



Photo 5 捕集管採気用ポンプ MP -30、(柴田科学)



図5. ホルムアルデヒドの発生装置

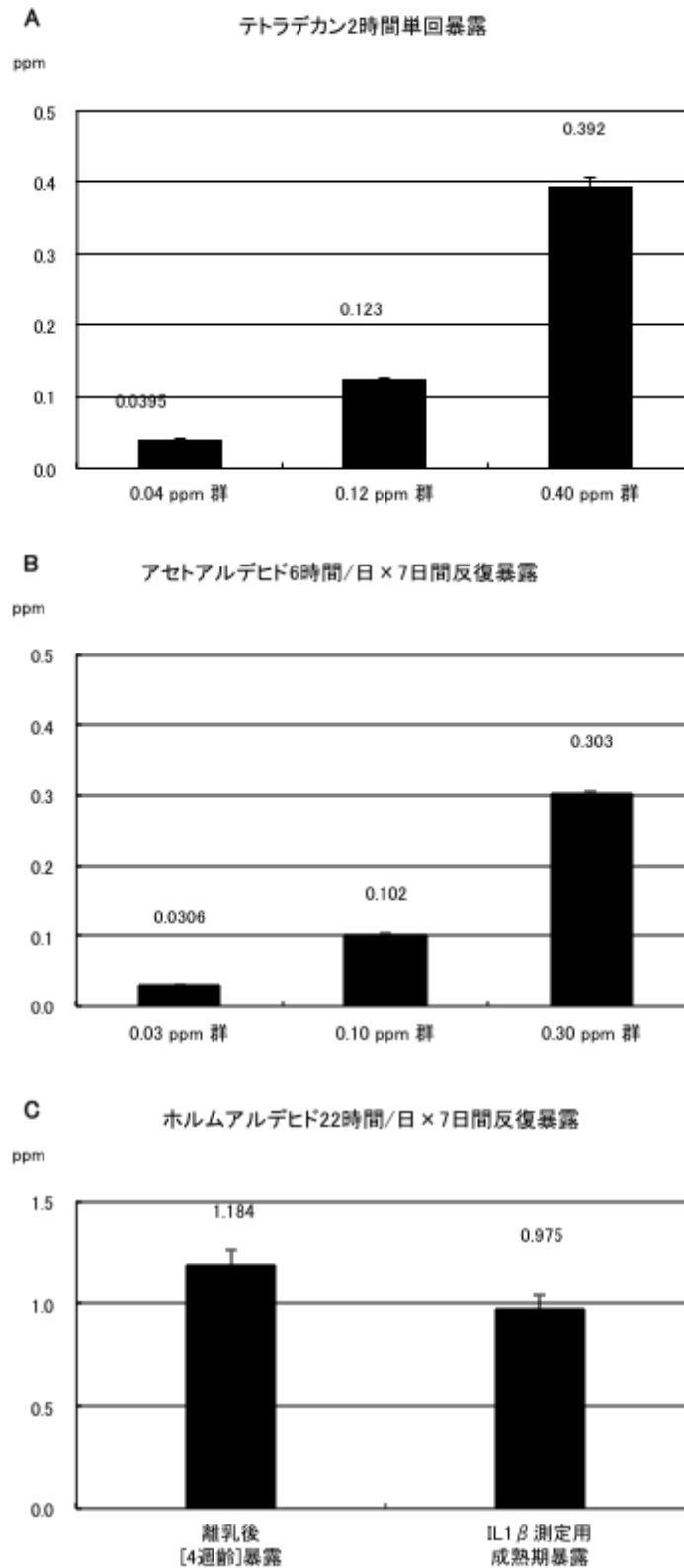


図6 テトラデカン、アセトアルデヒド及びホルムアルデヒド暴露濃度の測定結果
 A: テトラデカン2時間単回暴露の場合、B: アセトアルデヒド6時間/日×7日間反復暴露の場合、C: ホルムアルデヒド22時間/日×7日間反復暴露の場合(平均値±標準偏差)。平均値をグラフ中に記載した。

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）
平成26年度～28年度 総合研究報告書（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いるが、どのような機構が背景にあるかは十分に明らかにされていない。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、我々はこれまでヒト気道上皮細胞株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* での影響を中心に検討してきた。平成26年度は、ヒト気道上皮細胞株（BEAS2B細胞）を用いた *in vitro* の炎症応答検出系により、パラジクロロベンゼン、ダイアジノン、スチレン、テトラデカン、フェノブカルブの5種のシックハウス関連化学物質の複合的な作用が見られるか否かを *in vitro* 解析系により検討した。平成27年度、これまで指標としてきた炎症応答関連のサイトカインに加え、実験動物による吸入毒性試験において遺伝子発現の変動が見られた因子(DUSP1)について、複合効果の有無を検討した。また、同様の実験動物による吸入毒性試験において、吸入暴露後の情動認知行動の異常が認められたキシレンについては、動物モデルで有意な遺伝子発現変化が報告された IL-1 β の変動についても検討した。その結果、IL-1 β 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-1 β 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。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ものの、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-1 β と DUSP1 は注目される。平成28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、さらに好中球性の炎症応答が正常細胞に近いといわれる HBE1細胞による実験系の構築を検討した。新規 *in vitro* 実験系を用いて、化学物質として、ホルムアルデヒドの影響を検討した結果、毒性化学物質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が、poly I:C 刺激後は、IL-8 の濃度依存的な産生増強傾向が認められた。これまでの検討から、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、また、多種多様なメカニズムを解析する為には、化学物質ごとに増強減弱する遺伝子発現マーカーを検索する必要がある。BEAS2B と HBE1 の二つの実験系を用いて、これらマーカーの相乗的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解明していくことで、より結果の信頼性が高まるものと期待される。

A. 研究目的

気道の細菌叢が最近注目されており、従来、無菌と考えられていた下気道からも、

16S rRNA 解析により、微生物の存在が注目されている。それら免疫/炎症応答を惹起する際に、環境中に存在する因子

(タバコや大気汚染物質、アレルゲンなども含まれる)と相互作用を起こして、応答を修飾するものと考えられる。他臓器の微生物叢もこの応答性に与ることが最近明らかになりつつあり、低濃度の化学物質は、それ自体では生体に大きな影響を与えないが、微生物叢の変化などによっては、炎症の増強などの有害な効果をもたらす可能性が推察される。実際に、ヒトの肺は常に、外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、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精神や身体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、我々はこれまでホルムアルデヒドを中心に検討を重ねてきた。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てきた。

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、ホルムアルデヒド以外には、キシレン、クロルピリホス、トルエン、アセトアルデヒド、

4種類の化学物質の影響についても検討してきた。

本研究班の3年間のうち、平成26年度は、さらにパラジクロロベンゼン、ダイアジノン、スチレン、テトラデカン、フェノカルブの5種類の化学物質について検討、IL-8 以外に分泌される生理活性物質についても多項目、同時定量を行い、poly I:C とホルムアルデヒドの複合効果について検討した。

平成27年度、吸入曝露動物モデルとヒト気道上皮細胞株を用いた細胞モデルにおける炎症関連遺伝子発現の比較検討をはじめた。これまで指標としてきた炎症応答関連のサイトカインに加え、実験動物による吸入毒性試験において遺伝子発現の変動が見られた因子(DUSP1)について、複合効果の有無を検討した。また、同様の実験動物による吸入毒性試験において、吸入曝露後の情動認知行動の異常が認められたキシレンについては、動物モデルで有意な遺伝子発現変化が報告された IL-1 β の変動についても検討した。

平成28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、さらに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

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

うち平成26年度はパラジクロロベンゼン(和光純薬工業:047-01315)、ダイアジノン(和光純薬工業:040-31891)、スチレン(和光純薬工業:191-08206)、テトラデカン(和光純薬工業:207-10705)、フェノバルブ(Sigma-Aldrich:45488)、平成27年度は、DUSP-1の遺伝子発現の変化を観察する目的には、パラジクロロベンゼン(和光純薬工業:047-01315)、キシレン(和光純薬工業:244-00081)、クロルピリホス(Tronto Research Chemicals社(株):C425300)、アセトアルデヒド(和光純薬工業:015-09576)、トルエン(和光純薬工業:204-01866)、ホルムアルデヒド(Polysciences Inc.: Cat No. 18814)の6種の化学物質を用いた。生理活性物質の測定には、キシレンおよびダイアジノン(和光純薬工業:040-31891)を用いた。平成28年度は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)を用いて検討を行った。

「細胞」

これまでの検討から、ヒト気道上皮細胞株の中で最も正常の細胞に近い応答性を維持している安定した株化細胞として、BEAS2B及び、ヒト気道上皮細胞株の中でも正常細胞に近い応答性を維持しており、特にIL-17を発現する株化細胞として、HBE1細胞を用いた。

「HBE1細胞の培養条件の検討」

(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 cm² 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」

HBE1細胞株を25 cm²フラスコで培養し(5×10⁵ cells/flask)、90% confluentで、poly I:C(1, 10 µg/ml)で24時間刺激後、各化学物質を段階希釈して各々数段階の濃度で3時間添加した後、細胞を回収、total RNAを抽出した。

「遺伝子発現解析のRT-PCR」

細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCRを実施した。発現遺伝子IL-8、IL-1などのmRNA発現レベルを測定した。

1 µgのtotal RNAをrandom primerを用いて逆転写反応を行い、反応液量の1/20を1 PCR反応に供し、IL8などmRNA発現レベルをTaqMan Gene Expression Assayを用いた定量的RT/PCRで測定した。内在性コントロールにはHuman GAPDHを用い、 $\Delta\Delta Ct$ 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算出した。

「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-1 β , 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

「新規選択した化学物質と poly I:C の IL-8 遺伝子及び IL-1 発現への影響」

平成 26 年度は化学物質として、A: パラジクロロベンゼン (10, 100, 1000 μ M)、B: ダイアジノン (9.84, 98.4, 984 μ M)、C: スチレン (10, 100, 1000 μ M)、D: テトラデカン (10, 100, 1000 μ M)、E: フェノブカルブ (10, 100, 1000 μ M) を選択し、BEAS2B 細胞株を poly I:C (10 μ g/ml) で 24 時間刺激後、各種化学物質を 3 時間添加することにより、IL-8 mRNA の定量を実施し、同様な効果が認められるか否か、検討した。

初めに poly I:C 刺激を加えない化学物質単独でも、各物質の高濃度では、IL-8 mRNA の上昇が認められたが、低濃度では明らかな効果が認められなかった。poly I:C 刺激後も、テトラデカンを除き、それぞれの化学物質の高濃度では、同様な傾向が認められたが、低濃度では、濃度依存的な増強効果は認められなかった (図 1A, B, C, D, E)。

図 1 A

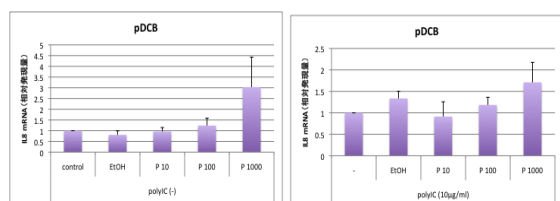


図 1 B

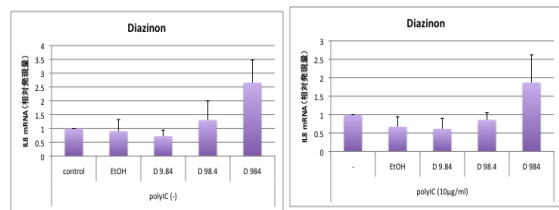


図 1 C

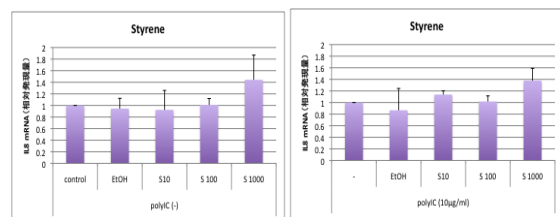


図 1 D

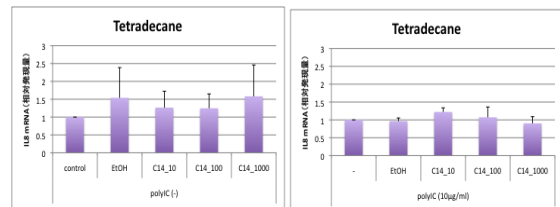


図 1 E

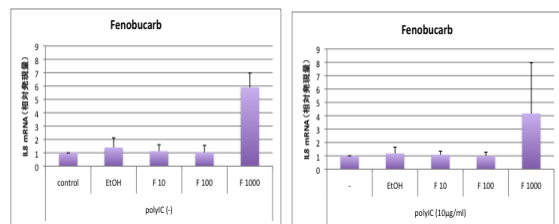


図 1 Poly I:C (10 μ g/ml) 非存在 (左) 存在 (右) 24 時間後、(A) パラジクロロベンゼン、(B) ダイアジノン、(C) スチレン、(D) テトラデカン、(E) フェノブカルブ添加して、3 時間後の IL-8 の遺伝子発現量について、化学物質無添加を 1 としたときの相対発現レベル (3 回の実験の平均と \pm 標準偏差) を表示した。

次に、動物モデルの肺において遺伝子発現の差異が認められた IL-1 β についても mRNA 発現量を指標にして、微生物関連物質 (polyI:C) と各種化学物質との複合効果が見られるか否かを確認した。polyI:C 刺激に関わらず、高濃度のパラジクロロベンゼンを添加した場合には、IL-1 β mRNA の発現が上昇した (図 2)。

図 2A

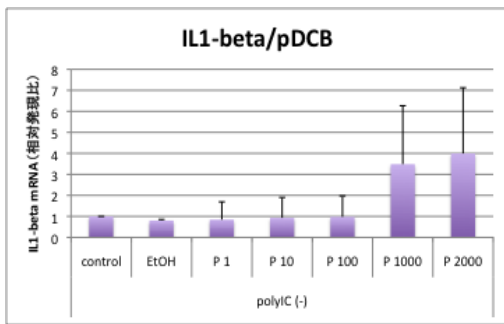


図 2B

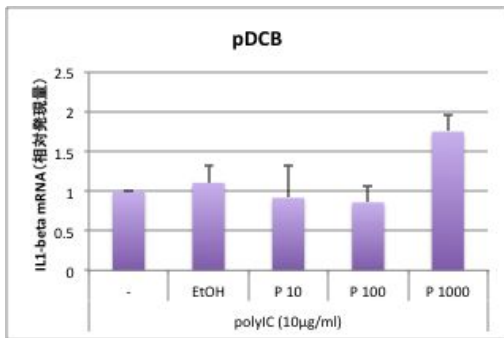


図 2 (A) Poly I:C 非存在、(B) Poly I:C (10 μ g/ml) 存在下 24 時間、パラジクロロベンゼン添加後 3 時間の IL-1 β の遺伝子発現レベル

「生理活性物質の測定」

微生物関連物質 (polyI:C) と化学物質との複合効果が気道上皮細胞より分泌されるサイトカイン、ケモカインなどのタンパクレベルにおいても見られるか否か、培養上

清中の生理活性物質の同時定量を始めた。今回、刺激に用いた化学物質は、平成 25 年度に検討を行ったキシレン、クロロピリホス、トルエン、アセトアルデヒドの内、微生物関連物質 poly I:C 曝露により、ホルムアルデヒド以外で、IL-8 の遺伝子発現増強効果の認められたクロロピリホスと、平成 26 年度に検討を行った IL-1 β の遺伝子発現の上昇を含めて、効果の見られたパラジクロロベンゼンを選択した。poly I:C 曝露により IL-8 や IL-1 β 以外の多数のサイトカイン・ケモカイン類が誘導されたが、化学物質として poly I:C にクロロピリホスを加えた場合には、poly I:C 単独に比べて、多種類の免疫細胞に作用するケモカインである IP-10 の、明らかな産生増強効果が認められた (図 3A)。一方、パラジクロロベンゼンを添加した場合、poly I:C 曝露単独に比べて、明らかな産生増強効果は認められなかった。

同様のパターンが、好酸球性炎症に關与するケモカインとして知られる RANTES においても認められた (図 3B)。

図 3A

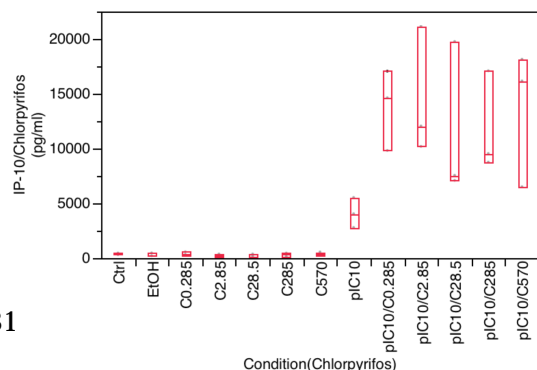
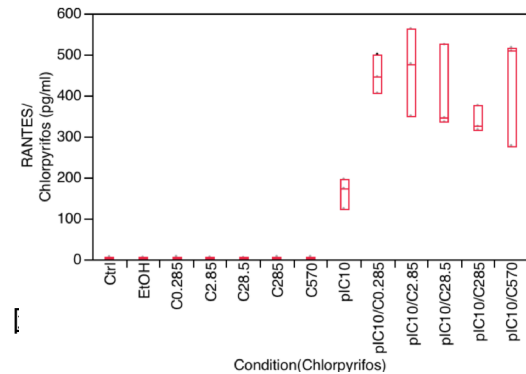


図3 Poly I:C (10 µg/ml) 非存在(左) 存在(右) 24時間後、クロロピリホス添加3時間後の培養上清中のIP-10量(A)、及びRANTES量(B)

「吸入曝露動物モデルとヒト気道上皮細胞株を用いた細胞モデルにおける炎症関連遺伝子発現の比較検討」

吸入曝露動物モデルにより得られた遺伝子発現量に有意な変化が見られたDUSP1について、その遺伝子発現様式を、ヒト気道上皮細胞株を用いた細胞モデルにおいて検討した。すなわち、DUSP1のmRNA発現量を指標にして、微生物関連物質 (polyI:C) と各種化学物質との複合効果が見られるか否かを観察した。化学物質としては、動物モデルで使用された A: パラジクロロベンゼン (100, 1000, 2000 µM)、B: キシレン (10, 100, 1000 µM)、C: ホルムアルデヒド (1, 10, 100 µM)、D: クロロピリホス (28.5, 285, 570 µM)、E: アセトアルデヒド (50, 500, 5000 µM)、F: トルエン (10, 100, 1000 µM) を選択し、BEAS2B 細胞株を poly I:C (10 µg/ml) で 24 時間刺激後、各種化学物質を 3 時間添加することにより、DUSP1 mRNA の定量を実施した。

その結果、パラジクロロベンゼン、クロロピリホス、アセトアルデヒドでは、DUSP1 の産生増強傾向が認められた。キシレンにおいては、この傾向は弱く、ホルムアルデヒドにおいても、DUSP1 の発現増強効果は弱かった。トルエンにおいては、DUSP1 の発現増強傾向は認められなかった。(図 4A, B, C, D, E, F)

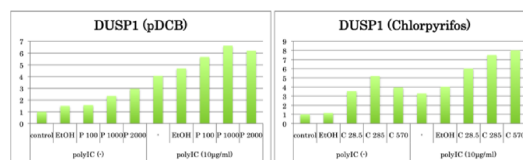


図 4A

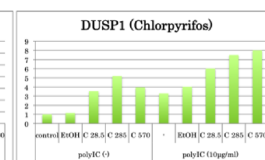


図 4B

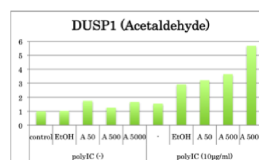


図 4C

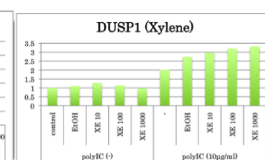


図 4D

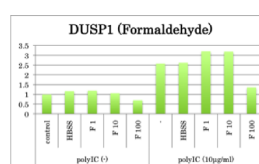


図 4E

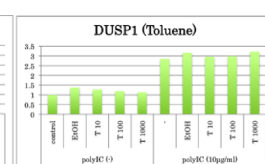


図 4F

図 4 Poly I:C (10 µg/ml)存在下 24 時間後、A: パラジクロロベンゼン、B: クロロピリホス、C: アセトアルデヒド、D: キシレン、E: ホルムアルデヒド、F: トルエンを添加して、3 時間後の DUSP1 の遺伝子発現量について、化学物質無添加を 1 としたときの相対発現レベルを表示した。

動物モデルで吸入曝露後の情動認知行動の異常が認められたキシレン及び、IL-8 の発現増強効果が微弱ながら認められているダイアジノンについて、ヒト気道上皮細胞株を用いる *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。

その結果、poly I:C 曝露によりヒト気道上皮細胞株からは、IL-8 や IL-1β 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 にキシレン

を加えた場合には、poly I:C 単独に比べて、炎症性疾患において単球および T 細胞の組織浸潤に關与するとされる MCP-1、及び好酸球性炎症に關与するケモカインとして知られる RANTES の産生増強効果が微弱ではあるが認められた (図 5A、B)。一方、ダイアジノンを追加した場合、poly I:C 曝露単独に比べて、明らかな産生増強効果は認められなかった。

図 5A

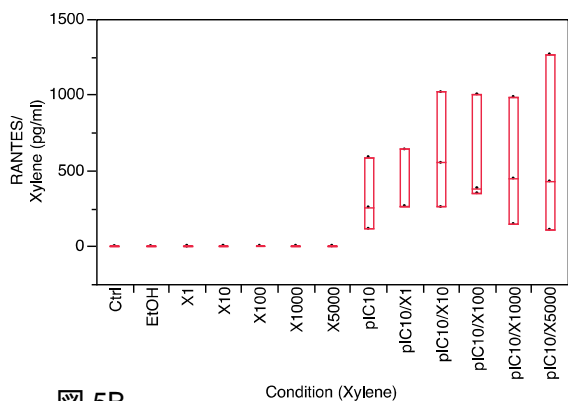
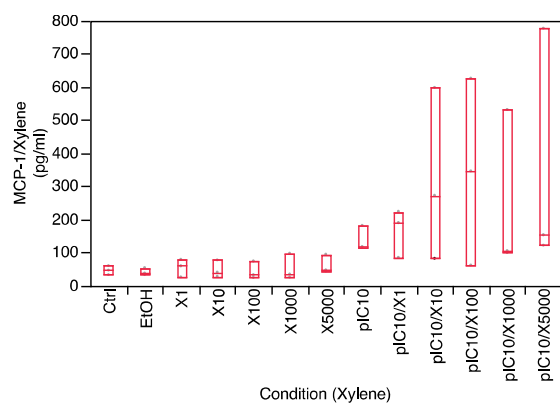


図 5B

図 5 Poly I:C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 非存在 (左) 存在 (右) 24 時間後、キシレン添加 3 時間後の培養上清中の (A) MCP-1 (B) RANTES 量

また、吸入曝露動物モデルにより遺伝子発現の有意な差異が認められたことより昨年度測定対象とした IL-1 β の発現量については、タンパクレベルでは差がみら

れなかったが、mRNA については、キシレン、ダイアジノンどちらの場合も polyI:C 刺激に関わらず、高濃度添加した場合には、IL1- β mRNA の発現が上昇した (図 6A、B)

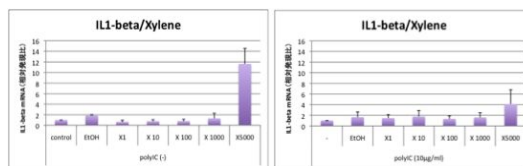


図 6A

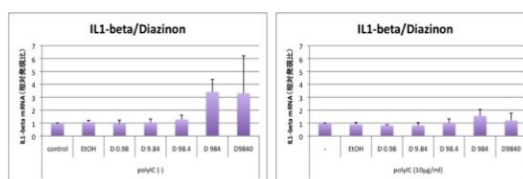


図 6B

図 6 Poly I:C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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-1 β 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 7A、B)。

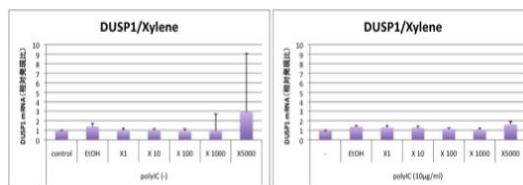


図 7A

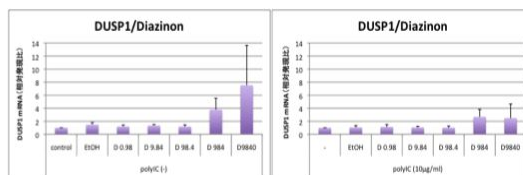


図 7B

図 7 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

「HBE1 細胞を用いた新規実験系におけるホルムアルデヒドと poly I:C の免疫炎症関連遺伝子発現への影響」

培養条件は、検討の結果、BEGM 培地でコーゲンコート of 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 8) 以降の実験では、この培養条件で行った。

図 8

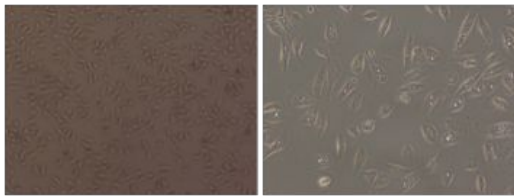


図 8 培養 4 日目、A: BEGM/コーゲンコート、B: D-medium/コーゲンコート、C: BEGM/コーゲンコートなし、D: D-medium/コーゲンコートなし

化学物質の検討には、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-1β 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 µg/ml) で 24 時間刺激後、ホルムアルデヒド (0.01-100 µM) 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 µM) では、やや低下する傾向が認められた。IL-1β 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 9A, B)。

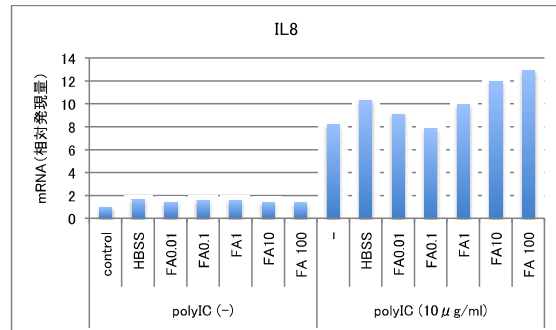


図 9A

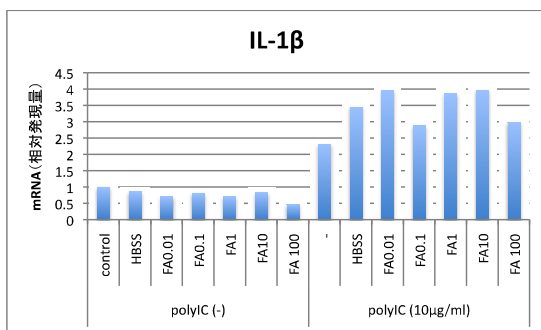
図 9B

図 9 Poly I:C (10 µg/ml) 存在下 24 時間、ホルムアルデヒド (0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) 添加後 3 時間の IL-8(A) 及び IL-1β (B) の遺伝子発現レベル

D. 考察

ヒト気道上皮細胞株 (BEAS2B 細胞) を用いた *in vitro* の炎症応答検出系により、パラジクロロベンゼン、ダイアジノン、スチレン、テトラデカン、フェノプカルブの 5 種のシックハウス関連化学物質の複合的な作用については、poly I:C 刺激を加えない化学物質単独でも、各物質の高濃度では、IL-8 mRNA の上昇が認められた。poly I:C 刺激後も、テトラデカンを除き、それぞれの化学物質の高濃度では、同様な傾向が認められたが、低濃度では、濃度依存的な増強効果は認められなかった。このように化学物質の種類により、シックハウス症候群における炎症応答・発症機序が異なっていることが推測される。多種多様なメカニズムを解析する為には、化学物質ごとに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、吸入曝露動物モデルとヒト気道上皮細胞株を用いた細胞モデルにおける炎症関連遺伝子発現の比較検討の結果、吸入曝露動物モデルにより遺伝子発現の有意な差異が認められた IL-1 β の発現については、高濃度のパラジクロロベンゼンにおいて上昇がみられた。逆に、IL-8 遺伝子発現増強効果の見られたホルムアルデヒドでは、IL1- β mRNA の産生増強の効果は確認さ



れなかった。実験動物による吸入毒性試験において、吸入曝露後の情動認知行動の異常が認められたキシレンについても、IL-1 β の変動について検討した。キシレンを高濃度添加した場合に、BEAS2B 細胞モデルで、IL-1 β 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。

これまでの結果から、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。また、多種多様なメカニズムを解析する為には、化学物質ごとにマーカーを検索することが必要であると思われる。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検討した。このような *in vitro* 実験系を複数の細胞株で構築することにより、より信頼性の高い結果が得られ、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など分子レベルでの解析になるものと期待される。

E. 結論

ヒト気道上皮細胞株を用いた *in vitro* 系においては、微生物由来物質の存在により、複数の化学物質の吸入曝露による有害作用が増強される可能性を示しており、化学物質のヒトへの影響を見る際の細胞モデルとして有用と思われた。シックハウス関連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、化学物質ごとに増強減弱する遺伝子発現マーカーを検索することが必要であった。BEAS2B と HBE1 の二つの実験系を用いて、これらマーカーの相乗的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解明していくことで、より結果の信頼性が高まるものと期待される。

動物モデルで有意な遺伝子発現について、細胞モデル、臨床との対比を行うことで、よりの確な評価系が構築されるものと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

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.
6. 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. Hijikata M, Matsushita I, Hang NT, et al. Age-dependent association of mannose-binding lectin polymorphisms with the development of pulmonary tuberculosis in Viet Nam. Hum Immunol. Aug 2014;75(8):840-846.
2. Hang NT, Matsushita I, Shimbo T, et al. Association between tuberculosis recurrence and interferon-gamma response during treatment. The Journal of infection. Jun 21 2014;69:616-626.
3. 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.

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, in press.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

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

7. 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. 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 k, 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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-
平成 26 年度～28 年度 総合研究報告書
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核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。

本研究の成果として、キシレン（平成 26 年度実施、指針値：0.2 ppm）、パラジクロロベンゼン（平成 26 年度実施、指針値：0.04 ppm）、ホルムアルデヒド（平成 27 年度実施、指針値：0.08 ppm）、アセトアルデヒド（平成 27 年度実施、指針値：0.03 ppm）及びテトラデカン（平成 28 年度実施、指針値：0.04 ppm）について目標通りに SH レベル（キシレン：0、0.2、0.7、2.0 ppm、パラジクロロベンゼン：0、0.04、0.12、0.4 ppm、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、テトラデカン：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。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) の発現の抑制が、暴露 2 時間直後の時点で指針値レベルの濃度から観測され、その程度は先行研究での反復暴露（7 日間）と同等であり、海馬神経活動の抑制を示唆する所見も再確認された。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。以上、本研究の成果として、急増中の新規物質について、それが 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。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、11b 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、11b 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 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 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。平成 26 年度は、キシレン (指針値: 0.2 ppm) とパラジクロロベンゼン (指針値: 0.04 ppm) 平成 27 年度は、ホルムアルデヒド (指針値: 0.08 ppm) とアセトアルデヒド (指針値: 0.03 ppm) 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。

アセトアルデヒド及びテトラデカン吸入

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 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

遺伝子発現変動解析

全 RNA 5 μ g 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 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

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）を実施する。採取組織は、肺・肝・脳4部位（海馬、皮質、脳幹、小脳）とする。ホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量: 30.03、CAS No. 50-00-0) は先行研究と同じく、ホルムアルデヒド液 [ホルムアルデヒド 37.3%、メタノール 7.4%含有、ギ酸含量 0.04%以下]、和光純薬工業) を使用した。キシレン (xylene; 分子量: 106.2、CAS No. 1330-20-7、和光純薬工業) は先行研究と同じく、位置異性体である o-、m-、p-体、及び、構造異性体であるエチルベンゼンの混合からなるキシレンを使用した。これは、特定の位置異性体のみを必要量用意することが困難であることと、実際のヒト暴露を想定すると市販の混合キシレンによる実験が不適切ではないとの判断による。パラジ

クロロベンゼン (paradichlorobenzene; 分子量 147.0、CAS No. 106-46-7、和光純薬工業)、アセトアルデヒド (acetaldehyde; 分子量 44.05、CAS No. 75-07-0、シグマ-アルドリッチ) 及びテトラデカン (tetradecane; 分子量 198.4、CAS No. 629-59-4、和光純薬工業) も先行研究と同じものを使用した。

（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、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 S レベルでのキシレン [2時間単回] 暴露時の遺伝子発現変動解析 (平成 26年度実施) :

C-1-1: キシレン [2時間単回] 暴露時の「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析 (平成 26年度実施) :

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 4,390 ps、このうち目視により生物学的な変化を反映すると判定されたもの (Visually selected ps; V S P) として 255 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また神経系の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークとして、GABA 受容体 (Gabbr2、Gabbr3) 遺伝子の発現増加が 24 時間に用量依存的

に認められ、この事から抑制性神経伝達物質 GABA 作動性ニューロンが活性化し、海馬での神経活動が抑制される事が示唆された。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)における Upstream Analysis を用いて検討した。この内、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tgf 1 が抽出されてきた。しかし、Tgf 1 の顕著な発現変動は、肺・肝とともに、また先行研究を含む 3 つの暴露プロトコールともに認められなかった。

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に減少するものとして 4,160 ps、VSP として 24 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかったが、神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) の発現が、2 時間に指針値レベルの濃度から、また先行研究での反復暴露 ([6 時間/日 \times 7 日間及び 22 時間/日 \times 7 日間]) での場合と同程度に強く抑制され、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。具体的には、Fos、Dusp1、Nr4a1 及び Ier2 遺伝子の有意な発現減少、また Arc、Junb、Egr4 及び Kl f2 遺伝子の発現減少傾向が認められた。また、これらの遺伝子の発現抑制は、その 2 時間後の 4 時間の観測時点には回復していた。先行研究における反復暴露の際に認められた、暴露休止後の IEG 遺伝子発現のリバウンド現象は認められなかった。

この IEG の遺伝子の内、Fos 及び Dusp1 遺伝子の発現変動を図 1 に示す。図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。具体的には、縦軸 (Z 軸) に絶対値化した (細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間を取り、

各条件の $n=3$ の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差 (SD) 平面 (薄い色) を示す。

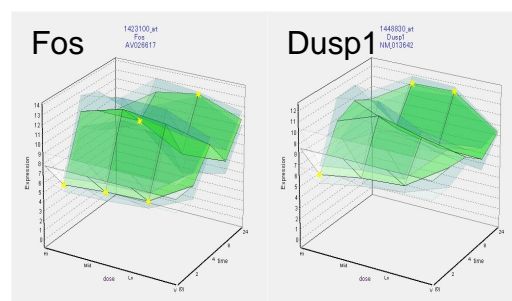


図 1 キシレン 2 時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Fos 及び Dusp1 遺伝子の発現変動

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中にを付した。

いずれも同様な発現パターンを示した。

IEG 遺伝子を含む発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。この内、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tnf 及び I11 が抽出されてきた。この内、I11 は先行研究での 6 時間/日 \times 7 日間反復暴露の際に、肺・肝ともに増加が

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

C-1-2: キシレン [2 時間単回] 暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析 (平成 26 年度実施):

発現が有意(t 検定での P 値 < 0.05)に増加するものとして 2,345 ps、VSP として 301 ps が見いだされた。肺の有害影響に係る遺伝子あるいはシグナルネットワークとして、酸化ストレス、ユビキチン化、グルタチオン代謝系が見いだされた。酸化ストレス関連遺伝子として具体的には、Aox1(2 及び 4 時間、高用量)、Hmx1(2、4 及び 8 時間、中・高用量)、Nfe2l2(2 時間、高用量)、Prdx 1 (2、4 及び 24 時間、高用量)、Txnrd1(2、4 及び 8 時間、高用量) 及び Srxn1 遺伝子(2、4 及び 8 時間、中・高用量; 24 時間、高用量)、またグルタチオン代謝関連遺伝子として、Gss、Gsta4、Gsta2 (4 及び 8 時間、中・高用量; 24 時間、高用量)、Gsto1(4、8 及び 24 時間、中・高用量)、Gsta1(2 及び 24 時間、高用量; 4 及び 8 時間、中・高用量)、Gsta2、Gpx2(2 及び 24 時間、高用量; 4 及び 8 時間、中・高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。IPA による検索でもこれらのネットワークが抽出された。したがって、SHS レベルのキシレン 2 時間単回吸入暴露の肺において、酸化ストレスが生じている事が示唆された。この内、Hmx1、Srxn1、Gsta4 及び Gpx2 遺伝子の発現変動について図 2 に示す。

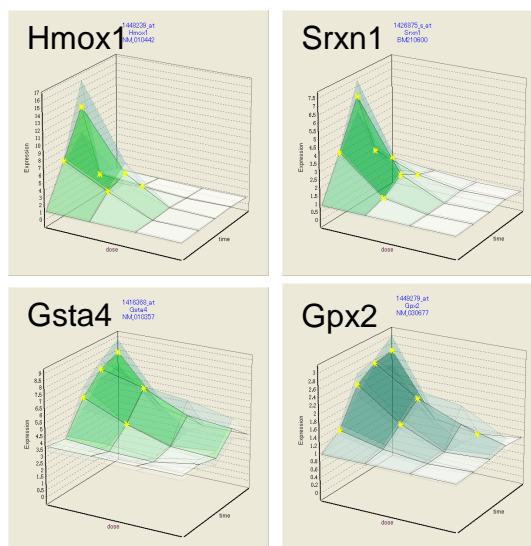


図 2 キシレン 2 時間単回暴露時の「肺」における酸化ストレス関連遺伝子 Hmx1 及び Srxn1 遺伝子、及びグルタチオン代謝関連遺伝子 Gsta4 及び Gpx2 遺伝子の発現変動

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中にを付した。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、転写因子として Nfe2l2 (Nrf2) 及び Atf4 が認められ、酸化ストレスは、Nrf2 あるいは Atf4 を介して生じていることが示唆された。一方、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tgfb1、Pdgf bb、Tnf 及び Il1 が抽出されてきた。この内、IL1 は先行研究での 6 時間/日 × 7 日間反復暴露の際に、肺・肝ともに増加が認められたが、それ以外の各遺伝子では顕著な発現変動は、3 臓器に

亘り、いずれの暴露プロトコールでも認められなかった。

他方、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして2,151 ps、VSPとして14psが見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

C-1-3: キシレン [2時間単回]暴露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析(平成26年度実施):

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして836 ps、このうちVSPとして154 psが見いだされた。肝の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*)を、IPAにおけるUpstream Analysisを用いて検討した。その結果、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、IL1とTnfが抽出されてきた。この内、IL1は先行研究での6時間/日×7日間反復暴露の際に、肺・肝ともに増加が認められたが、Tnf遺伝子では顕著な発現変動は、いずれの暴露プロトコールでも認められなかった。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして1,019 ps、このうちVSPとして120 psが見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

C-2: SHSレベルでのパラジクロロベンゼ

ン [2時間単回]暴露時の遺伝子発現変動解析(平成26年度実施):

C-2-1: パラジクロロベンゼン [2時間単回]暴露時の「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析(平成26年度実施):

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして2,496 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたVPSとして397 psが見いだされた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また神経系の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークとして、GABA受容体(Gabrb1、Gabrb2及びGabrb3)遺伝子の増加が、24時間に用量依存的に認められ、この事から抑制性神経伝達物質GABA作動性ニューロンが活性化し、海馬での神経活動が抑制される事が示唆された。

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

他方、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして3,246 ps、このうちVSPとして19 psが見いだされた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかったが、神経活動の指標となるImmediate early gene (IEG)の発現が、2時間に指針値レベルの濃度から、また先行研究での反復暴露([6時間/日×7日間及び22時間/日×7日間])での場合と同程度に強く抑制され、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。具体的には、Fos、Dusp1、Nr4a1及びIer2遺伝子の有意な発現減少、またArc、Junb、Egr4及びKlf2遺伝子の発現減少傾向が認められた。また、これらの遺伝子の発現抑制は、その2時間

後の 4 時間の観測時点には回復していた。先行研究における反復暴露の際に認められた、暴露休止後の IEG 遺伝子発現のリバウンド現象は、Fos、Dusp1、Junb、Egr4 及び Ier2 遺伝子については、24 時間に認められた。この IEG の遺伝子の内、Fos 及び Dusp1 遺伝子の発現変動について図 3 に示す。

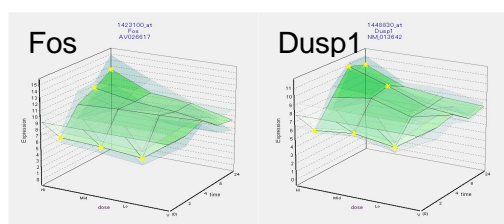


図 3 パラジクロロベンゼン 2 時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Fos 及び Dusp1 遺伝子の発現変動

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の *t* 検定によりおこない *P* 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中にを付した。

いずれも同様な発現パターンを示した。

IEG 遺伝子を含む発現減少が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*)を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。この内、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、I11 が抽出されてきた。I11 は先行研究での 6 時間/日×7 日間反復暴露の際に、肺・肝ともに増加が認められたが、2 時間単回暴露時には 3 臓器ともに、顕著な発現変動は認められなかった。

C-2-2: パラジクロロベンゼン [2 時間単

回]暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析(平成 26 年度実施):

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

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*)を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、サイトカイン、ケモカインに関するものとして、Tgfb1 が抽出されてきたが、Tgfb1 遺伝子の顕著な発現変動は、3 臓器に亘り、いずれの暴露プロトコールでも認められなかった。I11 は抽出されなかった。

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

C-2-3: パラジクロロベンゼン [2 時間単回]暴露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析(平成 26 年度実施):

発現が有意(*t* 検定での *P* 値 < 0.05)に増加するものとして 1,736 ps、このうち V P S として 228 ps が見いだされた。肝の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*)を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、サイトカイ

ン、ケモカインに関するものとして、Tgfb1 が抽出されてきたが、Tgfb1 遺伝子の顕著な発現変動は、3臓器に亘り、いずれの暴露プロトコルでも認められなかった。111 は抽出されなかった。

他方、発現が有意(t 検定での P 値 < 0.05) に減少するものとして 776 ps、このうち V S P として 16 ps が見いだされた。肺の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった

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

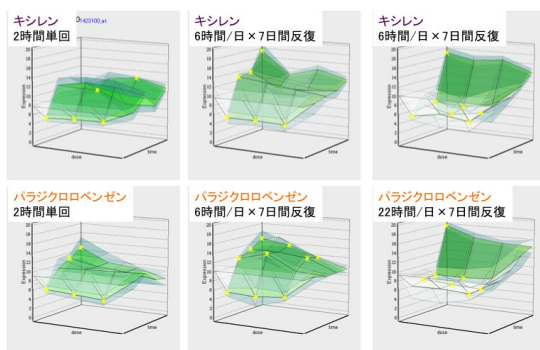


図 4 Fos 遺伝子の発現状況。キシレン(上段)及びパラジクロロベンゼン(下段)について、「海馬」における IEG の内、Fos 遺伝子の発現変動を、2 時間単回暴露時の場合(左)と 6 時間/日 × 7 日間反復(中)及び 22 時間/日 × 7 日間反復暴露(右)の場

合とを比較したもの

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中にを付した。縦軸(発現コピー数)のスケールは同一に揃えた。

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

C-3: S H S 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 (平成 27 年度実施):

C-3-1: 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 (平成 27 年度実施):

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、V P S として 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 V P S として 1 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。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-3-2: 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 (平成 27 年度実施):

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 V P S 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 V P S 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-3-3: 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 (平成 27 年度実施):

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 V P S 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 V P S 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-4: S H S 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 (平成 27 年度実施):

C-4-1: 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 (平成 28 年度実施):

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 V P S 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 V P S 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-4-2: 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 (平成 27 年度実施):

サンプリングは終了しており、今後解析

する。

C-4-3: 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 (平成 27 年度実施):

サンプリングは終了しており、今後解析する。

C-5: 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(平成 28 年度実施)):

C-5-1: 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 V P S 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、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 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 遺伝子については増加傾向が認められた。

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 5 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。加えてこの平均値曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す。

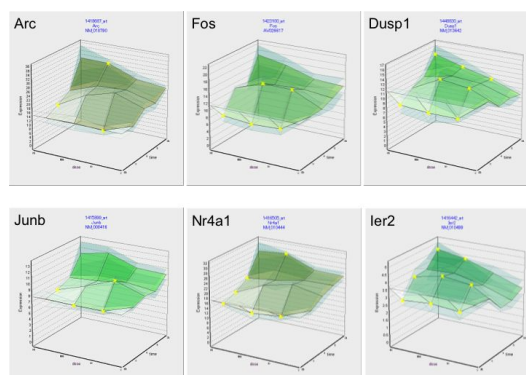


図5 テトラデカン 2 時間単回暴露時の「海馬」における IEG の内、Arc、Fos、Dusp1 (上段、左から)及び Junb、Nr4a1、Ier2 遺伝子 (下段、左から) 遺伝子の発現変動

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-5-2: 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 (平成 28 年度実施):

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-5-3: 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 (平成 28 年度実施):

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。

C-6: S H S 関連物質についての 6 時間/日 × 7 日間反復吸入暴露における I11b 遺伝子の肝・肺での比較解析 (平成 28 年度実施):

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 S H 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する。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について、6 時間/日 × 7 日間反復暴露時の肺における I11b の遺伝子の発現変動を図 6 に示す。

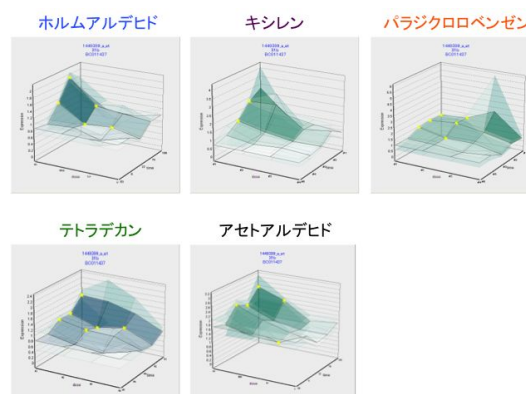


図6 ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、テトラデカンおよびアセトアルデヒドn 1つおいての6時間/日×7日間反復暴露時の「肺」におけるI11 遺伝子の発現変動

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。

D. 考察

以上の通り、SH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。このことから、IEGのリバウンド現象は、暴露時間に依存する事が示唆された。

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7に、IEGの遺伝子内の、Arc及びDusp1遺伝子の発現変動を示す。

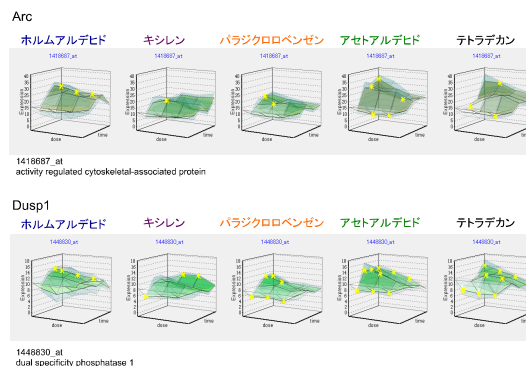


図7 ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、アセトアルデヒドおよびテトラデカン2時間単回暴露時の「海馬」におけるIEGの内、Arc(上段)及びDusp1(下段)遺伝子の発現変動

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。

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 等、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。

E . 結論

S H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)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。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。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S H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、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。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S H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、S H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(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- 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.

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.

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR

signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development*. (2014);141(11):2260-70.

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,

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.)

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 - 有機リン剤等暴露後の遅発性毒性の発現実験より -
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", Brussels, 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", Brussels, 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)

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

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学 Percellome トキシコゲノミクスの進捗、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25) 東京、シンポジウム

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス - 化学構造が異なる 3 物質の比較 -、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.3) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2) 神戸、シンポジウム

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、毒性の網羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日本毒性学会学術年会(2014.7.2)神戸、シンポジウム

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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－
平成 26 年度～28 年度 総合研究報告書
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考えられる。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、1.0ppm）（1.0ppm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 μ)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26年度はキシレンを対象とし、極低濃度下(0、2.0 ppm)(2.0 ppmは指針値の10倍濃度)、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(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)に情動認知行動解析を検討した。成熟期暴露の場合の解析

時点として、暴露終了日と暴露3日後の2つの時点を選択した。前者を選んだ理由は、先行研究での海馬における遺伝子発現解析から神経伝達の抑制を示唆するデータを有しており、この時点であれば情動認知行動異常が観察されると予想された為である。具体的には、神経伝達の抑制を示唆するIEGの発現低下は22時間暴露直後に、またその次の観測点である暴露休止24時間後には逆に発現のリバウンドが認められており、暴露終了日中は、IEGが発現低下している可能性が高いためである。他方、暴露3日後を選んだ理由は、この時点が当方で多くの解析データを有する遅発性の情動認知行動解析のプロトコールでの測定時点である為であり、これらのデータとの比較解析が可能となるためである。また幼若期マウスとして2週齢を選択した理由は、これも当方で多くの解析データを有する遅発性の情動認知行動解析のプロトコールでの暴露週齢である為であり、これらのデータとの比較解析が可能となるためである。

キシレンの成熟期暴露の場合の解析の結果、暴露終了日の時点では、オープンフィールド試験、明暗往来試験では対照群と比較し有意な変化は認められなかったが、条件付け学習記憶試験において空間-連想記憶及び音-連想記憶の有意な低下が認められた。一方、暴露3日後での解析では、全ての試験項目で対照群と有意な差は認められなかった。加えて、幼若期暴露後、成熟期での解析の結果、条件付け学習記憶試験において、音-連想記憶の有意な低下が認められた。

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考える。

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.

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.

Shirakata Y, Hiradate Y, Inoue H, Sato E and Tanemura K, Histone h4 modification during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev* 60(5): 383-387, 2014.

Inoue H, Hiradate Y, Shirakata Y, Kanai K, Kosaka K, Gotoh A, Fukuda Y, Nakai Y, Uchida T, Sato E and Tanemura K, Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Lett* 588(11): 2003-2008, 2014.

Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N,

Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, Roh SG, Uchida T, Katoh K, Yoshida M, Sato E, Tanemura K. Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice. *Biol Reprod*. 2014 Aug;91(2):53. Ohtake J, Sakurai M, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Expression of focal adhesion kinase in mouse cumulus-oocyte complexes, and effect of phosphorylation at Tyr397 on cumulus expansion. *Mol Reprod Dev*. 2015 Mar;82(3):218-31.

2. 学会発表 (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.)
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 - 有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の

発現実験より -
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.)

平賀孔、種村健太郎
マウスへのネオニコチノイド系農薬アセタミプリド単回曝露による遅発中枢影響の性差、第 41 回 日本毒性学会学術年会
(2014.7.)

種村健太郎、菅野 純
ネオニコチノイド系農薬による中枢神経影響解析および生殖機能影響解析、第 17 回環境ホルモン学会、第 17 回環境ホルモン学会研究発表会 (2014.12.)

古川佑介、種村健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純
アセチルコリンエステラーゼ阻害作用をもつ殺虫剤の暴露による遅発性の中枢神経影響の比較、第 17 回環境ホルモン学会研究発表会(2014.12.10)

平賀孔、種村健太郎
マウスへのネオニコチノイド系農薬アセタミプリド単回曝露による遅発中枢影響の性差、第 17 回環境ホルモン学会研究発表会
(2014.12.)

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

