

Ⅱ．分担研究報告書

平成30年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）（H29-化学一般-005）
シックハウス（室内空気汚染）対策に関する研究
－「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」が新たに指摘した室内汚染化学物質の、ヒトばく露濃度におけるハザード評価研究－

分担研究報告書

分担研究課題：「シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入ばく露実験の実施」

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	高橋祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	古川佑介	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部
	梅田ゆみ	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	相磯成敏	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部

研究要旨

人のシックハウス症候群（SH）の原因物質として、平成14年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」により13物質が、守るべき指針値と共に掲げられた。この指針値と、通常実施する吸入毒性試験で得られる無毒性量（病理組織学的な病変に基づく）を比較すると、両者には概ね1,000倍程度の乖離があることから、SHに関して毒性試験情報を人へ外挿することの困難さが行政施策上、問題とされてきた。これに対応すべく、先行研究にてガス体11物質を指針値レベルでマウスに7日間吸入ばく露し、肺、肝の遺伝子発現変動を高精度に測定し、そのプロファイル进行分析した（Percellome法）。うち、構造骨格の異なる3物質について、海馬の遺伝子発現変動、及び、情動認知行動を観測した。その結果、3物質が共通して神経活動の抑制を示唆する変動を誘発すること、及び、それを裏付ける情動認知行動の異常が確認され、その分子機序に関わる共通因子が推定された。

本研究は第20回「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」（平成28年10月26日）が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された3物質、2-エチル-1-ヘキサノール（2E1H）、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート（TPM）、及び2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート（TPD）に対し、上記評価系を適用し、①低濃度吸入時の、肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②情動認知行動解析と神経科学的所見による中枢影響、及び、③肺、肝、海馬の毒性関連性を確認する。更に、先に解析した11物質との異同（ハザード同定・予測）及び、用量相関性を検討し、この3物質がSHの誘因となるか否かの質的情報、及び、濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を得られるかを検討する。更に、Percellomeデータベースに登録された約150の化学物質との照合により、ハザード同定・予測の範囲と精度を確保する。「第21回シックハウス検討会」（平成29年4月19日）において、2E1H、TPM、TPDの指針値（案）はそれぞれ、0.02 ppm（130 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）、0.03 ppm（240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）、8.5 ppb（100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）と設定された。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入ばく露実験を、先行研究でのばく露条件である22時間/日×7日間反復ばく露のプロトコールにより実施する。

平成30年度（今年度）は計画通りに、TPM（指針値（案）：0.03 ppm）について、トキシコゲノミクスのための吸入ばく露実験に向け、SHレベルでの22時間/日×7日間反復吸入ばく露を実施し、また情動認知行動解析のための吸入ばく露実験に向け、成熟期および幼若期マウスについて、指針値（案）の10倍濃度での22時間/日×7日間反復ばく露を実施した。その結果、トキシコゲノミクスのための吸入ばく露実験において、目標ばく露濃度（0.03、0.10及び0.30 ppm）に対して、それぞれ0.030、0.093及び0.295 ppmと、ほぼ目標ばく露濃度にて、マウスに安定して吸入ばく露することができた。他方、情動認知行動解析のための吸入ばく露実験においては、目標ばく露濃度（0.30 ppm）に対して、成熟期の場合は0.352 ppm、幼若期の場合は0.316 ppmと、ほぼ目標ばく露濃度にて吸入ばく露することができた。

A. 研究目的

[背景]人のシックハウス症候群（SH）の原因物質として、平成14年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」により13物質が、守るべき指針値と共に掲げられた。この指針値と、通常実施する吸入毒性試験で得られる無毒性量（病理組織学的な病変に基づく）を比較すると、両者には概ね1,000倍程度の乖離があることから、SHに関して毒性試験情報を人へ外挿することの困難さが行政施策上、問題とされてきた。これに対応すべく、先行研究にてガス体11物質を指針値レベルでマウスに7日間吸入ばく露し、肺、肝の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析した（Percellome法）。うち、構造骨格の異なる3物質について、海馬の遺伝子発現変動、及び、情動認知行動を観測した。その結果、3物質が共通して神経活動の抑制を示唆する変動を誘発すること、及び、それを裏付ける情動認知行動の異常が確認され、その分子機序に関わる共通因子が推定された。

[目的]本研究は第20回「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」（平成28年10月26日）が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された3物質、2-エチル-1-ヘキサノール（2E1H）、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート（TPM）、及び2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート（TPD）に対し、上記評価系を適用し、①低濃度吸入時の、肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②情動認知行動解析と神経科学的所見による中枢影響、及び、③肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、この3物質がSHの誘因となるか否かの質的情報、及び、濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を得られるかを検討する。「第21回シックハウス検討会」（平成29年4月19日）において、2E1Hの指針値（案）は、0.02 ppm（130 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）と設定された。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入ばく露実験を、先行研究でのばく露条件である22時間/日×7日間反復ばく露のプロトコルにより実施する。

平成30年度（今年度）は、TPM（指針値（案）：0.03 ppm）について、トキシコゲノミクス（Percellome法）のための吸入ばく露実験に向け、雄性マウス（成熟期）を対象とし先行研究でのば

く露条件である22時間/日×7日間反復ばく露実験（4用量、16群構成、各群3匹）（2、4、8、24時間後に観測）にて、SHレベル（0.03、0.10及び0.30 ppm）での22時間/日×7日間反復ばく露を実施し、また情動認知行動解析のための吸入ばく露実験に向け、雄性マウス（成熟期および幼若期）を対象とし先行研究でのばく露条件である22時間/日×7日間反復ばく露試験（2用量、6群構成、各群8匹）にて、SHレベル（0、0.30 ppm：0.30 ppmは指針値（案）の約10倍濃度）での22時間/日×7日間反復ばく露を実施した。

B. 研究方法

B-1：被験物質

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタン
ジオールモノイソブチレート（TPM）
（2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol
monoisobutyrate；分子量：216.32、CAS No.
25265-77-4、富士フイルム和光純薬工業〔製造
元：Alfa Aesar社〕）は、特級グレードを使用した。

製造元：Alfa Aesar

販売元：富士フイルム和光純薬株式会社

試薬名：2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジ
オール1-モノイソブチレート

カタログ番号：581-60401

ロット番号：S09A045

純度：99.039% [キャピラリーカラムGC]

沸点：183-185℃

蒸気圧：1.3 Pa（20℃）

比重：0.95（20/20℃）

使用した被験物質の特性は、FT-IR（島津製作所 IRAffinity-1）を用いて定性した。その結果、TPMに相当する赤外吸収ピークを確認した（図1）。

B-2：吸入ばく露システム

B-2-1：トキシコゲノミクスのための22時間/日×7日間反復ばく露実験：

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

12週齢の雄性C57BL/6Jマウス（日本チャールス

リバー) (4用量、16群構成、各群3匹) を用いて、平成30年度(今年度)はTPM(指針値(案): 0.03 ppm)について、目標通りにSHレベルでの極低濃度下(0、0.03、0.10、0.30 ppm)での22時間/日×7日間反復吸入ばく露試験(4用量、16群構成、各群3匹)を実施した。吸入装置のシステムを図2に示した。100mLの発生容器内のTPMを循環式恒温槽で一定温度(20℃)にしながら清浄空気のパブリングにより蒸発させた(パブリング流量: 目標吸入暴露濃度0.03 ppmでは0.5L/min、0.10 ppmでは1.7 L/min、0.30 ppmでは0.5 L/min)。この蒸気を清浄空気(希釈空気)と混合し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。ラインミキサー上で新鮮空気と混合し、設定濃度としたTPMを吸入チャンバーに送り込んだ(図2)。

なお、新鮮空気はHEPAフィルターと活性炭フィルターにより濾過して使用した。

吸入チャンバーは全身ばく露型であり、上部と下部が角錐状の角型チャンバーで観察窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1,060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。吸入チャンバーは、各群(0.03 ppmばく露群、0.10 ppmばく露群、0.30 ppmばく露群および対照群)につき1台、計4台を用いた。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、5連ケージ(1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H) mm)を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

B-2-2: 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復ばく露実験:

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

12週齢の雄性C57BL/6NCrSlcマウス(日本エス

エルシー)(2用量、6群構成、各群8匹)を用いて、TPM(指針値(案): 0.03 ppm)についてSHレベル(0、0.30 ppm: 0.30 ppmは指針値の約10倍濃度)での22時間/日×7日間反復ばく露を実施した。TPMガスの発生法は、パブリングにより発生させる装置(柴田科学株式会社、Photo 1)を用いてガスを発生する方法を採用した。発生装置内タンクに入れ25℃に加温したTPMに清浄空気を送りパブリングによりガスを発生させ、20℃の冷水でガスを冷却、清浄空気により一時希釈し、定量供給するフローコントロールバルブと浮子式流量計を用い、横層流型チャンバー(柴田科学株式会社、Photo 1)へ混合・希釈するためのラインミキサー内へ空調(温度: 25±2℃、湿度: 55±5%)された清浄な換気空気とともに希釈導入し、ステンレス製網ケージ(柴田科学株式会社、Photo 2, 3)内に収容したマウスに1日あたり22時間(午後12時より午前10時まで)、7日間吸入ばく露した。本研究で以後使用するチャンバーは、横層流型(容積3 m³、Photo 1)とし、チャンバー内にサーキュレーター(Photo 2)を設置し強力に空気を攪拌した状態で動物へのばく露を行うこととした(Photo 2, 3)。

B-3: 吸入チャンバー内の濃度測定の方法

B-3-1: トキシコゲノミクスのための22時間/日×7日間反復ばく露実験:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

B-3-1-A: 被験物質の捕集方法

サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学株式会社)を用い、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管(カーボンビーズアクティブジャンボ、柴田科学株式会社)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.3 L/分とした。捕集時間はばく露時間(ばく露開始からばく露停止まで)に合わせ22時間とした。捕集管のばく露1回当たりの使用本数は、対照群は1本、投与群は各濃度とも3本とした。

B-3-1-B: 捕集管の前処理及び分析条件

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。すなわち、捕集管の活性炭（1層及び2層）を取り出し、各々、バイアルビン（東京硝子機械株式会社）に入れ、二硫化炭素（和光純薬工業株式会社、作業環境測定用）を加え、蓋をして攪拌し、1時間静置する。各濃度の活性炭1層の抽出液は、検量線の所定の範囲に入るように希釈した。その後、上澄み液をバイアルビン（Agilent Technologies社）に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ（Agilent Technologies社、HP5890A）により測定した。なお、クロマトグラム上で認められる溶媒の二硫化炭素のピークを除くと、TPMのピークは1本であった。

B-3-2: 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復ばく露実験：

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

B-3-2-A: 被験物質の捕集方法

TPMの濃度検知は、チャンバー内濃度について、定流量ポンプ（MPΣ-300（柴田科学株式会社）、Photo 4）により活性炭捕集管（カーボンビーズアクティブジャンボ、柴田科学株式会社）へチャンバー内空気を通し、捕集管内に充填されている活性炭にTPMを吸着させ、溶媒（二硫化炭素）で抽出し、ガスマスを用いてその濃度を測定する、「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」が推奨する方法によりおこなった。捕集管内導入流量は、500mL/分[660L]。22時間/日×7日間ばく露に際し、ばく露期間中の2日目終了時と7日目終了時に、マウスへの22時間ばく露中のチャンバー内空気を捕集した捕集管を測定機関（日本バイオアッセイ研究センター）に送付し、分析を依頼した。

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及

び動物愛護的配慮を十分行い、所属する研究機関の指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程（平成27年4月版）」。

C. 研究結果及び考察

C-1: トキシコゲノミクスのための22時間/日×7日間反復吸入ばく露実験の場合：

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

C-1-A: TPMの濃度制御の方法の検討

縦層流の1060Lのチャンバー（毎分212Lの送気量）を用いてTPMのばく露検討を行った。TPMの発生方法は、100mLの発生容器内のTPMを循環式恒温槽で一定温度（20℃）にしながら清浄空気のバブリングにより蒸発させた。この蒸気を清浄空気（希釈空気：1.5 L/min）と混合した一定濃度の調整ガスは、流量計を用いて一定量（バブリング流量：目標吸入暴露濃度0.03 ppmでは0.5 L/min、0.10 ppmでは1.7 L/min、0.30 ppmでは0.5 L/min）を吸入チャンバー上部のラインミキサーに送り込み、新鮮空気と混合し、設定濃度としたTPMを吸入チャンバーに供給した。

吸入チャンバー内濃度の確認は、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP-Σ100H、柴田科学株式会社）を用い、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管（カーボンビーズアクティブジャンボ、柴田科学株式会社）に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.3 L/分とした。捕集管のばく露1回当たりの使用本数は、各濃度とも3本とした。捕集管の活性炭（1層及び2層）を取り出し、各々、かつ色バイアルビン（日電理硝子）に入れ、二硫化炭素（和光純薬工業、作業環境測定用）2 mLを加え、蓋をしてタッチミキサーで攪拌し1時間静置した。0.03 ppm群、0.10 ppm群及び0.30 ppm群の活性炭1層は、検量線の所定の範囲に入るように段階希釈した。その後、バイアルビン（Agilent Technologies社 2 mL用バイアルビン）に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ（Agilent

Technologies 社 5890A) により測定した。ガスクロマトグラフの分析条件は、カラムは DB-1 (0.53 mm ϕ $\times$ 60 m)、キャリアーガスはヘリウム、検出器は FID を用い、カラム温度は150℃、注入口温度は200℃、検出器温度は200℃、試料注入量は1 μ L とした。

その結果、吸入チャンバー内の TPM の濃度は、目標吸入暴露濃度0.03、0.10および0.30 ppm に対して、それぞれ0.026 $\pm$ 0.000 ppm、0.089 $\pm$ 0.003 ppm および0.311 $\pm$ 0.013 ppm であった。

次に、上記で検討したばく露条件は、濃度結果を受けて吸入チャンバー内への調整ガスの供給量をそれぞれ、0.03 ppm では0.12 L/min、0.10 ppm では0.39 L/min および0.30 ppm では1.1 L/min に設定し、再度 TPM をばく露した。その吸入チャンバー内の TPM の濃度は、目標吸入暴露濃度0.03、0.10および0.30 ppm に対して、それぞれ0.033 $\pm$ 0.000 ppm、0.119 $\pm$ 0.002 ppm および0.337 $\pm$ 0.014 ppm であり目標値に近い値であった。

以上のことから、TPM を低濃度でマウスに正確にばく露でき、低濃度における吸入チャンバー内 TPM の濃度コントロールが可能であった。

C-1-B: 吸入チャンバー内のTPMの濃度測定

目標吸入ばく露濃度0.03、0.10および0.30 ppm で、22時間のばく露を行い、被験物質の捕集方法および捕集管の前処理及び分析条件を検討した。なお、捕集管への採気時間は、ばく露全時間にわたる22時間とした。

具体的には、吸入チャンバー内への調整ガスの供給量をそれぞれ、0.03 ppmでは0.12 L/min、0.10 ppmでは0.39 L/minおよび0.30 ppmでは1.1 L/min に設定し、TPMをばく露した。

目標暴露濃度0.03、0.10及び0.30 ppmに対し、測定値の平均 $\pm$ 標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ0.0298 $\pm$ 0.0012 ppm(0.0280～0.0311 ppm)、0.0930 $\pm$ 0.0113 ppm (0.0690～0.0999 ppm) 及び0.295 $\pm$ 0.016 ppm (0.263～0.307 ppm) であった（図4A）。いずれの場合も、目標濃度に対しそれぞれ99.3、93.0及び98.3%と、93～99%の濃度でばく露できた。従って、TPMの室内濃度指針値(案)

である0.03 ppmを考慮した0.03、0.10および0.30 ppmを目標ばく露濃度とした吸入ばく露が達成できた。

C-2: 情動認知行動解析のための22時間/日 $\times$ 7日間反復ばく露実験の場合:

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

発生流量を30 L/分とし、供給流量はチャンバー内のTPM濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度0.30 ppmに対して13～22.5 L/分とし、チャンバー換気流量500 L/分で希釈しばく露した。

目標吸入ばく露濃度0.30 ppmの吸入チャンバーの実測値（以下、平均値 $\pm$ 標準偏差、最小～最大値）は、成熟期の場合は0.35 $\pm$ 0.09 ppm (0.24～0.50 ppm)、幼若期の場合は0.32 $\pm$ 0.07 ppm (0.24～0.41 ppm)と、目標濃度に対しそれぞれ116.7%および106.7%の濃度でばく露できた（図4B）。また対照群チャンバー内にTPMは検出されなかった。

D. 結論

平成30年度（今年度）は計画通りに、TPM（指針値(案)：0.03 ppm）について、トキシコゲノミクスのための吸入ばく露実験に向け、SHレベルでの22時間/日 $\times$ 7日間反復吸入ばく露を実施し、また情動認知行動解析のための吸入ばく露実験に向け、成熟期および幼若期マウスについて、指針値(案)の10倍濃度での22時間/日 $\times$ 7日間反復ばく露を実施した。その結果、トキシコゲノミクスのための吸入ばく露実験において、目標ばく露濃度（0.03、0.10 及び 0.30 ppm）に対して、それぞれ0.030、0.093 及び 0.295 ppm と、ほぼ目標ばく露濃度にて、マウスに安定して吸入ばく露することができた。他方、情動認知行動解析のための吸入ばく露実験においては、目標ばく露濃度（0.30 ppm）に対して、成熟期の場合は0.352 ppm、幼若期の場合は0.316 ppm と、ほぼ目標ばく露濃度にて吸入ばく露することができた。

令和元年度（来年度）は、第20回「検討会」が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された

3物質の内、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオールジソブチレート(TPD)につき、計画に則った同様な実験を実施、検討する予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol 2, Article number: 57, 2019.

Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. Fund Toxicol Sci 5: 167-170, 2018.

2. 学会発表

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid, the 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASAITOX2018), (2018.6.19) Pattaya, Thailand

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

夏目やよい、相崎健一、北嶋 聡、水口賢司、菅野 純、TargetMineによる標的予測、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

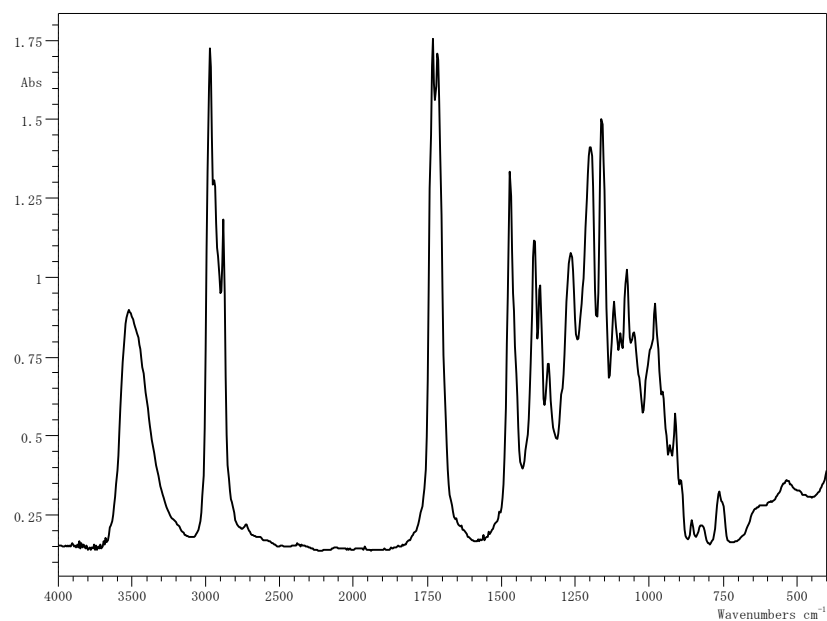
なし

3. その他

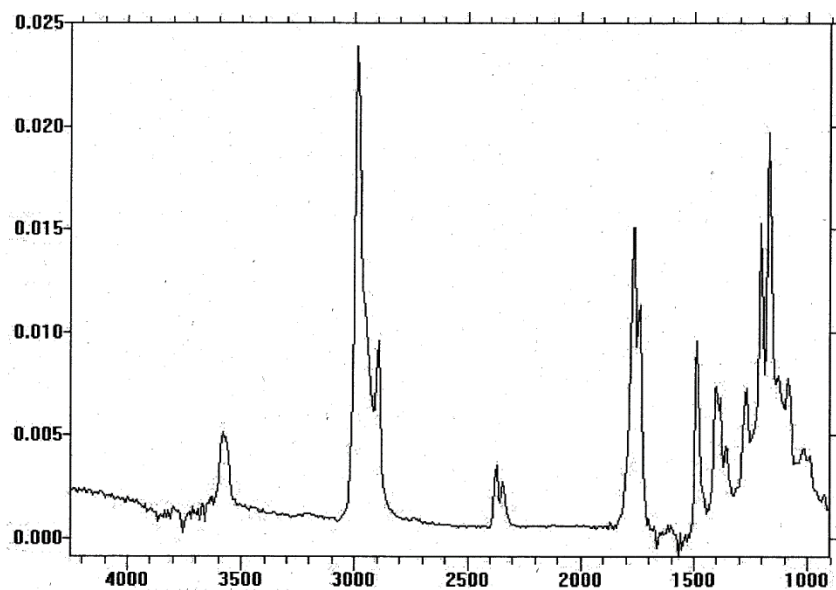
なし

表 1 吸入チャンバー内の TPM 濃度 (22 時間暴露)

単位：ppm				
	対照群	0.03 ppm群	0.10 ppm群	0.30 ppm群
6 月 20 日午後 0 時から	0	0.0280	0.0690	0.283
6 月 21 日午前 10 時				
6 月 21 日午後 0 時から	0	0.0302	0.0987	0.306
6 月 22 日午前 10 時				
6 月 22 日午後 0 時から	0	0.0283	0.0881	0.263
6 月 23 日午前 10 時				
6 月 23 日午後 0 時から	0	0.0310	0.0990	0.294
6 月 24 日午前 10 時				
6 月 24 日午後 0 時から	0	0.0294	0.0999	0.303
6 月 25 日午前 10 時				
6 月 25 日午後 0 時から	0	0.0302	0.0963	0.305
6 月 26 日午前 10 時				
6 月 26 日午後 0 時から	0	0.0311	0.0996	0.307
6 月 27 日午前 10 時				
平均濃度	0	0.0298	0.0930	0.295
標準偏差	0	0.0012	0.0113	0.016



被験物質の赤外吸収スペクトル



2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートの赤外吸収スペクトル
 IR-Sprktrensammlung der ANSYCO GmbH Infrarot-Spektren von Gasen
 (<http://www.gasmesstechnik.biz/CMS/frontend/index745c.html?idcatside=124&show=558>)

図 1 赤外吸収スペクトル

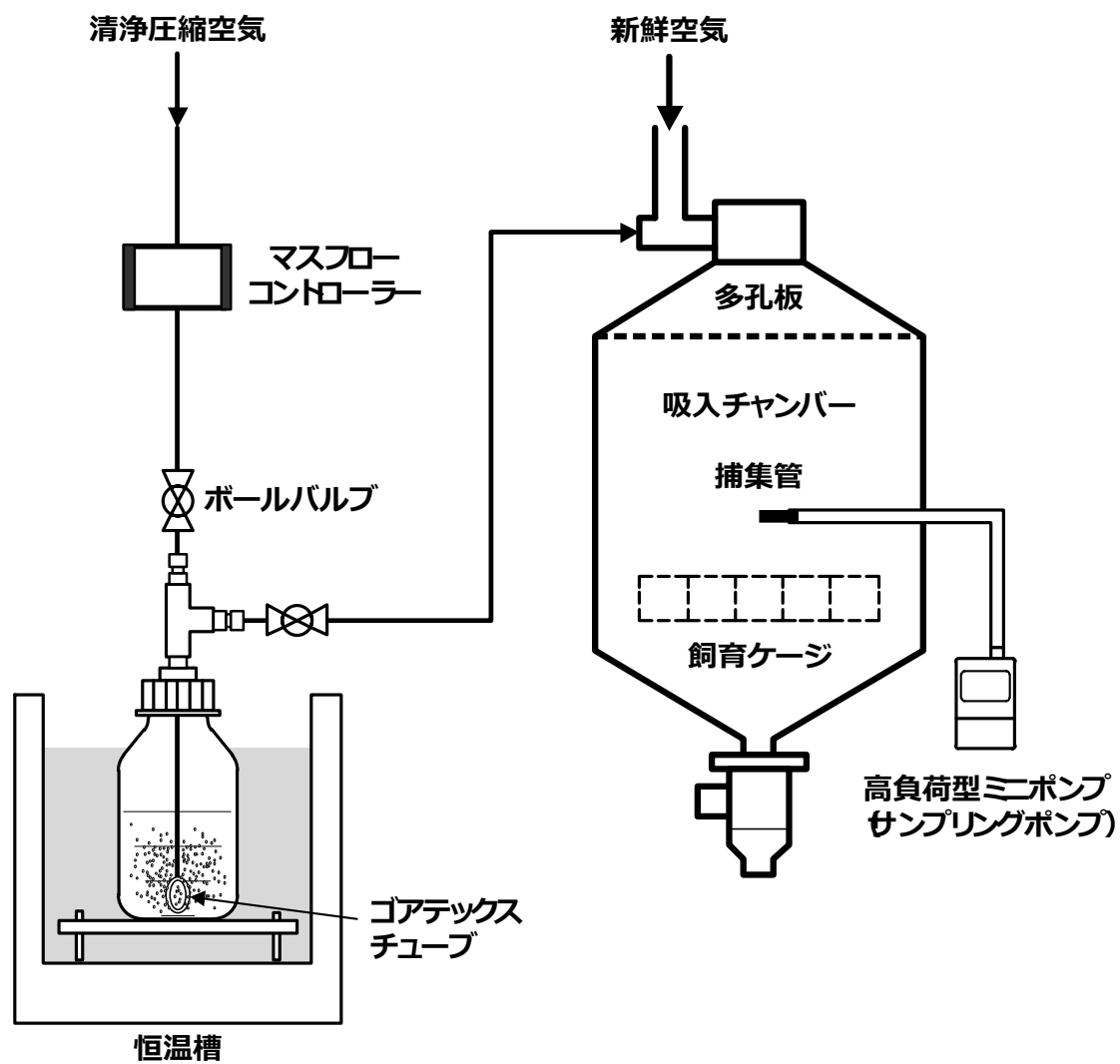


図 2 吸入ばく露装置のシステム



Photo 1 3m^3 横層流大型チャンバー及びその発生装置(柴田科学)



Photo 2 チャンバー内空気攪拌用
サーキュレーター(ボルネード)



Photo 3 マウスをばく露ケージ(柴田科学)に収容した状態



Photo 4 捕集管採気用ポンプ MPΣ-30、(柴田科学)

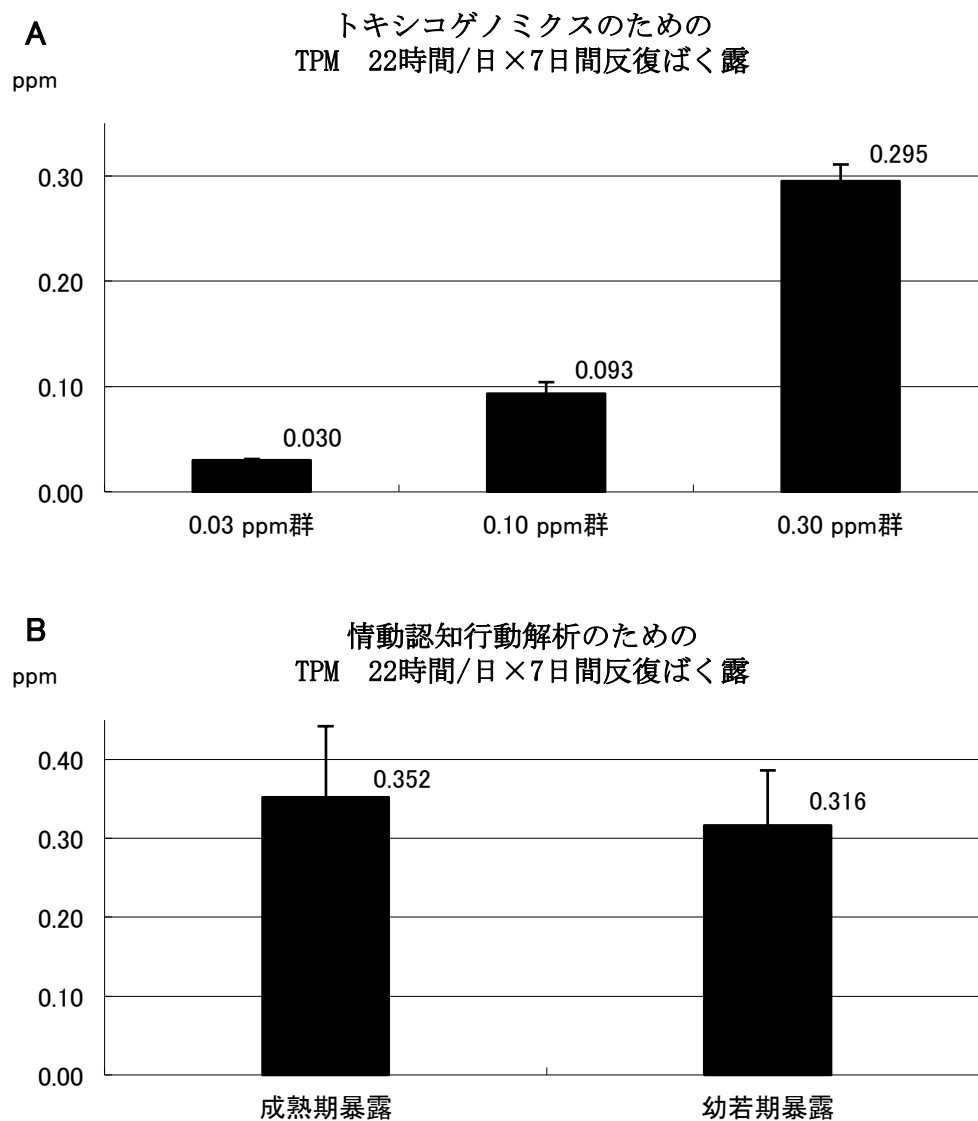


図4 TPMばく露濃度の測定結果

A: トキシコゲノミクスのための22時間/日×7日間反復ばく露の場合、B: 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復ばく露の場合（平均値±標準偏差）。平均値をグラフ中に記載した。

委託研究報告書

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラート

のマウスを用いた極低濃度暴露試験

報告書

(22 時間／日、7 日間ばく露)

試験番号：0908

CAS No. 25265-77-4

独立行政法人労働者健康安全機構

日本バイオアッセイ研究センター

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 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートを C57BL/6J 雄マウスに 22 時間／日、7 日間全身暴露（吸入暴露）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 日目、並びに 3 日目、7 日目及び暴露終了翌日に各群 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 0.0298 ± 0.0012 ppm (0.0280 ppm～0.0311 ppm)、 0.0930 ± 0.0113 ppm (0.0690 ppm～0.0999 ppm) 及び 0.295 ± 0.016 ppm (0.263 ppm～0.307 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 用サンプルは国立医薬品食品衛生研究所に送付した。

1. 試験材料

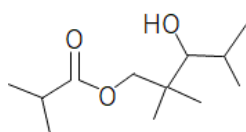
1-1 被験物質の性状等

1-1-1 名称等

名 称 : 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラート
別 名 : テキサノール
CAS No. : 25265-77-4

1-1-2 構造式及び分子量

構 造 式 :



分 子 量 : 216.32

1-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 無色液体
沸 点 : 244℃
蒸 気 圧 : 1.3 Pa (20℃)
比 重 : 0.95 (20/20℃)

1-2 使用被験物質

名 称 : 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラート
製 造 元 : Alfa Aesar
販 売 元 : 富士フイルム和光純薬株式会社
カタログ番号 : 581-60401
ロット番号 : S09A045
純 度 : 99.039%
保 管 条 件 : 室温で保管した。

詳細は別紙-1参照

1-3 被験物質の特性

使用した被験物質の特性は、FT-IR（島津製作所 IRAffinity-1）を用いて定性した。その結果、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートに相当する赤外吸収ピークを確認した（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日目及び3日目解剖動物 : 27匹
7日目及び暴露終了翌日解剖動物 : 27匹 (試験番号4610として導入)

1-4-3 週齢

導 入 時 週 齢 : 生後10週齢2018年3月27日生まれ (1日目及び3日目解剖動物)
生後9週齢2018年4月3日生まれ (7日目及び暴露終了翌日解剖動物)
投与開始時週齢 : 生後12週齢 (1日目及び3日目解剖動物)
生後11週齢 (7日目及び暴露終了翌日解剖動物)

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、6日間の検疫を行った。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 (2018年6月 6日～2018年6月12日)

馴化期間 : 7日間 (2018年6月13日～2018年6月19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吸入暴露とした。

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（別紙-2参照）

投与期間は1日22時間暴露（午後0時から午前10時）で最長7日間とした。

2-1-4 投与濃度

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HEPA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

第21回シックハウス検討会において、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートの指針値（案）は、240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.03 ppm) と設定された。先行研究では指針値を低用量と設定していることから、本実験でも低用量群をこの指針値の0.03 ppmとし、高濃度群：0.30 ppm、中濃度群：0.10 ppm、低濃度群：0.03 ppmと設定した。

2-1-6 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートの事前暴露検討経緯

日本バイオアッセイ研究センターでは、縦層流の1060Lのチャンバー（毎分212Lの送気量）を用いて2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートの暴露検討を行った。2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートの発生方法は、100mLの発生容器内の2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートを循環式恒温槽で一定温度（20℃）にしながらか清浄空気のバブリングにより蒸発させた（バブリング流量：目標吸入暴露濃度0.03 ppmでは0.5L/min、0.10 ppmでは1.7 L/min、0.30 ppmでは0.5 L/min）。この蒸気を吸入チャンバー上部のラインミキサーに送り込み、新鮮空気と混合し、設定濃度とした2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートを吸入チャンバーに供給した。

吸入チャンバー内濃度の確認は、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ 100H、柴田科学株式会社製)を用い、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管（カーボンビーズアクティブジャンボ、柴田科学株式会社製）に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.3 L/分とした。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、各濃度とも3本とした。捕集管の活性炭（1層及び2層）を取り出し、各々、かつ色バイアルビン（日電理化硝子製）に入れ、二硫化炭素（富士フイルム和光純薬工業製、作業環境測定用）2 mLを加え、蓋をして1時間静置した。0.03 ppm 群、0.10 ppm 群及び0.30 ppm 群の活性炭1層は、検量線の所定の範囲に入るように段階希釈した。その後、バイアルビン（Agilent Technologies 社製 2 mL用バイアルビン）に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ（Agilent Technologies 社製 7890A）により測定した。ガスクロマトグラフの分析条件は、カラムはDB-1（0.53 mm ϕ × 60 m）、キャリアーガスはヘリウム、検出器はFIDを用い、カラム温度は150℃、注入口温度は200℃、検出器温度は200℃、試料注入量は1 μL とした。

その結果、吸入チャンバー内の2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートの濃度は、目標吸入暴露濃度0.03、0.10および0.30 ppm に対して、それぞれ 0.026 ± 0.000 ppm、 0.089 ± 0.003 ppm および 0.311 ± 0.013 ppmであった。

次に、上記で検討した暴露条件は、濃度結果を受けて吸入チャンバー内への調整ガスの供給量をそれぞれ、0.03 ppm では0.12 L/min、0.10 ppm では0.39 L/min および0.30 ppm では1.1 L/min に設定し、再度2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートを暴露した。その吸入チャンバー内の2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオール 1-モノイソブチラートの

濃度は、目標吸入暴露濃度0.03、0.10および0.30 ppm に対して、それぞれ 0.033 ± 0.000 ppm、 0.119 ± 0.002 ppm および 0.337 ± 0.014 ppm であり目標値に近い値であった。

以上のことから、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートを低濃度でマウスに正確に暴露でき、低濃度における吸入チャンバー内2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートの濃度コントロールが可能であった。

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）

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートの発生は、恒温槽中の発生容器内の被験物質である2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートを清浄空気のバブリングにより気化させた。この被験物質を含む空気を吸入チャンバー上部に供給した。（概略図を別紙-3に示す）

2-1-8 被験物質濃度の測定

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラート濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定することにより算出した。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-Σ100H、柴田科学株式会社製)を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管（カーボンビーズアクティブジャンボ、柴田科学株式会社製）に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.3 L/分とした。捕集時間は暴露時間（暴露開始から暴露停止まで）に合わせ22時間とした。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、対照群は1本、投与群は各濃度とも3本とした。捕集管の前処理及び分析条件は、捕集管の活性炭（1層及び2層）を取り出し、各々、バイアルビン（東京硝子機械株式会社製）に入れ、二硫化炭素（和光純薬工業株式会社製、作業環境測定用）を加え、蓋をして攪拌後1時間静置した。各濃度の活性炭1層の抽出液は、検量線の所定の範囲に入るように希釈した。その後、上澄み液をバイアルビン（Agilent Technologies社製）に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ（Agilent Technologies社製 7890A）により測定した。なお、クロマトグラム上で認められる溶媒の二硫化炭素のピークを除くと、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートのピークは1本であった。

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。1日目、3日目、7日目及び暴露終了翌日の解剖期を設けた。

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 日目解剖	3 匹 (1001～1003)
		3 日目解剖	3 匹 (1004～1006)
		7 日目解剖	3 匹 (1007～1009)
		暴露終了翌日解剖	3 匹 (1010～1012)
1	0.03 ppm 群	1 日目解剖	3 匹 (1101～1103)
		3 日目解剖	3 匹 (1104～1106)
		7 日目解剖	3 匹 (1107～1109)
		暴露終了翌日解剖	3 匹 (1110～1112)
2	0.10 ppm 群	1 日目解剖	3 匹 (1201～1203)
		3 日目解剖	3 匹 (1204～1206)
		7 日目解剖	3 匹 (1207～1209)
		暴露終了翌日解剖	3 匹 (1210～1212)
3	0.30 ppm 群	1 日目解剖	3 匹 (1301～1303)
		3 日目解剖	3 匹 (1304～1306)
		7 日目解剖	3 匹 (1307～1309)
		暴露終了翌日解剖	3 匹 (1310～1312)

2-2-2 群分け及び個体識別方法

群分けは、投与開始日の投与開始直前に行った。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4610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。この動物はエーテル麻酔下で腋窩動・静脈からの放血により安楽死させた。

2-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（717室）、馴化期間及び投与期間中は吸入試験室（702室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。投与は吸入試験室の吸入チャンバーを使用した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバ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・換気回数の実測値の範囲<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 ; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$
吸入試験室 ; $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$
吸入チャンバー内 ; $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$ < $22.9 \sim 23.3^{\circ}\text{C}$ >
湿 度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$
吸入チャンバー内 ; $30 \sim 70\%$ < $52.3 \sim 53.8\%$ >
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 < $12.0 \sim 12.1$ 回>
圧 力 : 吸入チャンバー内 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$
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、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)のCRF-1固型 (30kGy- γ 線照射滅菌飼料) を飼料給餌器により自由摂取させた。

試験に使用する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)から分析データ入手し、確認した。

(3) 飲水

飲水は、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。

飲水の水質は、動物試験施設として定期的 (年2回) に実施している水道水の検査において水道法に定められている水質基準に適合していることを確認した。

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。

<投与期間>

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日目、3日目、7日目及び暴露終了翌日解剖動物は午前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分以内に試料を採取した。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。）

- ① Sample No.ごとに各種サンプル用ラベルシール（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。
- ② 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 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。
- ④ 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。
- ⑤ 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。）

① 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。

② 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。）

③ RNAlaterの分注

必要量+ α 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 μ L/tube、Lung : 1,000 μ 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) μ L/tube)分注した。

④ 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。）

⑤ 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。

⑥ 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。）

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ ③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。
- ⑤ 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。④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。
- ⑥ 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。
- ⑦ 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。）

- ① サンプル1種類ずつ、一番小さい**Sample No.**から測定をした。
- ② 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。

- ③ 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。
- ④ 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。
- ⑤ ④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。
- ⑥ 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。

- ① 動物を麻酔し、右腋窩動静脈を切断し放血致死させた。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ 筋層にVの字に切れ込みを入れ、肝を露出させた。
- ⑤ 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。
- ⑥ 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。
- ⑦ 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。

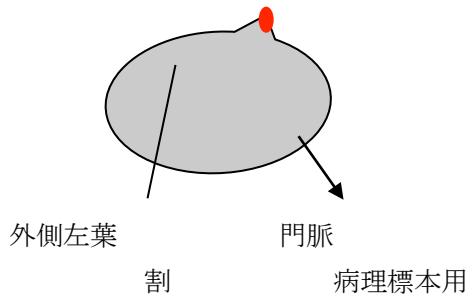
- ① 天秤で肝の重量を測定、記録した。
- ② ピンセットは生食を入れたチューブで洗浄した。（生食は群ごとに交換した）。
- ③ 臓器を担当者に渡し、次の動物を準備し、約2分30秒間隔で動物を麻酔瓶に入れた。

3) 肝サンプリング

- ① 肝を、シルキーテックスを貼ったシャーレ（氷上）にのせた。
- ② 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（胆嚢のついている葉）。
- ③ ②の状態、胆嚢の左側の葉を1ヵ所（A）、右側の葉を2ヵ所（門脈近位：B、門脈遠位：C）トレパンで抜き取った。
- ④ 3 mm径リングピンセットでAサンプルをマイクロ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。各サンプルの厚さになるべく揃うように（重量としては30～40 mg）採取した。

- ⑤ 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。



- ⑥ 門脈を含む方を病理標本用サンプルとし、⑤で切り離した他の葉と共に10%ホルマリン液に移した。
- ⑦ 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。
- ⑧ 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RNeasy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ヵ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

① 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。

② 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。）

③ 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。

④ 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。

⑤ 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。

⑥ 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。

⑦ 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。

⑧ 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。

⑨ 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のところで切断し、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のところで切断し、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。

⑩ 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。）

⑪ 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。

⑫ 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。

⑬ 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

① 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。

② 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。

③ 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。

④ 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。

⑤ 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。

⑥ 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広げていき、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

① 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。

⇒作業員Bに渡した。

② 小脳の分離「作業員B分担」

あらかじめ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）。

③ 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）。

④ 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。

⑤ 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。

⑥ 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。

⑦ 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。全てを移し終え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。

⑧ 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。)

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ 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。
- ⑤ 測定後のサンプルは、 -80°C で保管した。
- ⑥ 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°C で一晩保存後サンプル重量測定し、超低温庫 (-80°C) 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詰めて、下記宛先に送付した。

〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26

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 祐次

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 (パラフィンプ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 0.0298 ± 0.0012 ppm（0.0280 ppm～0.0311 ppm）、 0.0930 ± 0.0113 ppm（0.0690 ppm～0.0999 ppm）及び 0.295 ± 0.016 ppm（0.263 ppm～0.307 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。

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。

表 1 吸入チャンバー内環境の測定結果：温度（22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	23.3	23.3	23.2	22.9
標準偏差	0.2	0.4	0.2	0.2
日別平均値				
6 月 19 日	23.4	23.6	23.4	23.0
6 月 20 日	23.3	23.6	23.3	22.9
6 月 21 日	23.3	23.6	23.3	22.8
6 月 22 日	23.3	23.3	23.3	22.9
6 月 23 日	23.3	23.3	23.2	23.0
6 月 24 日	23.2	23.3	23.1	22.9
6 月 25 日	23.4	23.4	23.3	23.0
6 月 26 日	23.3	23.0	23.1	22.9
6 月 27 日	22.8	22.6	22.5	22.5

表 2 吸入チャンバー内環境の測定結果：湿度（22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	52.3	52.5	53.4	53.8
標準偏差	1.7	1.7	1.5	1.7
日別平均値				
6 月 19 日	50.0	53.1	52.8	53.2
6 月 20 日	50.1	51.4	52.3	52.9
6 月 21 日	51.3	51.8	52.8	53.2
6 月 22 日	53.0	52.7	53.5	54.2
6 月 23 日	53.1	52.4	53.4	54.1
6 月 24 日	53.0	52.5	53.6	53.7
6 月 25 日	52.8	52.5	53.3	53.3
6 月 26 日	53.0	53.2	54.2	54.4
6 月 27 日	54.3	54.4	56.1	56.7

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（22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	212.6	12.0	213.1	12.1	214.0	12.1	213.6	12.1
標準偏差	2.9	0.2	2.6	0.1	5.9	0.3	5.3	0.3
日別平均値								
6 月 19 日	213.8	12.1	213.9	12.1	215.3	12.2	212.5	12.0
6 月 20 日	212.5	12.0	212.6	12.0	215.6	12.2	215.5	12.2
6 月 21 日	212.6	12.0	213.2	12.1	213.5	12.1	213.4	12.1
6 月 22 日	212.5	12.0	213.3	12.1	214.3	12.1	213.9	12.1
6 月 23 日	212.2	12.0	212.7	12.0	212.5	12.0	211.8	12.0
6 月 24 日	212.7	12.0	213.1	12.1	214.3	12.1	213.3	12.1
6 月 25 日	212.6	12.0	213.3	12.1	213.3	12.1	213.1	12.1
6 月 26 日	212.1	12.0	212.6	12.0	213.7	12.1	213.9	12.1
6 月 27 日	213.7	12.1	213.4	12.1	214.7	12.2	214.7	12.2

表 4 吸入チャンバー内の被験物質濃度（22 時間暴露）

	単位：ppm			
	対照群	0.03 ppm群	0.10 ppm群	0.30 ppm群
6 月 20 日午後 0 時から	0	0.0280	0.0690	0.283
6 月 21 日午前 10 時				
6 月 21 日午後 0 時から	0	0.0302	0.0987	0.306
6 月 22 日午前 10 時				
6 月 22 日午後 0 時から	0	0.0283	0.0881	0.263
6 月 23 日午前 10 時				
6 月 23 日午後 0 時から	0	0.0310	0.0990	0.294
6 月 24 日午前 10 時				
6 月 24 日午後 0 時から	0	0.0294	0.0999	0.303
6 月 25 日午前 10 時				
6 月 25 日午後 0 時から	0	0.0302	0.0963	0.305
6 月 26 日午前 10 時				
6 月 26 日午後 0 時から	0	0.0311	0.0996	0.307
6 月 27 日午前 10 時				
平均濃度	0	0.0298	0.0930	0.295
標準偏差	0	0.0012	0.0113	0.016

表 5 解剖時体重及び肝臓重量 (22時間暴露)

1 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1001	28.3	1.697
	1002	26.1	1.040
	1003	28.1	1.586
0.03 ppm 群	1101	27.4	1.494
	1102	26.8	1.447
	1103	27.4	1.475
0.10 ppm 群	1201	25.6	1.222
	1202	28.7	1.520
	1203	27.8	1.473
0.30 ppm 群	1301	28.4	1.475
	1302	28.0	1.571
	1303	27.4	1.502

3 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1004	27.9	1.439
	1005	25.9	1.257
	1006	26.4	1.034
0.03 ppm 群	1104	28.2	1.469
	1105	26.6	1.444
	1106	29.1	1.567
0.10 ppm 群	1204	26.3	1.228
	1205	29.5	1.791
	1206	26.0	1.301
0.30 ppm 群	1304	27.1	1.500
	1305	29.3	1.584
	1306	25.8	1.249

7 日目解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1007	27.1	1.547
	1008	28.8	1.609
	1009	23.9	1.227
0.03 ppm 群	1107	26.2	1.332
	1108	25.0	1.268
	1109	28.8	1.714
0.10 ppm 群	1207	26.9	1.622
	1208	27.7	1.573
	1209	27.8	1.474
0.30 ppm 群	1307	25.7	1.418
	1308	27.2	1.646
	1309	27.0	1.466

暴露終了翌日解剖

群	動物番号	解剖時体重 (g)	肝臓重量 (g)
対照群	1010	27.7	1.477
	1011	27.0	1.496
	1012	27.5	1.486
0.03 ppm 群	1110	26.3	1.285
	1111	27.3	1.468
	1112	26.7	1.511
0.10 ppm 群	1210	26.6	1.527
	1211	28.4	1.559
	1212	26.2	1.469
0.30 ppm 群	1310	26.8	1.412
	1311	27.2	1.539
	1312	27.0	1.444

表 6 剖検所見（22時間暴露）

1 日目解剖

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

3 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

7 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

暴露終了翌日解剖

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（22時間暴露）

1 日目解剖

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

3 日目解剖

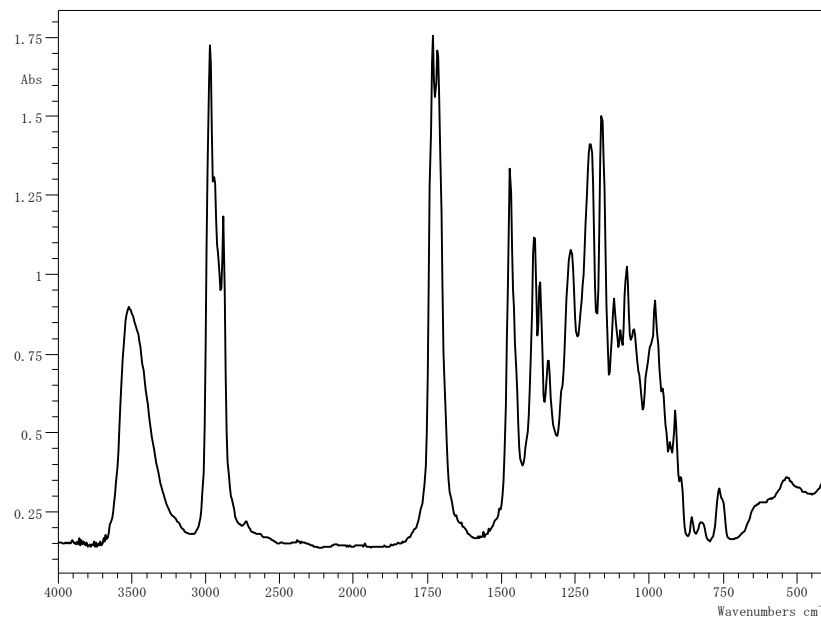
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1004	著変なし	著変なし	著変なし
	1005	著変なし	著変なし	著変なし
	1006	著変なし	著変なし	著変なし
0.03 ppm 群	1104	著変なし	著変なし	著変なし
	1105	著変なし	著変なし	著変なし
	1106	著変なし	著変なし	著変なし
0.10 ppm 群	1204	著変なし	著変なし	著変なし
	1205	著変なし	著変なし	著変なし
	1206	著変なし	著変なし	著変なし
0.30 ppm 群	1304	著変なし	著変なし	著変なし
	1305	著変なし	著変なし	著変なし
	1306	著変なし	著変なし	著変なし

7 日目解剖

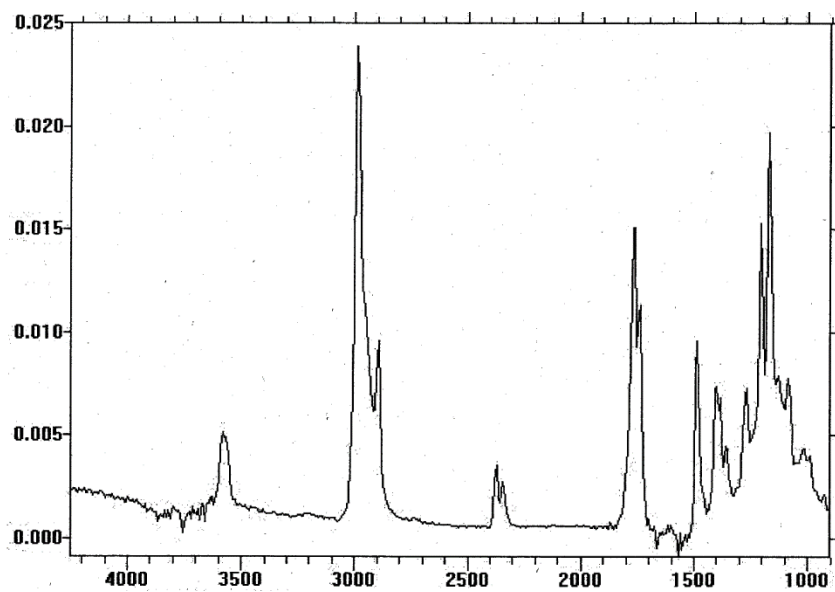
群	動物番号	肝臓	肺	脳
対照群	1007	著変なし	著変なし	著変なし
	1008	著変なし	著変なし	著変なし
	1009	著変なし	著変なし	著変なし
0.03 ppm 群	1107	著変なし	著変なし	著変なし
	1108	著変なし	著変なし	著変なし
	1109	著変なし	著変なし	著変なし
0.10 ppm 群	1207	著変なし	著変なし	著変なし
	1208	著変なし	著変なし	著変なし
	1209	著変なし	著変なし	著変なし
0.30 ppm 群	1307	著変なし	著変なし	著変なし
	1308	著変なし	著変なし	著変なし
	1309	著変なし	著変なし	著変なし

暴露終了翌日解剖

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



被験物質の赤外吸収スペクトル



2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール 1-モノイソブチラートの赤外吸収スペクトル

IR-Sprktrensammlung der ANSYCO GmbH Infrarot-Spektren von Gasen
(<http://www.gasmesstechnik.biz/CMS/frontend/index745c.html?idcatside=124&show=558>)

図 1 赤外吸収スペクトル

Alfa Aesar

Certificate of analysis

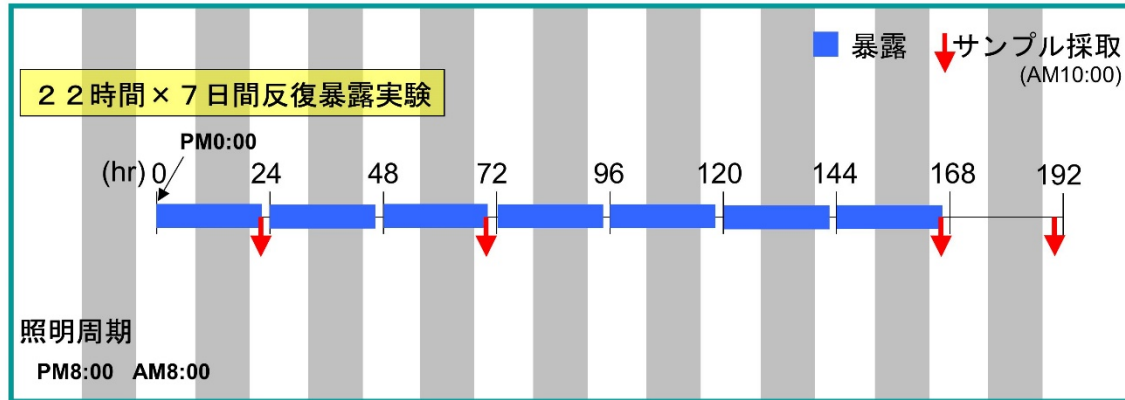
Product No.: 40366
Product: 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol 1-monoisobutyrate
Lot No.: S09A045

Appearance	Passes
Refractive index at 20°C	1.4422
Water	0.003 %
Specific gravity (d_{20}^{20})	0.9481
Acidity as acetic acid	0.004 %
Assay	99.039 %
Color (PtCo)	4

This document has been electronically generated and does not require a signature.

Order our products online www.alfa.com

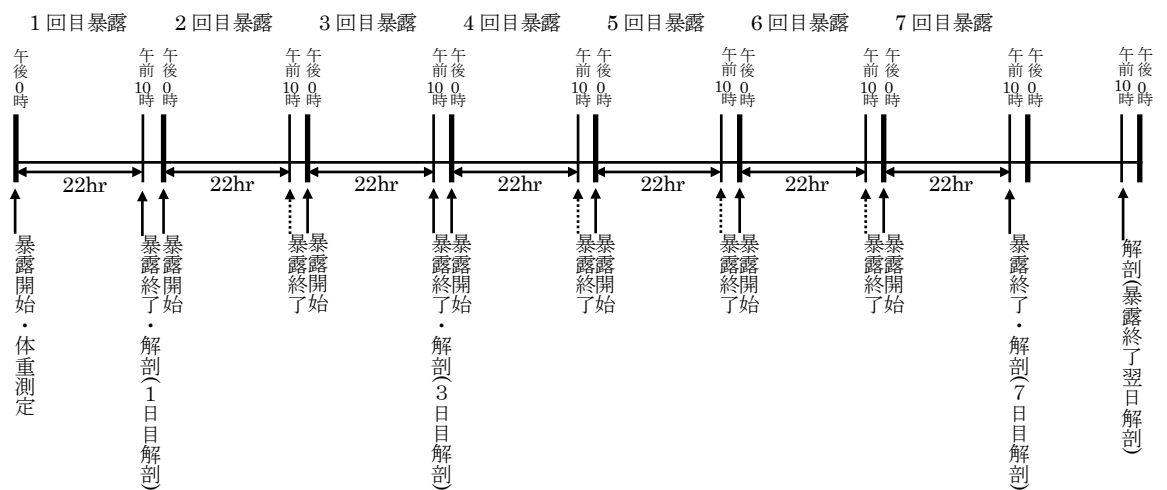
ThermoFisher
SCIENTIFIC

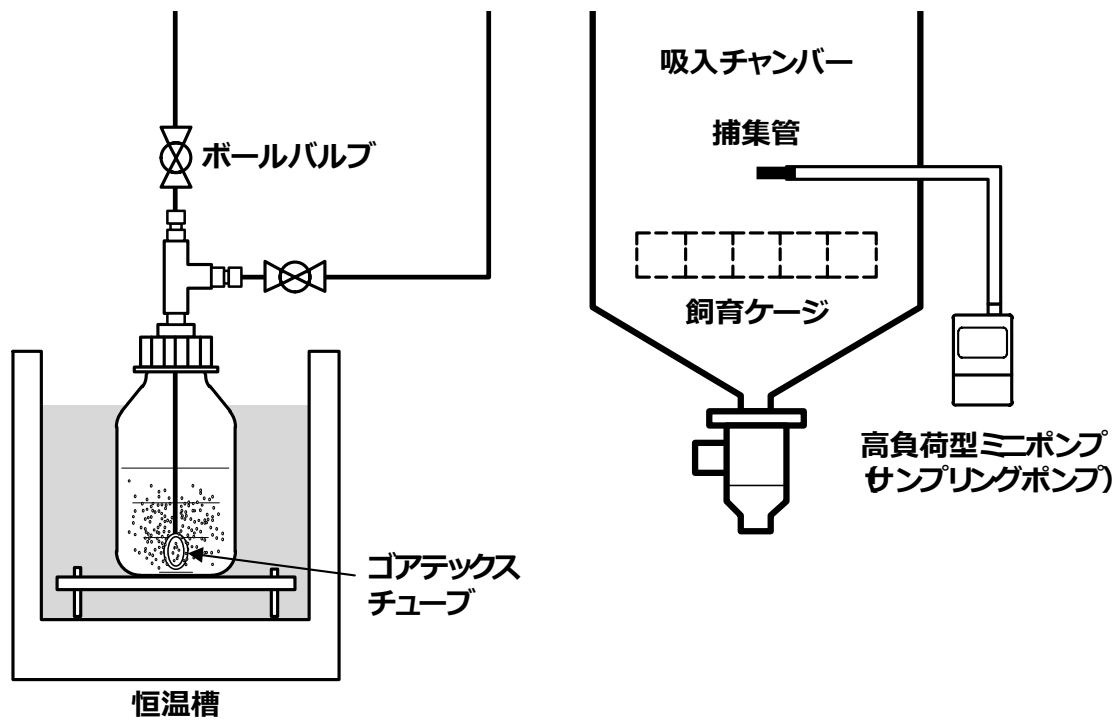


22時間 x 7日間反復暴露（投与22、70、166、190時間後に観測）[時刻：10時、10時、10時、10時]

6月

19日 20日 21日 22日 23日 24日 25日 26日 27日





別紙ー3

平成30年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）（H29-化学-一般-005）
シックハウス（室内空気汚染）対策に関する研究
-「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」が新たに指摘した室内汚染化学物質
の、ヒトばく露濃度におけるハザード評価研究-

分担研究報告書

分担研究課題：「吸入ばく露影響のハザード評価のため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の開発」

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

人のシックハウス症候群（SH）の原因物質として、平成14年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」により13物質が、守るべき指針値と共に掲げられた。この指針値と、通常実施する吸入毒性試験で得られる無毒性量（病理組織学的な病変に基づく）を比較すると、両者には概ね1,000倍程度の乖離があることから、SHに関して毒性試験情報を人へ外挿することの困難さが行政施策上、問題とされてきた。これに対応すべく、先行研究にてガス体11物質を指針値レベルでマウスに7日間吸入ばく露し、肺、肝の遺伝子発現変動を高精度に測定し、そのプロファイルを分析した（Percellome法）。うち、構造骨格の異なる3物質について、海馬の遺伝子発現変動、及び、情動認知行動を観測した。その結果、3物質が共通して神経活動の抑制を示唆する変動を誘発すること、及び、それを裏付ける情動認知行動の異常が確認され、その分子機序に関わる共通因子が推定された。

本研究は第20回「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」（平成28年10月26日）が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された3物質、2-エチル-1-ヘキサノール（2E1H）、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオールモノイソブチレート（TPM）、及び2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオールジイソブチレート（TPD）に対し、上記評価系を適用し、①低濃度吸入時の、肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②情動認知行動解析と神経科学的所見による中枢影響、及び、③肺、肝、海馬の毒性連関性を確認する。更に、先に解析した11物質との異同（ハザード同定・予測）及び、用量相関性を検討し、この3物質がSHの誘因となるか否かの質的情報、及び、濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を得られるかを検討する。更に、Percellomeデータベースに登録された約150の化学物質との照合により、ハザード同定・予測の範囲と精度を確保する。

「第21回シックハウス検討会」（平成29年4月19日）において、2E1H、TPM、TPDの指針値（案）はそれぞれ、0.02 ppm（130 μ g/m³）、0.03 ppm（240 μ g/m³）、8.5 ppb（100 μ g/m³）と設定された。

平成30年度（今年度）はTPM（指針値（案）：0.03 ppm）について予定通り、SHレベル（0、0.03、0.1、0.30 ppm）での22時間/日×7日間反復吸入ばく露を実施し、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。その結果、成熟期マウス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、指針値（案）レベルの濃度から、先行研究で反復ばく露（7日間）したSH化学物質と同程度に観測され、この物質についても海馬神経活動の抑制を示唆する所見が得られた。この抑制は、ばく露終了24時間後には回復していた。

A. 研究目的

[背景]人のシックハウス症候群（SH）の原因物質として、平成14年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」により13物質が、守るべき指針値と共に掲げられた。この指針値と、通常実施する吸入毒性試験で得られる無毒性量（病理組織学的な病変に基づく）を比較すると、両者には概ね1,000倍程度の乖離があることから、SHに関して毒性試験情報を人へ外挿することの困難さが行政施策上、問題とされてきた。これに対応すべく、先行研究にてガス体11物質を指針値レベルでマウスに7日間吸入ばく露し、肺、肝の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析した（Percellome法）。うち、構造骨格の異なる3物質について、海馬の遺伝子発現変動、及び、情動認知行動を観測した。その結果、3物質が共通して神経活動の抑制を示唆する変動を誘発すること、及び、それを裏付ける情動認知行動の異常が確認され、その分子機序に関わる共通因子が推定された。

[目的]本研究は第20回「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」（平成28年10月26日）が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された3物質、2-エチル-1-ヘキサノール（2E1H）、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート（TPM）、及び2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート（TPD）に対し、上記評価系を適用し、①低濃度吸入時の、肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②情動認知行動解析と神経科学的所見による中枢影響、及び、③肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、この3物質がSHの誘因となるか否かの質的情報、及び、濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を得られるかを検討する。「第21回シックハウス検討会」（平成29年4月19日）において、2E1H、TPM、TPDの指針値（案）はそれぞれ、0.02 ppm（130 μ g/m³）、0.03 ppm（240 μ g/m³）、8.5 ppb（100 μ g/m³）と設定された。

本分担研究では、雄性マウスを対象としたSHレベルでの22時間/日×7日間反復吸入ばく露実験を実施し、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30年度）は、TPM（指針値（案）：0.03 ppm）について検討した。

B. 研究方法

Total RNAの分離精製

マウス組織を採取後すみやかにRNA later（Ambion社）に4℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化する。肝は5mm径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。肺は気管からRNA laterを注入し、RNaseの不活化を促した後、採取した。脳は摘出後、カミソリ刃にて正中で左右に切断し左部について、小脳、脳幹、海馬及び大脳皮質の4部位に分離後、各々別チューブに採取した。その後、RNA抽出操作までは-80℃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RNA5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。

吸入ばく露後、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ー解析を行い、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。

吸入ばく露実験

今年度 (平成 30 年度) は、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート (TPM) (2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate; 分子量: 216.32、CAS No. 25265-77-4、密度 (20℃) 0.95 g/ml、ロット番号: S09A045、カタログ番号: 581-60401、純度 99.0%、富士フイルム和光純薬工業 [製造元: Alfa Aesar 社]) についてデータ解析を進めた。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に、生活ばく露モデルであり、先行研究でのばく露条件である 22 時間/日×7 日間反復ばく露実験 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) (22、70、166、190 時間後に観測) を実施した際の脳 (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。

マウスへのばく露濃度を、「第 21 回シックハウス検討会」(平成 29 年 4 月 19 日)において、TPM の指針値 (案) (0.03 ppm [= 240 μ g/m³]) を参照し、公比 $\sqrt{10}$ で (0、0.03、0.10、0.30 ppm) をばく露目標値とした。

(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。「日本バイオアッセイ研究センター動物実験委員会が定める動物実験等に関する規定」(平成 24 年 4 月 25 日)。

C. 研究結果

以下に、TPM について 22 時間/日×7 日間反復ばく露の際の海馬、肝及び肺における解析結果を示す。

C-1: S H レベルでの TPM [22 時間/日×7 日間反復] ばく露時の遺伝子発現変動解析:

C-1-1: TPM [22 時間/日×7 日間反復] ばく露時の「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 1,451 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 625 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 381 ps、V S P として 22 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) の発現の抑制が、指針値(案)レベルの濃度から、先行研究においてばく露したSH化学物質(ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼン)と同程度に観測され、この物質についても海馬神経活動の抑制を示唆する所見が得られた。具体的には、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb 及びEgr4 遺伝子の有意な発現減少が認められた。ばく露休止後の IEG 遺伝子発現のリバウンド現象はばく露 24 時間後に、上記のいずれの IEG 遺伝子においても有意な変動は認められなかった。

IEG 遺伝子の発現制御、Saha ら (Nat Neurosci 14(7): 848-856, 2011) は、ラット初代培養神経細胞を用いて、IEG の遺伝子の発現は、Pol II に結合する 4 つのサブユニット (NELF-A, NELF-B, NELF-C/D and NELF-E) の複合体である Negative elongation factor (NELF) によって制御されると報告している。しかし本解析結果では、この NELF のサブユニットの各遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。

この IEG の遺伝子内、Arc、Fos、Dusp1 および Nr4a1 遺伝子の発現変動について図 1 に示す。あわせて、Dusp1 遺伝子について、TPM、2E1H、ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼンについて、SH レベルでの 22 時間/日×7 日間反復ばく露の際の海馬における発現変動の比較を、図 2 として示す。

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。

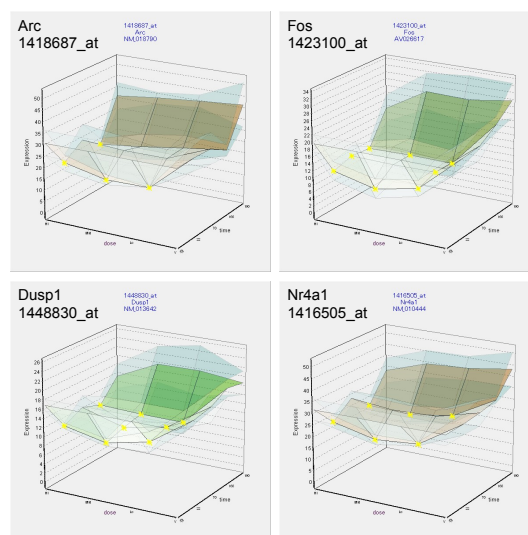
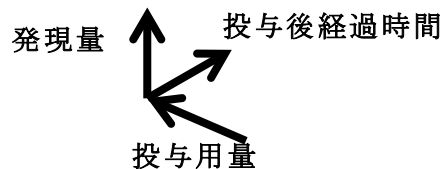
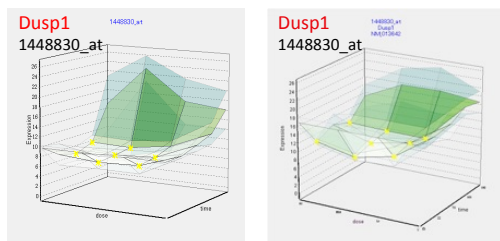


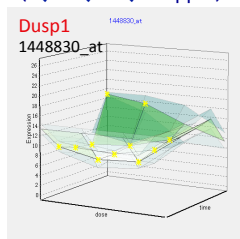
図 1 TPM [22 時間/日×7 日間反復] ばく露時の「海馬」における IEG の内、Arc と Fos (上段、左から) 及び Dusp1 と Nr4a1 (下段、左から) 遺伝子の発現変動

コントロール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、図中に黄色*を付した。

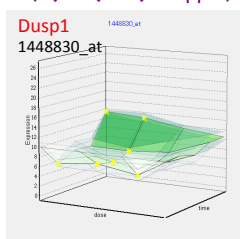
TPM (0, 0.03, 0.10, 0.30 ppm) 2-エチル-1-ヘキサノール (0, 0.02, 0.07, 0.20 ppm)



ホルムアルデヒド (0, 0.1, 0.3, 1.0 ppm)



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, 0.40 ppm)

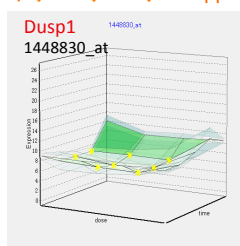


図 2 TPM、2E1H、ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼン[22 時間/日×7 日間反復]ばく露時の「海馬」における IEG の内、Dusp1 遺伝子の発現変動

コントロール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、図中に黄色*を付した。遺伝子発現量を表す各縦軸のスケールを同じくした。

いずれも同様な発現パターンを示した。

C-1-2: 2E1H [22 時間/日×7 日間反復]ばく露時の「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 719 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 16 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 344 ps、V S P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。

C-1-3: 2E1H [22 時間/日×7 日間反復]ばく露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

サンプリングは終了しており、来年度、他臓器関連解析とあわせ、解析を実施する予定である。

D. 考察

以上の通り、第 20 回「シックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会」(平成 28 年 10 月 26 日)が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された 3 物質、2E1H、TPM、TPD の内、計画通りに、平成 29 年度 (初年度) は 2E1H (指針値(案): 0.02 ppm)、平成 30 年度 (今年度) は TPM (指針値(案): 0.03 ppm) について、S Hレベル (2E1H: 0, 0.02, 0.07, 0.20 ppm; TPM: 0, 0.03, 0.1, 0.30 ppm) での 22 時間/日×7 日間反復吸入ばく露試験を実施した。

遺伝子発現変動解析の結果、成熟

研究で暴露したSH化学物質と同程度に観測され、この物質についても海馬神経活動の抑制を示唆する所見が得られた。この抑制は、ばく露終了24時間後には回復していた。

このIEGの抑制機序として、先行研究では、6時間/日×7日間反復ばく露時の肝・肺の連関解析において、化学構造の異なる5物質（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IL1 β 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 β 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。これらの5物質について、6時間/日×7日間反復ばく露時の肺におけるIL1 β の遺伝子の発現変動を図3に示す。なおIL-1 β 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 β 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 β が血液脳関門を通過できなければ、海馬に影響を与える事が出来ない事となるが、この点、血液脳関門を通過するという報告（Banks WAら、J Pharmacol Exp Ther 259(3): 988-996, 1991）（トランスポーターは未同定）を見いだしており、血中のIL-1 β が海馬に影響を与え得るものと考えられる。先行研究では、この候補分子の妥当性を検証するため、SHレベルの反復吸入ばく露時の、IEGの転写を調節し得る候補分子IL-1 β の血液中濃度を経時的に測定したが、対照群、ばく露群共に全てのサンプルについて検出限界以下の濃度（1.03 pg/mL）であったため、今後、IL-1 β を濃縮する等、より感度の良い他の測定法を検討する。これと並行して、他臓器連関により、IEGの転写を調節し得るIL-1 β とは異なる新たな候補分子を探索する。

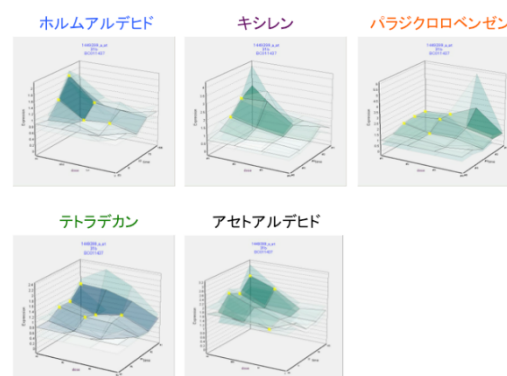


図3 ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、テトラデカン及びアセトアルデヒドにおける6時間/日×7日間反復ばく露時の「肺」におけるIL1 β 遺伝子の発現変動

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、図中に黄色＊を付した。

E. 結論

以上のごとく、高濃度・高頻度で検出された3物質の内、2E1H及びTPMの2物質について、指針値レベルでの22時間/日×7日間反復吸入ばく露により、先行研究でSH化学物質を7日間反復ばく露の際の海馬における遺伝子発現解析時と同様に、成熟期マウス海馬におけるIEGの発現が減少したことから、指針値レベルの濃度でもマウス海馬での神経活動抑制が示唆された。

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IL1 β 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日間反復ばく露時の肺において、インターロイキン1 β (IL1 β)遺伝子の発現増加が、化学構造の異なる5物質（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）に共通して認められたためである。またこの事は、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ばく露が、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。

令和元年度（来年度）は、第20回「検討会」が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された3物質の内、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート (TPD)につき、計画に則った同様な実験を実施、検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.

PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

(2) Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes.

Chem Res Toxicol. 2018 Oct 15;31(10):1025-1031.

(3) Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S.

Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats.

Cancer Sci. 2018 Jul;109(7):2164-2177.

(4) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi, Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol 2, Article number: 57, 2019.

2. 学会発表

(1) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

(2) 北嶋 聡、種村 健太郎、萱野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

(3) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

(4) 萱野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(5) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、水口賢司、萱野純、TargetMineによる標

的予測、第45回日本毒性学会学術年会
(2018.7.19.)

(6) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(7) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(8) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano, DTOX: Deep neural network-based computational framework to analyze omics data in Toxicology. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 25, 2018.

(9) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid” AsiaTox 2018, (2018.6.18, Thailand), (Poster)

(10) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Inferred role of crosstalk between PPARα and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid:

systems toxicology approach” ISMB 2018, (2018.7.7, USA), (Poster)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究課題： 吸入ばく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

人のシックハウス症候群 (SH) の原因物質として、平成 14 年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」により 13 物質が、守るべき指針値と共に掲げられた。この指針値と、通常実施する吸入毒性試験で得られる無毒性量 (病理組織学的な病変に基づく) を比較すると、両者には概ね 1,000 倍程度の乖離があることから、SH に関して毒性試験情報を人へ外挿することの困難さが行政施策上、問題とされてきた。これに対応すべく、先行研究にてガス体 11 物質を指針値レベルでマウスに 7 日間吸入ばく露し、肺、肝の遺伝子発現変動を高精度に測定し、そのプロファイルを分析した (Percellome 法)。うち、構造骨格の異なる 3 物質について、海馬の遺伝子発現変動、及び、情動認知行動を観測した。その結果、3 物質が共通して神経活動の抑制を示唆する変動を誘発すること、及び、それを裏付ける情動認知行動の異常が確認され、その分子機序に関わる共通因子が推定された。

本研究は第 20 回「シックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会」(平成 28 年 10 月 26 日) が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された 3 物質、2-エチル-1-ヘキサノール (2E1H)、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオールモノイソブチレート (TPM)、及び 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタジオールジイソブチレート (TPD) に対し、上記評価系を適用し、①低濃度吸入時の、肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②情動認知行動解析と神経科学的所見による中枢影響、及び、③肺、肝、海馬の毒性関連性を確認する。更に、先に解析した 11 物質との異同 (ハザード同定・予測) 及び、用量相関性を検討し、この 3 物質が SH の誘因となるか否かの質的情報、及び、濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を得られるかを検討する。更に、Percellome データベースに登録された約 150 の化学物質との照合により、ハザード同定・予測の範囲と精度を確保する。

「第 21 回シックハウス検討会」(平成 29 年 4 月 19 日) において、2E1H、TPM、TPD の指針値 (案) はそれぞれ、0.02 ppm (130 μ g/m³)、0.03 ppm (240 μ g/m³)、8.5 ppb (100 μ g/m³) と設定された。

本分担研究では、第 20 回「検討会」が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された 3 物質を主対象に、SH レベルでのばく露 (マウス成熟期及び幼若期) 後の高精度な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。

平成 30 年度 (今年度) は TPM (指針値 (案) : 0.03 ppm) について、SH レベル (0、0.03、0.1、0.3 ppm) での 22 時間/日 $\times$ 7 日間反復吸入ばく露を実施し、遺伝子発現変動解析により海馬神経活動の抑制を示唆する所見が得られたが、この海馬に対する影響の有害性を実証するため、成熟期マウスに、指針値 (案) の 10 倍濃度の TPM を反復吸入ばく露 (7 日間) し情動認知行動実験を実施した結果、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められ、ばく露 3 日後ではこれらの低下は回復し、可逆的であることが示唆された。これにより、海馬に対する有害性が実証され、かつ、遺伝子発現変動データがこの異常に対する予見性を持つことを確認したものと考える。神経機能を修飾する化学物質による幼若期ばく露が成熟期に遅発性の情動認知行動異常を誘発する知見を別途得ており、幼若期マウスについても指針値 (案) の 10 倍濃度の TPM の反復吸入ばく露 (7 日間) を実施した。成熟後、情動認知行動実験を実施する、すなわち遅発影響の検討を行う予定である。

A. 研究目的

[背景]人のシックハウス症候群（SH）の原因物質として、平成14年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」により13物質が、守るべき指針値と共に掲げられた。この指針値と、通常実施する吸入毒性試験で得られる無毒性量（病理組織学的な病変に基づく）を比較すると、両者には概ね1,000倍程度の乖離があることから、SHに関して毒性試験情報を人へ外挿することの困難さが行政施策上、問題とされてきた。これに対応すべく、先行研究にてガス体11物質を指針値レベルでマウスに7日間吸入ばく露し、肺、肝の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析した（Percellome法）。うち、構造骨格の異なる3物質について、海馬の遺伝子発現変動、及び、情動認知行動を観測した。その結果、3物質が共通して神経活動の抑制を示唆する変動を誘発すること、及び、それを裏付ける情動認知行動の異常が確認され、その分子機序に関わる共通因子が推定された。

[目的]本研究は第20回「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」（平成28年10月26日）が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された3物質、2-エチル-1-ヘキサノール（2E1H）、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート（TPM）、及び2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート（TPD）に対し、上記評価系を適用し、①低濃度吸入時の、肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②情動認知行動解析と神経科学的所見による中枢影響、及び、③肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、この3物質がSHの誘因となるか否かの質的情報、及び、濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を得られるかを検討する。「第21回シックハウス検討会」（平成29年4月19日）において、2E1Hの指針値（案）は、0.02 ppm（130 µg/m³）と設定された。

本分担研究では、第20回「検討会」が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された3物質を主対象に、SHレベルでのばく露（マウス成熟期及び幼若期）後の高精度な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

雄性マウス（成熟期[12週齢]及び幼若期[2週齢]）を対象とした22時間/日×7日間反復ばく露試験（2用量、6群構成、各群8匹）を実施し、ばく露終了日（急性影響の検討）及びばく露3日後（遅発性影響の検討）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、組織化学解析・タンパク発現解析により神経科学的所見による中枢影響の確認を行う。

（倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、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. 研究結果と考察

平成30年度（今年度）はTPMを対象とし、TPM（0、0.3 ppm）（0.3 ppmは指針値の10倍程度の濃度）について、22時間/日×7日間反復吸入ばく露した成熟期マウスについて情動認知行動解析（2用量、6群構成、各群8匹）を検討した。解析時点として、ばく露終了日とばく露3日後の2つの時点を選択した（図1）。前者は急性影響の検討に当たるが、この時点を選んだ理由は、先行研究での海馬における遺伝子発現解析から神経伝達の抑制を示唆するデータを有しており、この時点であれば情動認知行動異常が観察されると予想された為である。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時間ばく露直後に、またその次の観測点であるばく露休止24時間後には逆に発現のリバウンドが認められており、ばく露終了日中は、IEGが発現低下している

可能性が高いためである。ばく露 3 日後は遅発性影響の検討に当たる。この時点を選んだ理由は、この時点が当方で多くの解析データを有する遅発性の情動認知行動解析のプロトコルでの測定時点である為であり、これらのデータとの比較解析が可能となるためである。

解析の結果、ばく露終了日の時点（急性影響の検討）では、オープンフィールド試験（図 2）および明暗往來試験（図 3）共に、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は、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（図 4）。一方、ばく露 3 日後での解析では（遅発性影響の検討）、全ての試験項目で対照群と有意な差は認められず（図 5-7）、これらの低下は回復し、可逆的であることが示唆された。これにより、海馬に対する有害性が実証され、かつ、遺伝子発現変動データがこの異常に対する予見性を持つことを確認したものと考える。

一方、神経機能を修飾する化学物質による幼若期ばく露が成熟期に遅発性の情動認知行動異常を誘発する知見を別途得ており、幼若期マウスに指針値（案）の 10 倍濃度の TPM の反復吸入ばく露（7 日間）を実施した。成熟後、情動認知行動実験を実施する、すなわち遅発影響の検討を行う予定であり、令和元年度早々に結果が出る予定である。

D. 結論

このように、第 20 回「検討会」が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された 3 物質の内、まず TPM について、TPM の指針値レベルでの 22 時間/日×7 日間反復吸入ばく露の際、遺伝子発現変動解析から予見された情動認知行動の異常を確認すべく、指針値（案）の 10 倍程度の濃度での成熟期マウスへの 7 日間反復ばく露後の情動認知行動解析を実施した結果、ばく露 3 日後に回復する可逆性の学習記憶異常が誘発する事が明らかとなった（図 8）。本年度、計画通りに、本研究成果により、TPM が SH の誘因となるか否かの質的情報、及び、濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を提供できたものとする。神経機能を修飾す

る化学物質による幼若期ばく露が成熟期に遅発性の情動認知行動異常を誘発する知見を別途得ており、幼若期マウスについても指針値（案）の 10 倍濃度の TPM の反復吸入ばく露（7 日間）を実施した。成熟後、情動認知行動実験を実施する、すなわち遅発影響の検討を行う予定である。

令和元年度（来年度）は、第 20 回「検討会」が掲げた物質の中で高濃度・高頻度で検出された 3 物質の内、2, 2, 4-トリメチル-1, 3-ペンタンジオールジイソブチレート（TPD）につき、計画に則った同様な実験を実施、検討する予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiradate Y, Sasaki E, Momose H, Asanuma H, Furuhashi K, Takai M, Aoshi T, Yamada H, Ishii KJ, Tanemura K, Mizukami T, Hamaguchi I. Development of screening method for intranasal influenza vaccine and adjuvant safety in preclinical study. *Biologicals*. 55: 43-52., 2018.

Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 498(3): 674-679., 2018.

Yamada K, Hiradate Y, Goto M, Nishiyama C, Hara K, Yoshida H, Tanemura K. Potassium bromate disrupts mitochondrial distribution within murine oocytes during in vitro maturation. *Reprod Med Biol*. 17(2):143-148., 2018.

Kurita-Suzuki A, Kamo Y, Uchida C, Tanemura K, Hara K, Uchida T. Prolyl isomerase Pin1 is required sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 497(1):388-393., 2018.

Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H. Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA. J Vet Med Sci. 30;80(3):536-543., 2018.

2. 学会発表 (抜粋)

酒井和哉、大塚 (出田) まき、齊藤洋克、平舘裕希、原健士朗、五十嵐勝秀、種村健太郎、「精子エピゲノム影響評価による非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーの探索」第12回日本エピジェネティクス研究会年会 (2018. 5. 24-25)、札幌

○種村健太郎、「周産期における低用量化学物質暴露が引き起こす情動認知行動毒性評価系発現に関する最近の知見」第45回日本毒性学会学術年会 (2018. 7. 18-20)、大阪府

○ Hirokatsu Saito, Takashi Tominaga, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Early life exposure to low levels of permethrin exerts slight impairment of central nervous system in male mice」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム (2018. 7. 24-25)、京都市

Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Chemical-Induced epigenetic effects on mouse sperm using valproic acid」新学術領域「個性」創発脳・第1回国際シンポジウム (2018. 7. 24-25)、京都市

Kohei Umezu, Yuuki Hiradate, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Sperm migration is regulated by stromal cell-derived factor 1 in Japanese Black cattle」第11回日本繁殖生物学会大会 (日中韓国際シンポジウム) (2018. 9. 12-16)、上田市

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎、「ウシ精子走化性因子の特定と制御機構の解明」第2回日本胚移植技術研究会大会、(2018. 9. 20-21)、津市

○ Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura, 「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in

adult male mice」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

○ Kazuya Sakai, Masafumi Sekine, Jin Hiura, Hiroaki Okae, Takashi Tominaga, Takahiro Arima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, 「Paternal VPA-exposure affects the offspring's behavior through sperm DNA methylation」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

○後藤萌、齊藤洋克、原唯花、富永貴志、種村健太郎、「マウス行動様式と海馬神経回路機能～系統間差と交雑影響～」次世代脳プロジェクト-冬のシンポジウム、(2018. 12. 12-14)、東京都

○齊藤洋克、原健士朗、富永貴志、中島欽一、種村健太郎、「低用量ペルメトリン早期慢性暴露によるマウス次世代雄個体行動影響」第21回環境ホルモン学会研究発表会、(2018. 12. 15-16)、東京都

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

図 1

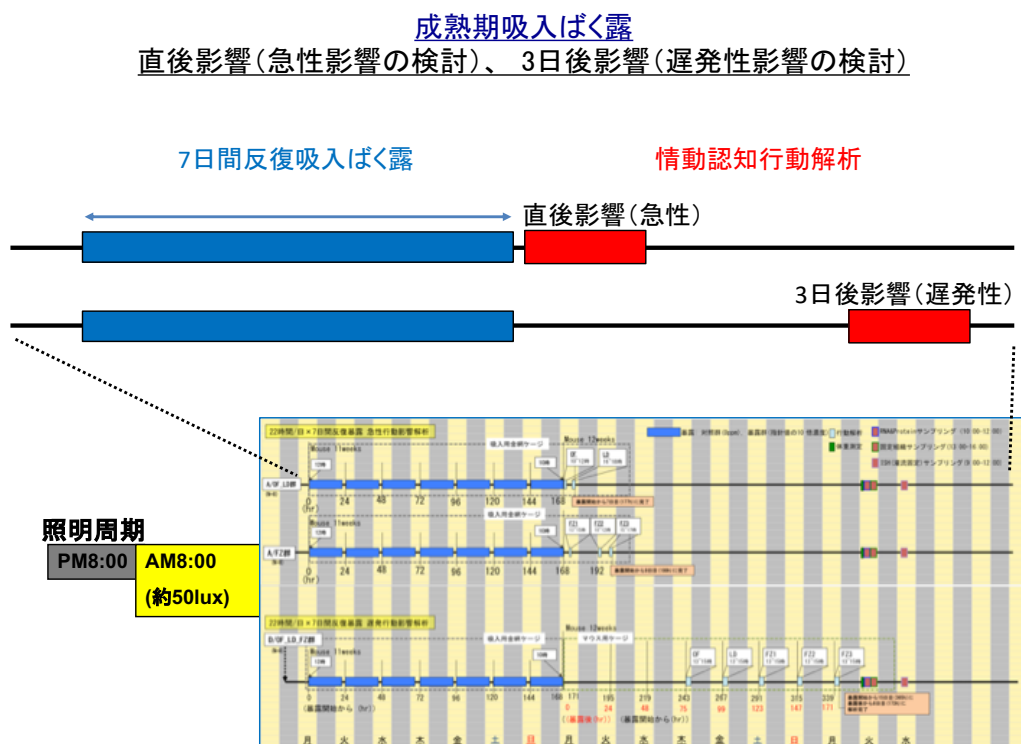


図 2

22時間7日間 TPM 0.3ppm吸入ばく露直後(0時間)の
オープンフィールド試験結果

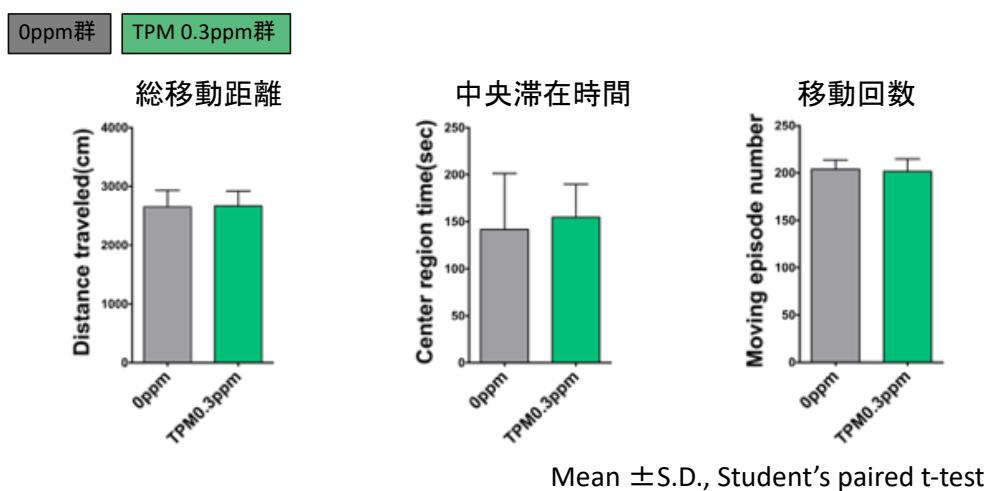


図 3

22時間7日間 TPM 0.3ppm吸入ばく露6時間後の
明暗往来試験結果

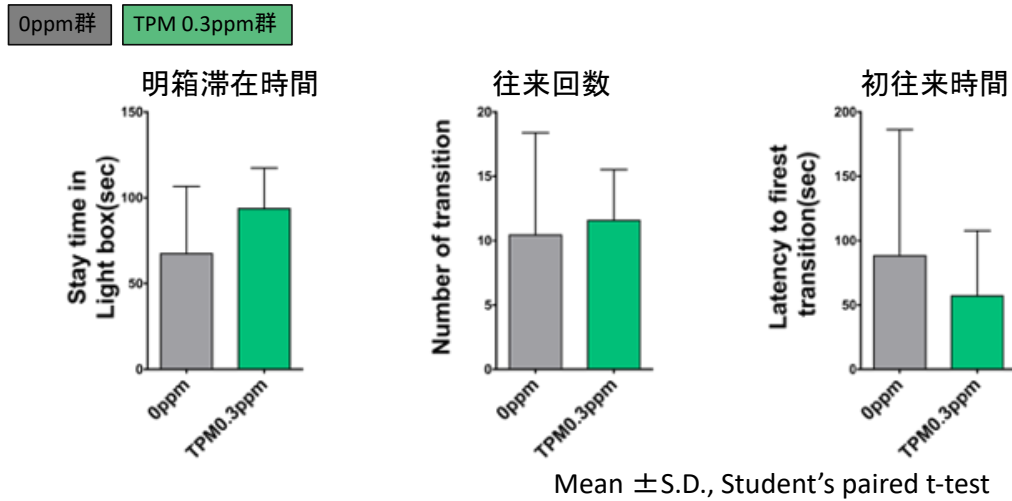


図 4

22時間7日間 TPM 0.3 ppm吸入ばく露3時間後に条件付け(FZ1)、
翌日に場所-連想記憶試験(FZ2)と音連想記憶試験(FZ3)をした結果

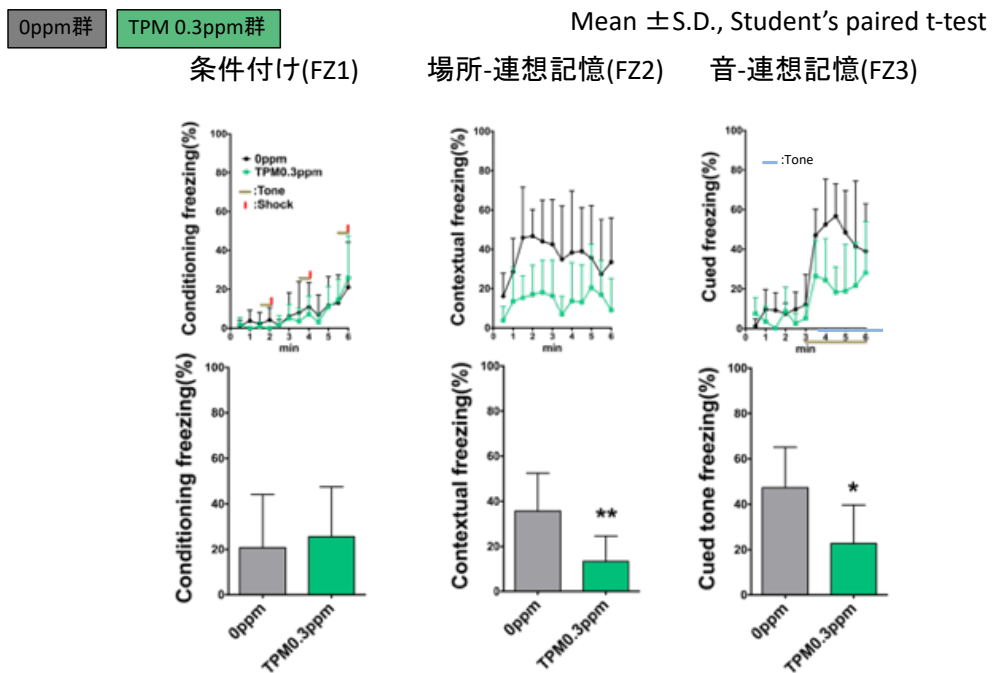


図 5

**22時間7日間 TPM 0.3 ppm吸入ばく露3日後の
オープンフィールド試験結果**

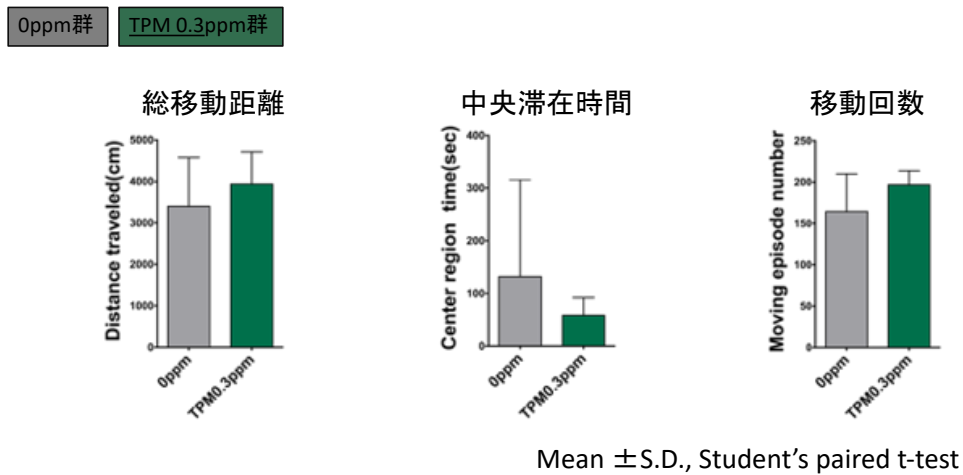


図 6

**22時間7日間 TPM 0.3 ppm吸入ばく露4日後の
明暗往来試験結果**

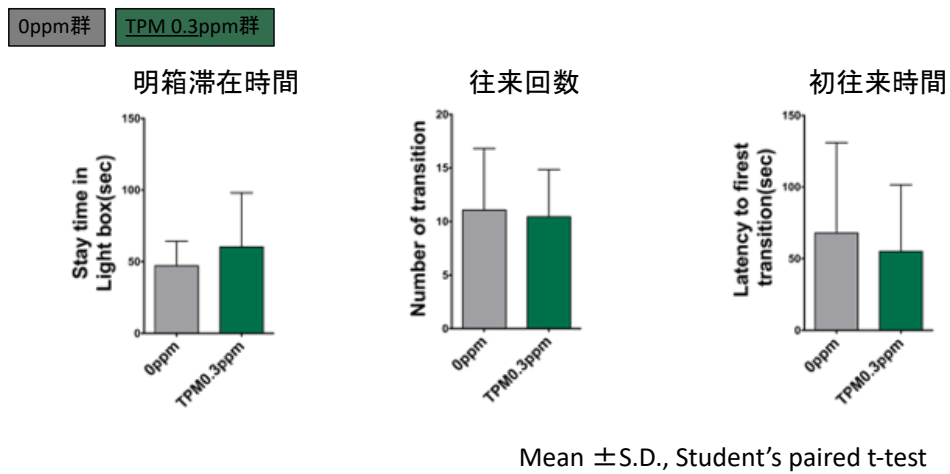


図 7

22時間7日間 TPM 0.2 ppm吸入ばく露5日後に条件付け(FZ1)、
6日後に場所-連想記憶試験(FZ2)、7日後に音連想記憶試験(FZ3)をした結果

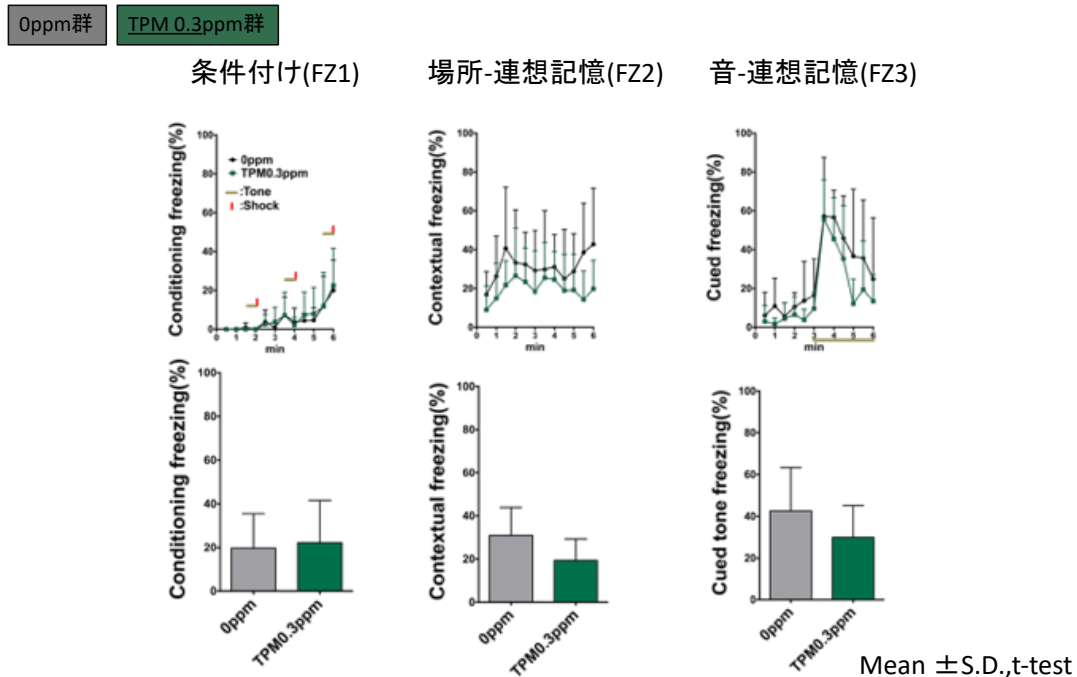
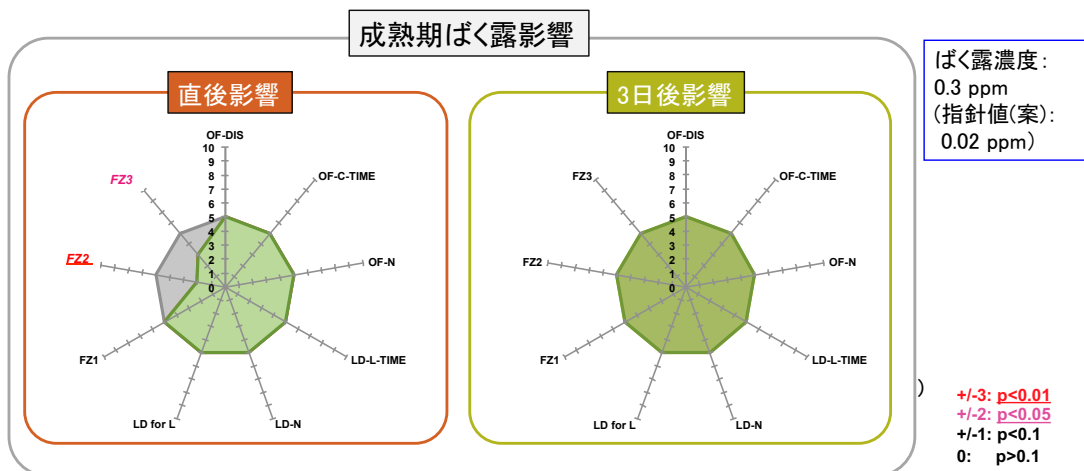


図 8

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール1-モノイソブチレート(TPM)の
情動認知行動影響(成熟期)

指針値(案)の10倍濃度(目標濃度)のTPMの成熟期マウスへの
22時間/日×7日間反復ばく露3日後:



→ 今後、幼若期ばく露を検討する