, Matsushita I, Lien LT, Keicho N. Circulating granulysin levels in healthcare workers and latent tuberculosis infection estimated using interferon-gamma release assays. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):580.

2: Nakauchi A, Wong JH, Mahasirimongkol S, Yanai H, Yuliwulandari R, Mabuchi A, Liu X, Mushiroda T, Wattanapokayakit S, Miyagawa T, Keicho N, Tokunaga K. Identification of ITPA on chromosome 20 as a susceptibility gene for young-onset tuberculosis. *Hum Genome Var.* 2016 ;3:15067.

3: Hijikata M, Matsushita I, Le Hang NT, 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 Immun.* 2016;17(4):207-12.

4: 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.* 2016;138(1):281-283.e13.

### 2. 学会発表

#### 国際学会発表

1. N. Keicho. Genetic susceptibility to tuberculosis: the host and pathogen. TB Institutes Academic Forum 2016, Jeju, Korea, September 5-6, 2016

2. P. H. Thuong, N. T. L. Hang, S. Maeda, I. Matsushita, D. B. Tam, M. Hijikata, L. T. Lien and N. Keicho. Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma responses, the Beijing-lineage, and plasma adipocytokine levels in patients with active tuberculosis. 47th Union World Conference on Lung Health, Liverpool, UK, October 26-29, 2016

#### 国内学会発表

1. 慶長直人, 前田伸司, 松下育美, 櫻田紳策 and 土方美奈子. ベトナムハノイ市で検出される結核菌の特徴と再発の関連性について. 第91回日本結核病学会総会, 金沢, 5月26-27日, 2016

2. 松下育美, 土方美奈子, 吉. 崇,

野内英樹, 樋口一恵, 原田登之 and 慶長直人. 活動性結核患者の IGRA 偽陰性化に関わる因子の検討. 第 91 回日本結核病学会総会 金沢, 5 月 26-27 日, 2016

3. 土方美奈子, 松下育美 and 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 金沢, 5 月 26-27 日, 2016

4. 瀬戸真太郎, 慶長直人. 結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構. In: 第 91 回日本結核病学会総会: 5 月 26-27 日 2016; 金沢; 2016

5. 前田伸司, 松下育美, 土方美奈子 and 慶長直人. ハノイ地区の結核再治療群から分離された結核菌の遺伝系統と型別. 第 91 回日本結核病学会総会, 金沢, 5 月 26-27 日, 2016

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 28 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・客員研究員

### 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。

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 SH 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 28 年度（今年度）はテトラデカン（指針値：0.04 ppm）について 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、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。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。その結果、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及びアセトアルデヒドと同様に 5 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 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。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 年の検討会が掲げる化学物質（ガス体 11 種）の生体影響との異同は、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と考える。ここで検出される 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ている。



## 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（SH）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 PerceIome 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。

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SH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28年度）は、テトラデカン（指針値：0.04 ppm）について検討した。

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。

## 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 で一晚浸漬し、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 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 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 PerceIome 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28年度)は、テトラデカン(tetradecane; 分子量198.4、CAS No. 629-59-4、和光純薬工業)についてデータ解析を進めた。先行研究と同じものを使用した。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に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(テトラデカン:0.04 ppm)を参照し、公比10で(0、0.04、0.12及び0.40 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、テトラデカンについて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: S Hレベルでのテトラデカン [2時間単回]暴露時の遺伝子発現変動解析:

C-1-1: テトラデカン [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794 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; V S P)として51 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)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839 ps、V S Pとして4 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、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr2およびIer2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、Arc、Dusp1、Nr4a1およびIer2遺伝子については有意に、Fos、JunbおよびEgr2遺伝子についてはその傾向が認められた。

このIEGの遺伝子の内、Arc、Fos、Dusp1、Junb、Nr4a1およびIer2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。

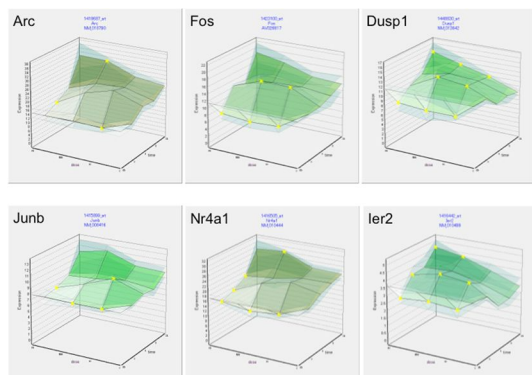


図 1 テトラデカン 2 時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Arc、Fos、Dusp1（上段、左から）及び Junb、Nr4a1、Ier2 遺伝子の発現変動

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。

C-1-2: テトラデカン [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 350 ps、このうち V S P として 8 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。

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 104 ps、このうち V S P として 7 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: テトラデカン [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 807 ps、このうち V P S として 46 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。

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 561 ps、このうち V S P として 6 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。

#### D . 考察

以上の通り、S H 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、平成 27 年度実施のホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、および平成 28 年度実施の 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。アセトアルデヒド及びテトラデカンについては、海馬におけるはじめての解析結果である。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26~28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、アセトアルデヒド及びテトラデカン暴露の際の一部の IEG で暴露終了24時間後に認められた。この事から、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。

平成28年度(今年度)までのホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、アセトアルデヒドおよびテトラデカンについて、図2に、IEGの遺伝子の内、Arc及びDusp1遺伝子の発現変動を示す。

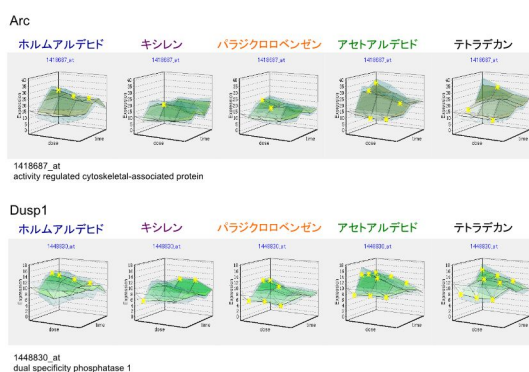


図2 ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、アセトアルデヒドおよびテトラデカン2時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Arc(上段)及び Dusp1(下段) 遺伝子の発現変動

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 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。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、両物質共に 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。ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、テトラデカン及び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 I11 の遺伝子の発現変動を図3に示す。

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 IL-1 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する。今後、他臓器連関により、IEG の転写を調節し得る IL-1 とは異なる新たな候補分子を探索する予定である。

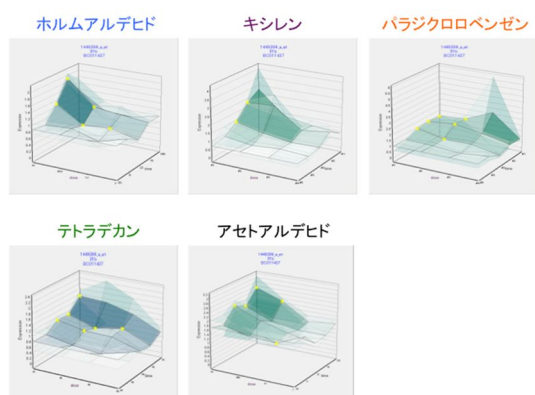


図3 ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、テトラデカン及びアセトアルデヒドにおける6時間/日×7日間反復曝露時の「肺」におけるIL1遺伝子の発現変動

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。

テトラデカン及びアセトアルデヒドの場合でも、発現増加が認められた。

## E . 結論

SHレベルでの2時間単回吸入曝露により、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、曝露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曝露(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、少なくとも曝露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、この理由は、肝・肺の連関解析から、6時間/日×7日間反復曝露時の肺において、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。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日間反復曝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する。また、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。

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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- 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.

### 2. 学会発表

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,

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曝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  
キシレン吸入曝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



平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金 (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・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の実証された。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する。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。

そこで平成 28 年度は、ホルムアルデヒドの幼若期暴露方法の再検討に向けた離乳後(4 週齢)の個別飼育による SH レベルでの 22 時間/日×7 日間反復暴露を実施し、成熟後の情動認知行動解析を検討したところ、遅発影響は認められず、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。

## 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、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 Perce llome 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 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。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）。

ただし、平成 27 年度（昨年度）に実施した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。すなわち授乳中であり、母マウス同居下の群飼いに、ホルムアルデヒドが母マウスの被毛などに吸着してしまったことが考えられた。そこで、平成 28 年度は、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。すなわち、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）の幼若期暴露方法の再検討のために、離乳後（4 週齢）の雄性マウスを対象に、極低濃度下（0、1.0 ppm）（1.0 ppm は指針値の約 10 倍濃度）、個別飼育による 22 時間/日×7 日間反復吸入暴露を実施し、成熟後(12 週齢時)に情動認知行動解析（2 用量、6 群構成、各群 8 匹）を検討した。こ

の際の4週齢という週齢は、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、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)を選択した。予備検討の際、吸入チャンバー内にて、2.5、3あるいは4週齢にて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、いずれも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、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 $\mu$ )を、床敷と金網ケージが密着するように敷いているが、体温調節を支える為、更に金網ケージ内にも敷き検討したところ、4週齢であれば個別飼育が出来る事を確認した。

#### (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おこない、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は指針値の約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])のマウスの情動認知行動につ

いて解析した。その結果、対照群と比較し有意な低下は認められず、遅発影響は認められなかった。

#### D. 考察

平成26及び27年度の検討では、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、指針値の約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を有することを確認したものとする。

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(平成27年度)の幼若期暴露の場合は遅発影響が認められなかった。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、この群飼いに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、離乳後(4週齢)の個別飼いで22時間/日×7日間反復吸入暴露を実施し、成熟後([12週齢])のマウスの情動認知行動について解析したが、遅発影響は認められなかった。

この原因として、ホルムアルデヒドが吸収されてしまっていることによる暴露量不全を完全には否定できない。

さらに、幼若期影響として検討するには4週齢では遅すぎる事も考えられた。すなわち、マウスにおいては、生後1-3週齢が臨界期に相当するとされており、シナプスの刈り込みによる神経回路の調整がなされる

が、生後4週齢時の離乳期マウスでは、その時期をほぼ終えたと考えられる。従って離乳期マウスに対してのホルムアルデヒド吸入暴露による中枢影響は、極めて限定的であるか、一過性のものであることが推察される。

## 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、指針値の約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、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を有することを確認したものとする。

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。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22時間/日×7日間反復吸入暴露を実施し、成熟後([12週齢])のマウスの情動認知行動について解析したが、遅発影響は認められず、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。従って、幼若期暴露影響については、母マウスの被毛に吸着し易い化学物質については、今後、再検討する必要があると考えられる。

本研究により、急増中の新規物質につい

て、少なくとも、平成 14 年の厚生労働省シ  
ックハウス問題に関する検討会」が掲げる  
化学物質（ガス体 11 種）との異同は、高精  
度に判定可能となったものとする。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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）

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.)

#### H. 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