

## Ⅱ. 分担研究報告書

平成31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  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）、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31年度（今年度）は計画通りに、TPD（指針値（案）：8.5 ppb）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（8.5、27及び85 ppb）に対して、8.5、26.7及び81.7 ppb（それぞれ目標濃度に対して、100、98.8及び96.1%）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（85 ppb）に対して、83.9±5.3 ppb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、TPDの指針値（案）は、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ルにより実施する。

平成31年度（今年度）は、TPD（指針値（案）：8.5 ppb）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（8.5、27及び85 ppb）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）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、85 ppb：85 ppbは指針値（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。

## B. 研究方法

### B-1：被験物質

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート（TPD）  
(2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol Diisobutyrate; 分子量：286.41、CAS No. 6846-50-0、密度（20℃）0.95 g/ml)は、東京化成1級（EP）グレードを使用した。

製造元：東京化成工業株式会社  
販売元：東京化成工業株式会社  
試薬名：2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート

カタログ番号：T0997

ロット番号：4G6PD

純度：99.0%

沸点：280℃

蒸気圧：1.1 Pa（25℃）

比重：0.95

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、TPD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おいて実施した。

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31年度 (今年度) はTPD (指針値 (案) : 8.5 ppb) について、目標通りにSHレベルでの極低濃度下 (0、8.5、27及び85 ppb) 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°C) にしながら清浄空気のバブリングにより蒸発させた (目標吸入暴露濃度0.0085 ppmでは0.5L/min、0.027 ppmでは1.7 L/min、0.085 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 (0.0085、0.027及び0.085 ppm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、TPD (指針値 (案) : 8.5 ppb) についてSHレベル (0、85 ppb: 85 ppbは指針値の10倍濃度) での22時間/日×7日間反復ばく露を実施した。TPDガスの発生法は、バ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°Cに加温したTPDに清浄空気を送りバブリングによりガスを発生させ、20°C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°C、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 m<sup>3</sup>、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おいて実施した。

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、かつ色バイアルビン(日電理硝子株式会社)に入れ、二硫化炭素(富士フィルム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、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、TPD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

TPD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: TPD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TPDのばく露検討を行った。TPDの発生方法は、100mLの発生容器内のTPDを循環式恒温槽で一定温度(20℃)にしながらかつ色バイアルビンにより蒸発させた。この蒸気を清浄空気(希釈空気:1.5L/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0.0085ppmでは0.5L/min、0.027ppmでは1.7L/min、0.085ppmでは0.5L/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TPD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0.3L/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(富士フィルム和光純薬工業、作業環境測定用)2mL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。0.0085ppm群、0.027ppm群及び0.085ppm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2mL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 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 mmφ × 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°C、注入口温度は 200°C、検出器温度は 200°C、試料注入量は 1 μL とした。

その結果、吸入チャンバー内の TPD の濃度は、目標吸入暴露濃度 0.0085、0.027 及び 0.085 ppm に対して、それぞれ 0.0099 ± 0.0001 ppm、0.0297 ± 0.0031 ppm および 0.100 ± 0.002 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、0.0085 ppm では 0.12 L/min、0.027 ppm では 0.39 L/min および 0.085 ppm では 1.1 L/min に設定し、再度 TPD をばく露した。その吸入チャンバー内の TPD の濃度は、目標吸入暴露濃度 0.0085、0.027 及び 0.085 ppm に対して、それぞれ 0.0078 ± 0.001 ppm、0.0257 ± 0.023 ppm および 0.0804 ± 0.002 ppm であり目標値に近い値であった。

以上のことから、TPD 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 TPD の濃度測定

目標吸入ばく露濃度 0.0085、0.027 及び 0.085 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、0.0085 ppm では 0.12 L/min、0.027 ppm では 0.39 L/min および 0.085 ppm では 1.1 L/min に設定し、TPD をばく露した。

目標暴露濃度 0.0085、0.027 及び 0.085 ppm に対し、測定値の平均 ± 標準偏差 (最低 ~ 最高値) は、それぞれ 0.0085 ± 0.0007 ppm (0.0075 ppm ~ 0.0098 ppm)、0.0267 ± 0.0008 ppm (0.0255 ppm ~ 0.0276 ppm) 及び 0.0817 ± 0.0017 ppm (0.0788 ppm ~ 0.0834 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 100、98.8 及び

96.1% と、96 ~ 100% の濃度でばく露できた。従って、TPD の室内濃度指針値 (案) である 8.5 ppb を考慮した 8.5、27 及び 85 ppb 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 × 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、供給流量は吸入チャンバー内の TPD 濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度 85 ppb に対して 13 ~ 22.5 L/分とし、吸入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 85 ppb の吸入チャンバーの実測値 (以下、平均値 ± 標準偏差、最小 ~ 最大値) は、83.9 ± 5.3 ppb (76.0 ~ 90.5 ppb) と、目標濃度に対し 99% の濃度でばく露できた (図 4B)。また対照群吸入チャンバー内に TPD は検出されなかった。

#### D. 結論

平成 31 年度 (今年度) は計画通りに、TPD (指針値 (案): 8.5 ppb) 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 (8.5、27 及び 85 ppb) に対して、それぞれ 8.5、26.7 及び 81.7 ppb (それぞれ目標濃度に対して、100、98.8 及び 96.1%) と、いずれの場合も 96 ~ 100% の濃度で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、85 ppb) (85 ppb は指針値の 10 倍濃度) に対して 83.9 ± 5.3 ppb と、目標濃度に対し 99% の濃度でばく露できた。

#### E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol 2, Article number: 57, 2019.

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. Mol Pharmacol, 96(5): 600-608, 2019.

北嶋 聡、エディトリアル：ドーピングの中毒学・毒性学-序文-、中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.) 32: 373-374. 2019.

### 2. 学会発表

○北嶋 聡、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-、環境科学会 2019 年会(2019. 9. 13.)

北嶋聡、近藤一成：ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、日本食品化学学会 第 35 回食品化学シンポジウム (2019. 11. 8)

登田美桜、北嶋聡、フグ毒として知られるテトロドトキシンのリスク評価に関する国際的動向-マウスユニットと急性参照用量-、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019. 6. 26)

R. Ono, Y. Yasuhiko, K. Aisaki, S. Kitajima, J. Kanno, Y. Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019. 9. 9), Helsinki, Finland, Poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第 15 回国際毒性学会 (ICT XV) (2019. 7. 17), Hawaii, USA, Poster

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno., Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid. 第 15 回国際毒性学会 (ICT XV) (2019. 7. 16), Hawaii, USA, Poster

種村健太郎、北嶋聡、菅野純、幹細胞分化から見る子どもの毒性学：シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～. 第 46 回日本毒性学会学術年会, (2019. 6. 28), 徳島, シンポジウム, 口演

菅野純、北嶋聡、相崎健一、小野竜一、エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 -「新型」反復曝露試験の解析-. 第 46 回日本毒性学会学術年会, (2019. 6. 28), 徳島, シンポジウム, 口演

夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GOSH, 北野宏明、水口賢司、菅野純、エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測. 第 46 回日本毒性学会学術年会, (2019. 6. 28), 徳島, シンポジウム, 口演

小野竜一、相崎健一、北嶋聡、菅野純、毒性エピゲノミクスの新潮流 Percellome プロジェクトから見てきたエピジェネティクス影響. 第 46 回日本毒性学会学術年会, (2019. 6. 27), 徳島, シンポジウム, 口演

J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), Anaheim, USA, ePoster.

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～」第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019. 6. 26)

種村健太郎、北嶋聡、菅野純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019. 6. 28)

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況

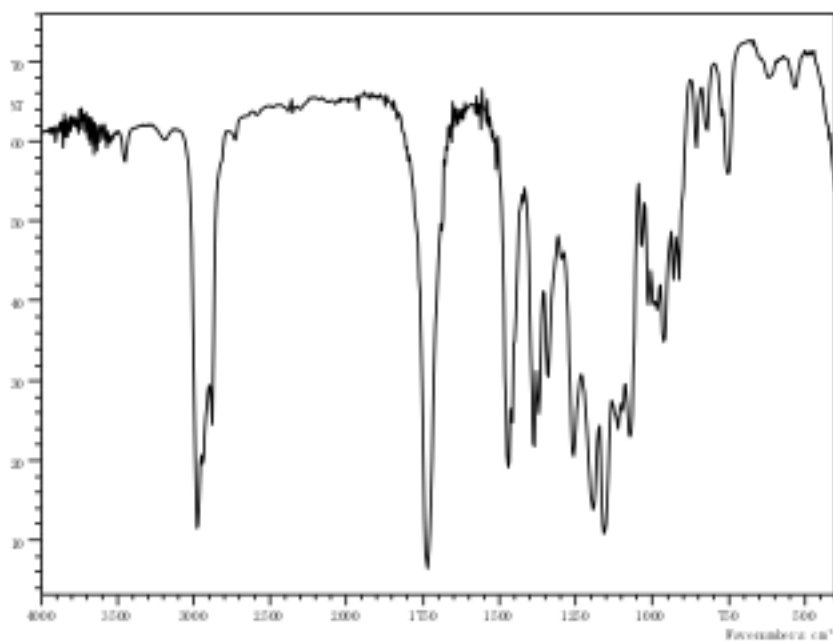
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



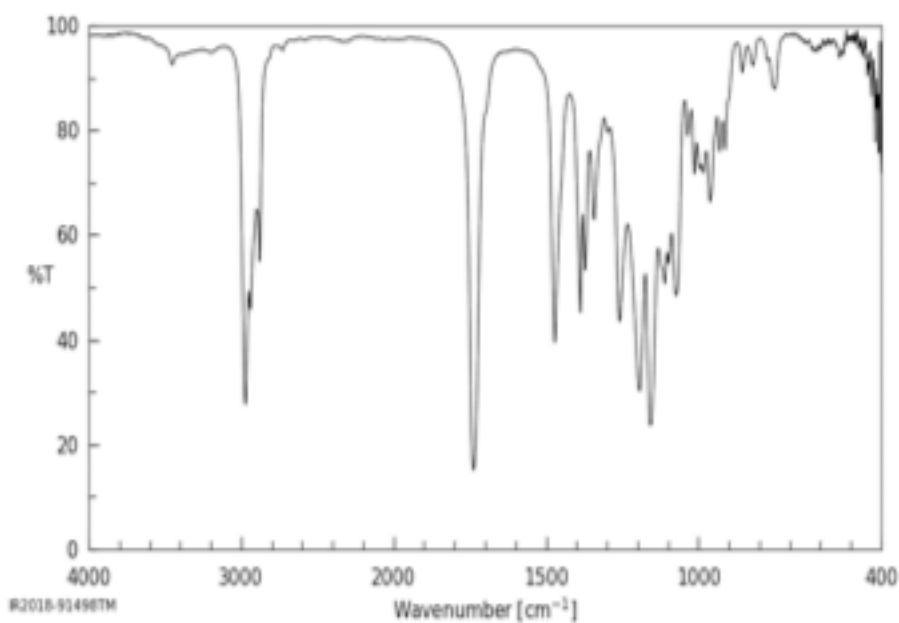
表 1 吸入チャンバー内の TPD 濃度 (22 時間暴露)

単位 : ppm

	対照群	0.0085 ppm 群	0.027 ppm 群	0.085 ppm 群
6 月 18 日午後 0 時から	0	0.0089	0.0255	0.0788
6 月 19 日午前 10 時				
6 月 19 日午後 0 時から	0	0.0083	0.0273	0.0827
6 月 20 日午前 10 時				
6 月 20 日午後 0 時から	0	0.0079	0.0264	0.0834
6 月 21 日午前 10 時				
6 月 21 日午後 0 時から	0	0.0075	0.0259	0.0819
6 月 22 日午前 10 時				
6 月 22 日午後 0 時から	0	0.0098	0.0275	0.0803
6 月 23 日午前 10 時				
6 月 23 日午後 0 時から	0	0.0084	0.0276	0.0833
6 月 24 日午前 10 時				
6 月 24 日午後 0 時から	0	0.0086	0.0271	0.0808
6 月 25 日午前 10 時				
平均濃度	0	0.0085	0.0267	0.0817
標準偏差	0	0.0007	0.0008	0.0017



被験物質の赤外吸収スペクトル



2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートの赤外吸収スペクトル  
 有機化合物のスペクトルデータベース SDBS 国立研究開発法人産業技術総合研究所  
 ([https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi))

図 1 赤外吸収スペクトル

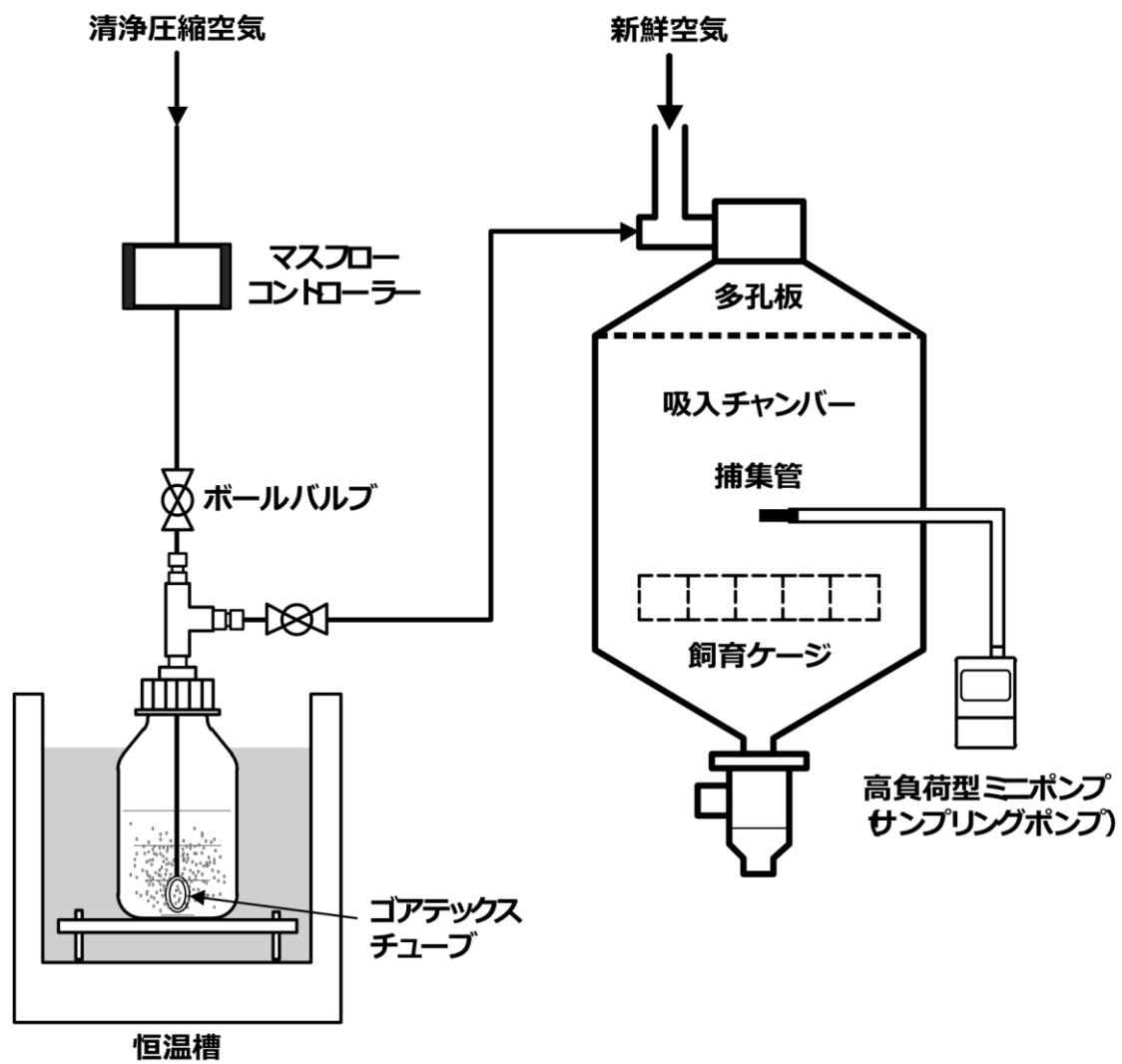


図2 吸入ばく露装置のシステム



Photo 1 3m<sup>3</sup>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 MP  $\Sigma$ -30、(柴田科学)

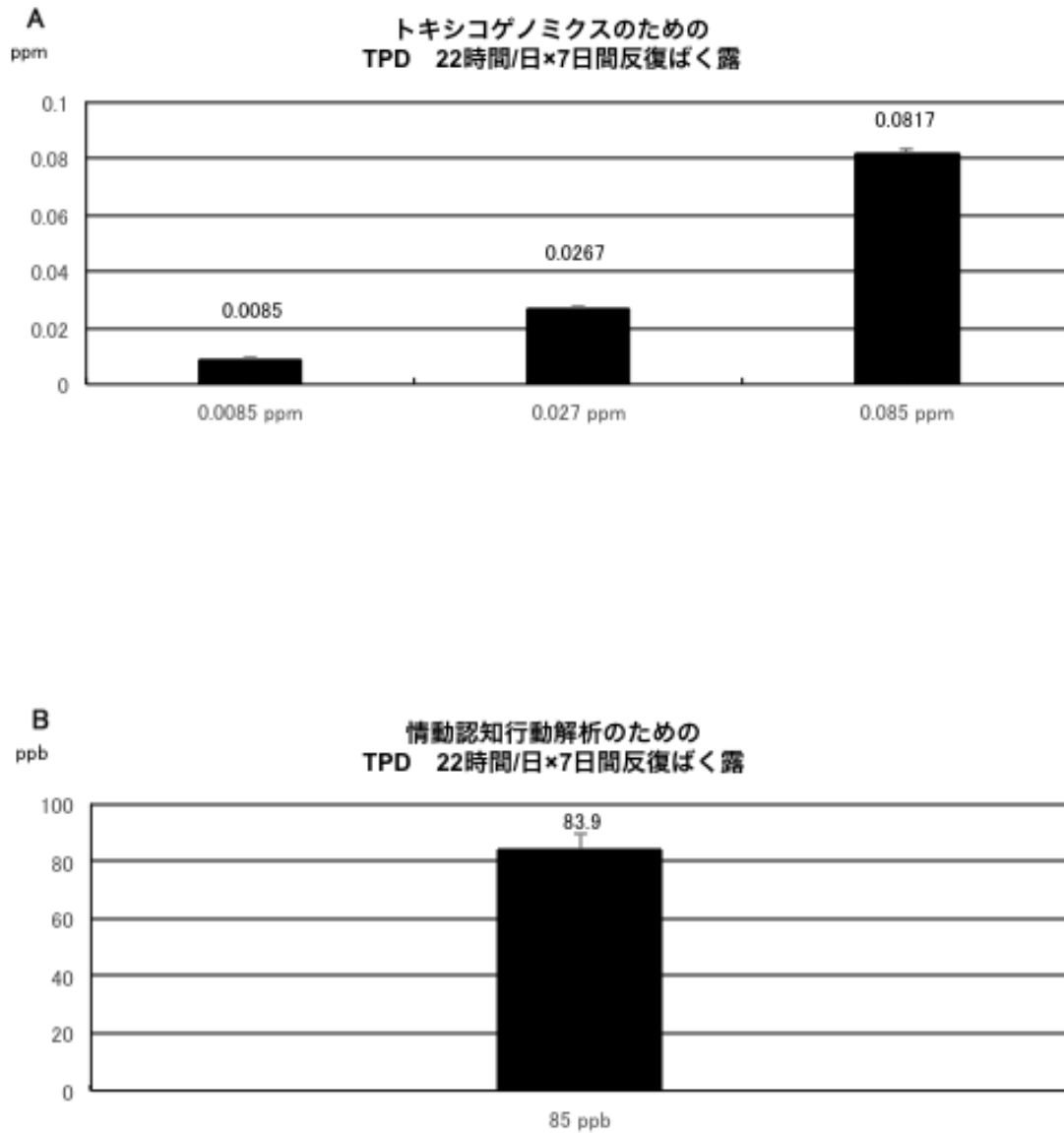


図4 TPDばく露濃度の測定結果

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。

平成31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 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 所長

### 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  $\mu$ g/m<sup>3</sup>）、0.03 ppm（240  $\mu$ g/m<sup>3</sup>）、8.5 ppb（100  $\mu$ g/m<sup>3</sup>）と設定された。

平成31年度（今年度）はTPD（指針値（案）：8.5 ppb）について予定通り、SHレベル（0、8.5、27及び85 ppb）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化学物質と比較し、有意に弱く観測され、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時間後でも回復が遅れた。

また平成29年度実施の2E1Hの吸入ばく露に際し、先行研究におけるSH関連物質の場合と同様に、Cyr61遺伝子の有意な発現増加を見出し、肺における生体防御の発動を示唆する影響を捕捉できたものと考えられる。

## 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、その分子機序に関す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  $\mu$ g/m<sup>3</sup>)、0.03 ppm (240  $\mu$ g/m<sup>3</sup>)、8.5 ppb (100  $\mu$ g/m<sup>3</sup>)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31年度)は、TPD(指針値(案):8.5 ppb)について検討した。

## B. 研究方法

### Total RNAの分離精製

マウス組織を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)に4°Cで一晩浸漬し、RNaseを不活化する。肝は5mm径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。肺は気管からRNA laterを注入し、RNaseの不活化を促した後、採取した。脳は摘出後、カミソリ刃にて正中で左右に切断し左部について、小脳、脳幹、海馬及び大脳皮質の4部位に分離後、各々別チューブに採取した。その後、RNA抽出操作までは-80°Cにて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除いた後、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の10  $\mu$ 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  $\mu$ 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°Cにて18時間行い、バッファーによる洗



浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。

吸入ばく露後、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。

#### 吸入ばく露実験

今年度（平成31年度）は、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) (2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol Diisobutyrate; 分子量: 286.41、CAS No. 6846-50-0、密度 (20°C) 0.95 g/ml、ロット番号: 4G6PD、カタログ番号: T0997、純度 99.0%、東京化成1級 (EP) グレード、東京化成工業株式会社) 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、TPDの指針値(案) (8.5 ppb [= 100 µg/m<sup>3</sup>]) を参照し、公比√10で (0、8.5、27及び85 ppb) 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、TPD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: SHレベルでの TPD [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: TPD [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740 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; VSP) として48 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、転写因子としては TCF7L2 が、サイトカイン、ケモカインとしては IGF1、BDNF 及び TGFβ1 が抽出されてきたが (< E-5)、神経系の障害、病態に関与することが示唆されるシグナルネットワークとの関わりは現時点では不明であった。

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 1,247 ps、V S Pとして 12 ps が見いだされた。この内、神経系の障害、病態に関与することが示唆されるシグナルネットワークとして、神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) が見出され、具体的にはこの発現の抑制が、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)と比較し、有意に弱く観測され、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 時間後でも回復が遅れた。具体的には、IEG 遺伝子の内、ばく露 166 時間後には、低・中・高濃度ともに有意に抑制が認められた遺伝子は Fos、Dusp1、Nr4a1 及び Junb 遺伝子のみであった。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、Po1 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 の遺伝子の内、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、TPD と、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 (図 1)。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。

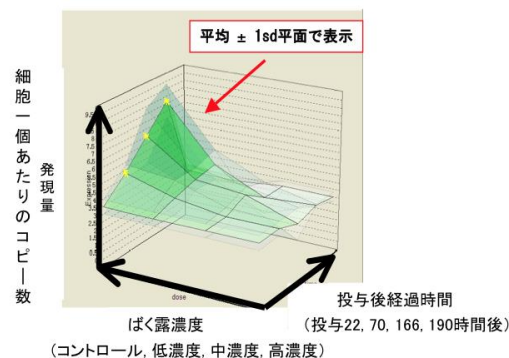


図 1 遺伝子発現変動を示す図

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 次元の曲面グラフとして示し、各条件の 3 サンプルの平均値を示す曲面と、その上下に標準偏差(SD)平面 (薄い色) をあわせて示した。一つの化学物質につき、約 45,000 枚の平面が描かれる。

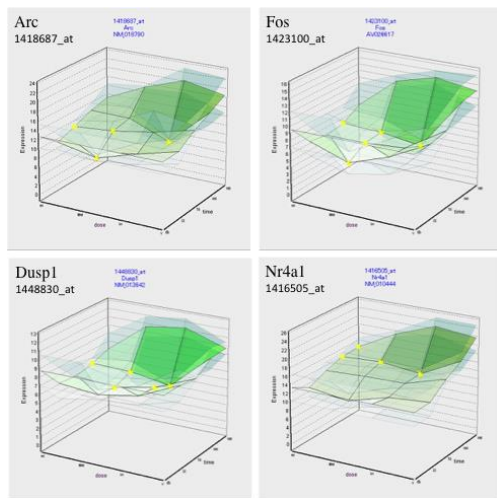


図2 TPD [22 時間/日×7日間反復] ばく露時の「海馬」における IEG の内、Arc と Fos (上段、左から)及びDusp1 と Nr4a1 (下段、左から) 遺伝子の発現変動

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。

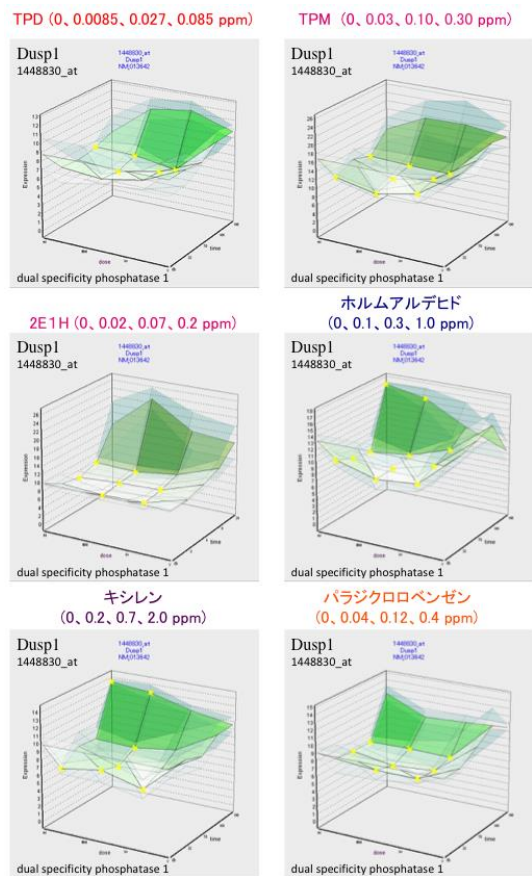


図3 TPD、TPM、2E1H、ホルムアルデヒド、キシレン及びパラジクロロベンゼン[22 時間/日×7日間反復] ばく露時の「海馬」における IEG の内、Dusp1 遺伝子の発現変動

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抑制パターンを示した。

一方、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 を用いて検討した結果、転写因子としては CREM、CREB1、SRF、ARID1B、ID3、ID2、TLE1、RELA 及び HOXA5 が、サイトカイン、ケモカインとしては IL1B、CCL5、IFNG 及び IGF1 が抽出されてきた (< E-5)。神経系の障害、病態に関与することが示唆されるシグナルネットワークとの関わりは、この内、IL1B シグナルが見出された (後述)。Upstream 解析では、IL1B が発現を抑制し得る遺伝子として、発現減少が認められた遺伝子の中で、ARC、DUSP1、FOS、GADD45B、IER2 及び IRAK1 遺伝子が抽出されてきた。

C-1-2: TPD [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:

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

C-1-3: TPD [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、今後、他臓器関連解析とあわせ、解析を実施する予定である。

C-2: SHレベルでの 2-エチル-1-ヘキサノール (2E1H) [22 時間/日×7 日間反復] ばく露時の遺伝子発現変動解析:

平成 29 年度に吸入ばく露を検討した 2E1H について、肺および肝における遺伝子発現変動解析を実施した。

C-2-1: 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 393 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 V S P として 14 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。ただし、肺の炎症防御に関わる Cyr61 遺伝子の発現増加が認められた。この肺における発現増加は、先行研究において、多くの SH 関連物質 (トルエン、キシレン、スチレン、テトラデカン、パラジクロロベンゼン、クロルピリフォス、ダイアジノンの場合) の吸入曝露の際にも認められた。したがって、2E1H の吸入ばく露に際し、肺における生体防御の発動を示唆する影響を捕捉できたものとする。この Cyr61 遺伝子の発現変動を図 4 に示す。

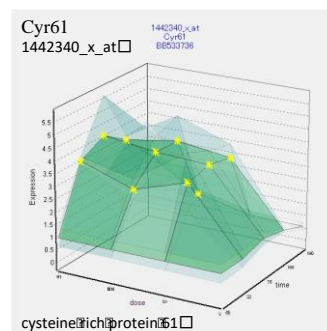


図 4 2E1H [22 時間/日×7 日間反復] ばく露時の「肺」における Cyr61 遺伝子の発現変動

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、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243 ps、VSPとして21 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-2-2: 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:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして1,510 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VSPとして410 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306 ps、VSPとして7 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。

#### 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31年度(今年度)はTPD(指針値(案):8.5 ppb)について、SHレベル(0、8.5、27及び85 ppb)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、成熟期マウス海馬において神経活動の指標となるIEGの発現の抑制が、指針値(案)レベルの濃度から、先行研究でばく露したSH化学物質と比較し、有意に弱く観測され、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時間後でも回復が遅れた。

このIEGの抑制機序として、先行研究では、6時間/日×7日間反復ばく露時の肝・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IL1β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-1β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。今年度のTPDの実験においても、発現減少が認められる遺伝子の*in silico*でのプロモーター解析においてもIL1Bが抽出されたことは、この可能性を支持するものと考ええる。

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IL1βの遺伝子の発現変動を図5に示す。なおIL-1β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-1β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-1β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-1βが海馬に影響を与え得るものと考ええる。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-1β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-1β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-1βとは異なる新たな候補分子を探索する。

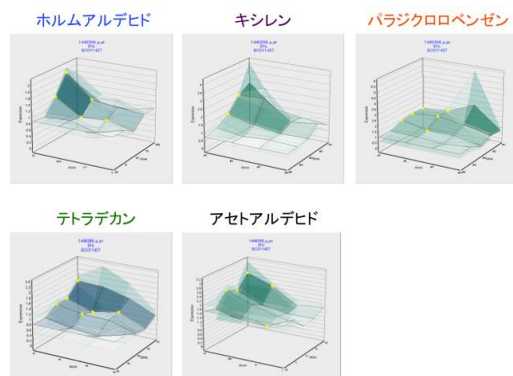


図5 ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン、テトラデカン及びアセトアルデヒドにおける6時間/日×7日間反復ばく露時の「肺」におけるI11β遺伝子の発現変動

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、予定通り、TPD(指針値(案):8.5ppb)について、SHレベル(0、8.5、27及び85ppb)での22時間/日×7日間反復吸入ばく露により、神経活動の指標となるIEGの発現抑制が、指針値(案)レベルの濃度から、先行研究でばく露したSH化学物質と比較し、有意に弱く観測されたことから、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。

また平成29年度実施の2E1Hの吸入ばく露に際し、先行研究におけるSH関連物質の場合と同様に、Cyr61遺伝子の有意な発現増加を見出し、肺における生体防御の発動を示唆する影響を捕捉できたものと考ええる。

このIEGの抑制機序として、肺或いは肝からの二次的シグナルとしてI11β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・肺の関連解析から、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1β(I11β)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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019.

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, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. (2019) Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Arch Toxicol*. 2019 Feb 13. doi: 10.1007/s00204-019-02410-z.

### 2. 学会発表

J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), Anaheim, USA, ePoster.

R. Ono, Y. Yasuhiko, K. Aisaki, S. Kitajima, J. Kanno, Y. Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster

Jun Kanno, Analysis of the effect of epigenetic modification on gene expression by the newly designed repeated dose study - progress report of the Percellome Project. Gordon Research Conference: Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2019.8.11-16), Proctor Academy, NH, USA, Poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of "Signal Toxicity" for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.17), Hawaii, USA, Poster

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno., Cross Talks among PPAR $\alpha$ , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster

菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中樞神経影響の評価の現状 「シグナル毒性」の概念と子どもの毒性学. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中樞神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性~子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在~. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

菅野純, 北嶋聡, 相崎健一, 小野竜一, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 - 「新型」反復曝露試験の解析-. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シン

ポジウム, 口演

夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Samik GOSH, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

小野竜一, 相崎健一, 北嶋聡, 菅野純, 毒性エピゲノミクスの新潮流 Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.27), 徳島, シンポジウム, 口演

種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純 「発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現~海産毒による異常誘発モデルとしての検討~」第46回日本毒性学会学術年会 (2019.6.26-28) 徳島市

#### 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、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 31 年度 (今年度) は TPD (指針値 (案) : 8.5 ppb) について、SH レベル (0、8.5、27、85 ppb) 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を弱く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 TPD 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、ばく露終了日の時点 (急性影響の検討) 並びに、ばく露 3 日後での解析 (遅発性影響の検討) 共に、全ての試験項目で対照群と有意な差は認められず、情動認知行動異常は認められなかった。この理由として、TPD の場合、成熟期マウス海馬において神経活動の指標となる IEG の発現抑制の程度が弱いためである事が考えられた。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、TPM を対象とし 0.3 ppm (指針値 (案) の 10 倍濃度)、幼若期 (2 週齢) マウスに 22 時間/日  $\times$  7 日間反復吸入ばく露を実施し、成熟後 (12 週齢) に情動認知行動解析を検討した結果、音-連想記憶の有意な低下が認められた。すなわち、遅発性に学習記憶障害が認められ、生後脳発達への有害性が示唆された。



## 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、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、明暗往來試験、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31年度（今年度）はTPDを対象とし、TPM（0、85 ppb）（85 ppb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）でのオープンフィールド試験（図 2）、明暗往來試験（図 3）及び、条件付け学習記憶試験（空間-連想記憶及び音-連想記憶）（図 4）、並びに、ばく露 3 日後での解析（遅発性影響の検討）（図 5-7）共に、全ての試験項目で対照群と有意な差は認められず、情動認知行動異常は認められなかった。この理由として、TPD の場合、成熟期マウス海馬において神経活動の指標となる IEG の発現抑制の程度が弱いためである事が考えられた。

加えて、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、指針値(案)の 10 倍濃度の (TPD ではなく)TPM について、幼若期ばく露後、成熟期に解析を検討した結果、遅発性に学習記憶障害が認められ、生後脳発達への有害性が示唆された。結果を、上記、成熟期ばく露の場合と同様に、図 8-1 3 に示す。

#### 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、TPD 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、ばく露終了日の時点（急性影響の検討）並びに、ばく露 3 日後での解析（遅発性影響の検討）共に、情動認知行動異常は認められなかった（図 8）が、この理由として、TPD の場合、成熟期マウス海馬において神経活動の指標となる IEG の発現抑制の程度が弱いためである事が考えられた。本年度、計画通りに、本研究成果により、

TPD 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。加えて、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、指針値(案)の 10 倍濃度の TPM について、幼若期ばく露後、成熟期に解析を検討した結果、遅発性に学習記憶障害が認められ、生後脳発達への有害性が示唆された。今後も引き続き、この遅発影響の検討を行う予定である。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primerepair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. *J Reprod Dev.* 2019 Nov 24. doi: 10.1262/jrd.2019-088. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31761839.

Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol.* 2019 Dec;39(12):1651-1662. doi: 10.1002/jat.3882. Epub 2019 Aug 15. PubMed PMID: 31415104.

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. *Zygote.* 2019 Aug;27(4):250-254. doi: 10.1017/S0967199418000370. Epub 2019 Aug 9. PubMed PMID: 31397238.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol.* 2019 Jun 9;18(3):247-255. doi: 10.1002/rmb2.12283. eCollection 2019 Jul. Review. PubMed PMID: 31312103; PubMed Central PMCID: PMC6613016.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev.* 2019 Aug 9;65(4):327-334. doi: 10.1262/jrd.2019-008. Epub 2019 Jun 10. PubMed PMID: 31178551; PubMed Central PMCID: PMC6708848.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *J Reprod Dev.* 2019 Apr 12;65(2):147-153. doi: 10.1262/jrd.2018-147. Epub 2019 Jan 19. PubMed PMID: 30662011; PubMed Central PMCID: PMC6473113.

## 2. 学会発表 (抜粋)

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of "Signal Toxicity" for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019. 7. 17), Hawaii, USA, Poster

種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中樞神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性~子どもの毒性学に向けた評価系開

発の現在~. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019. 6. 28), 徳島, シンポジウム, 口演

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」 the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019. 7. 15-18) ホノルル

種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純 「発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現~海産毒による異常誘発モデルとしての検討~」第46回日本毒性学会学術年会 (2019. 6. 26-28) 徳島市

## 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

成熟期吸入ばく露  
直後影響(急性影響の検討)、3日後影響(遅発性影響の検討)

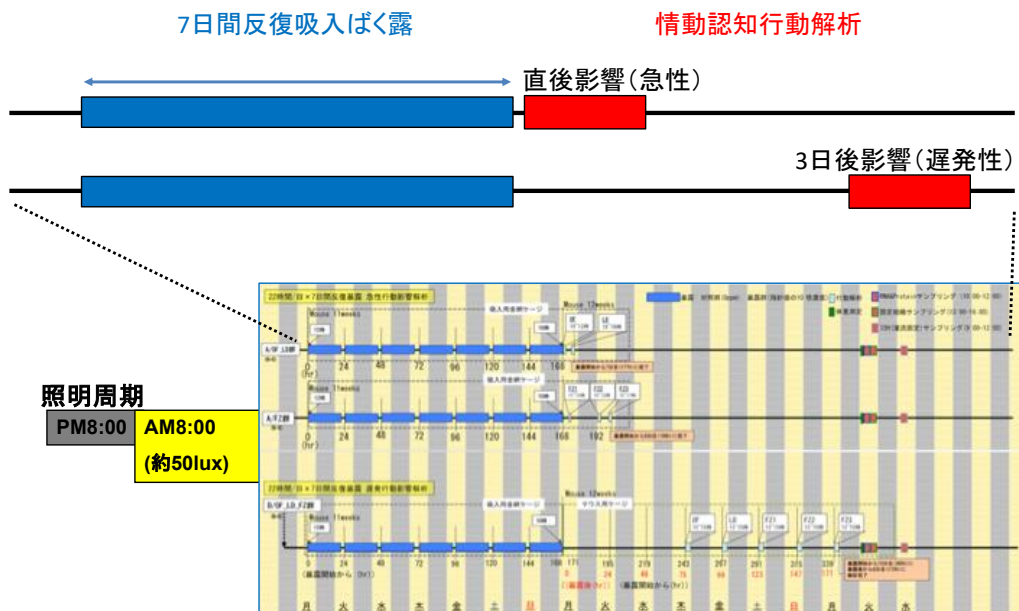


図 2

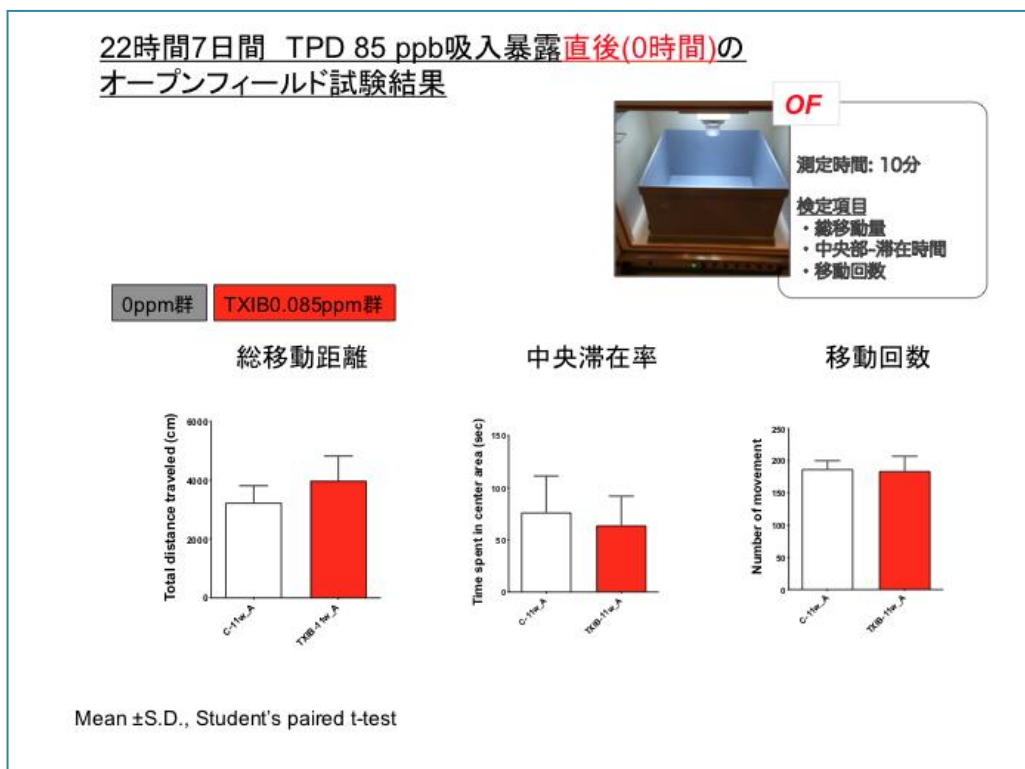


図 3

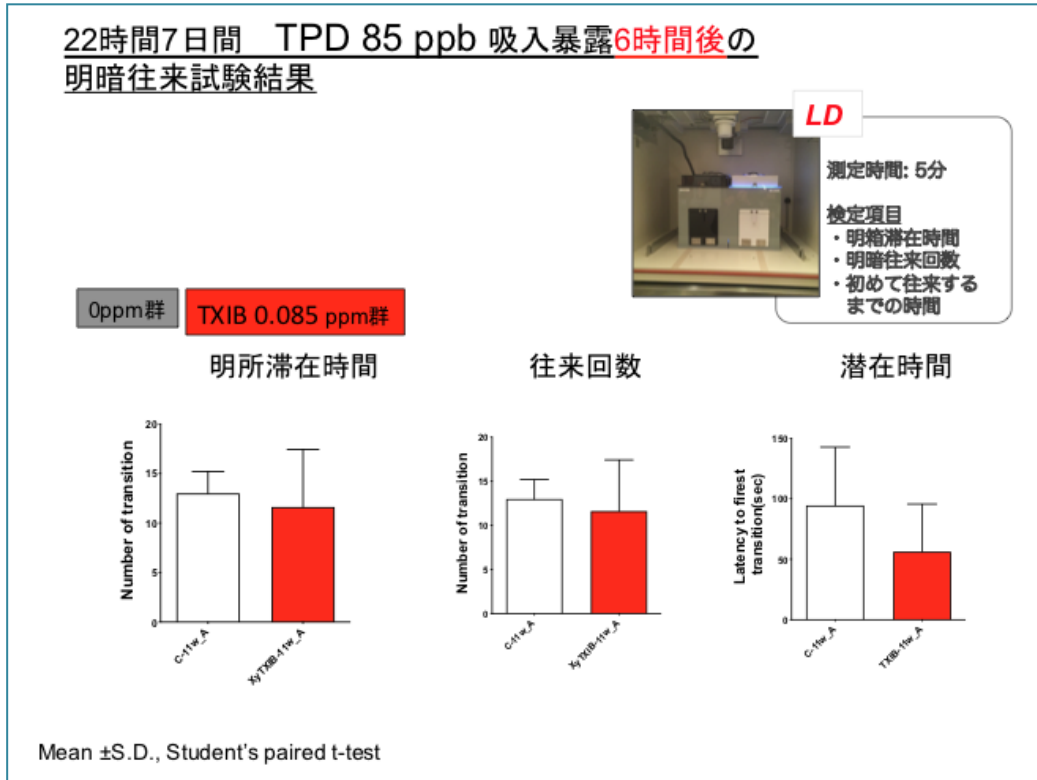


図 4

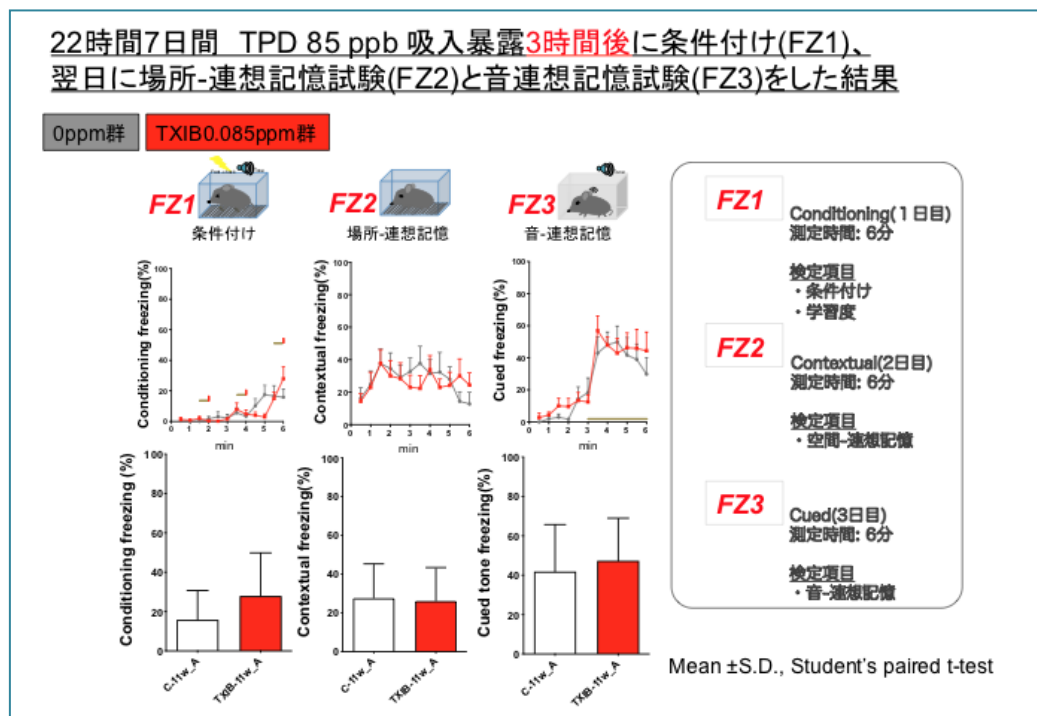


図 5

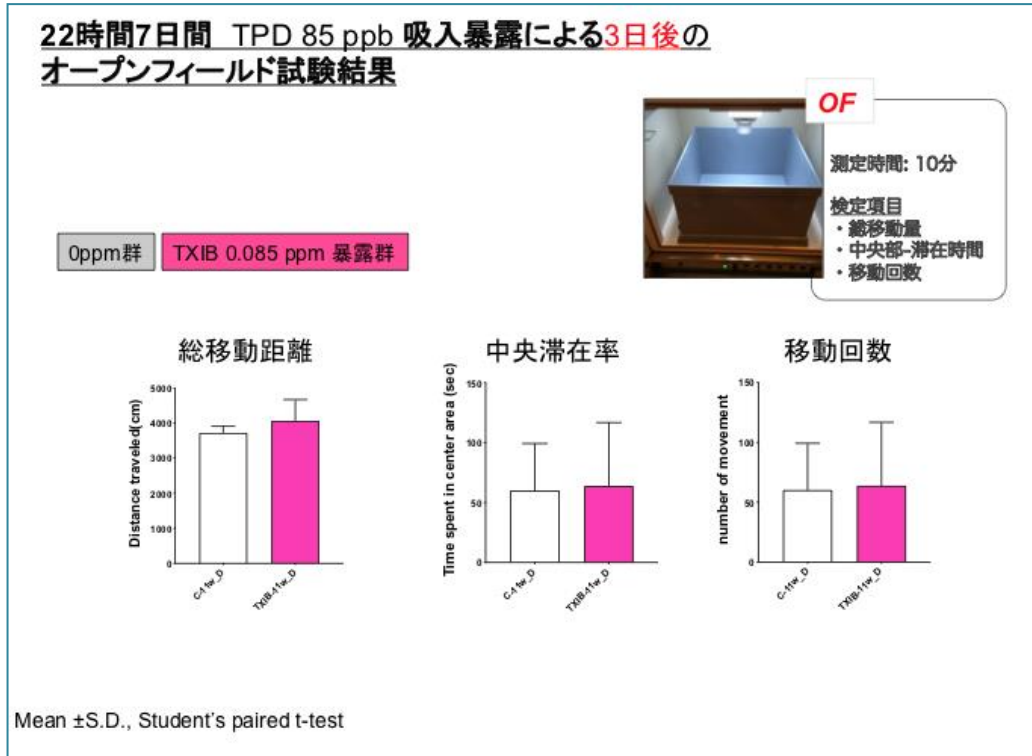


図 6

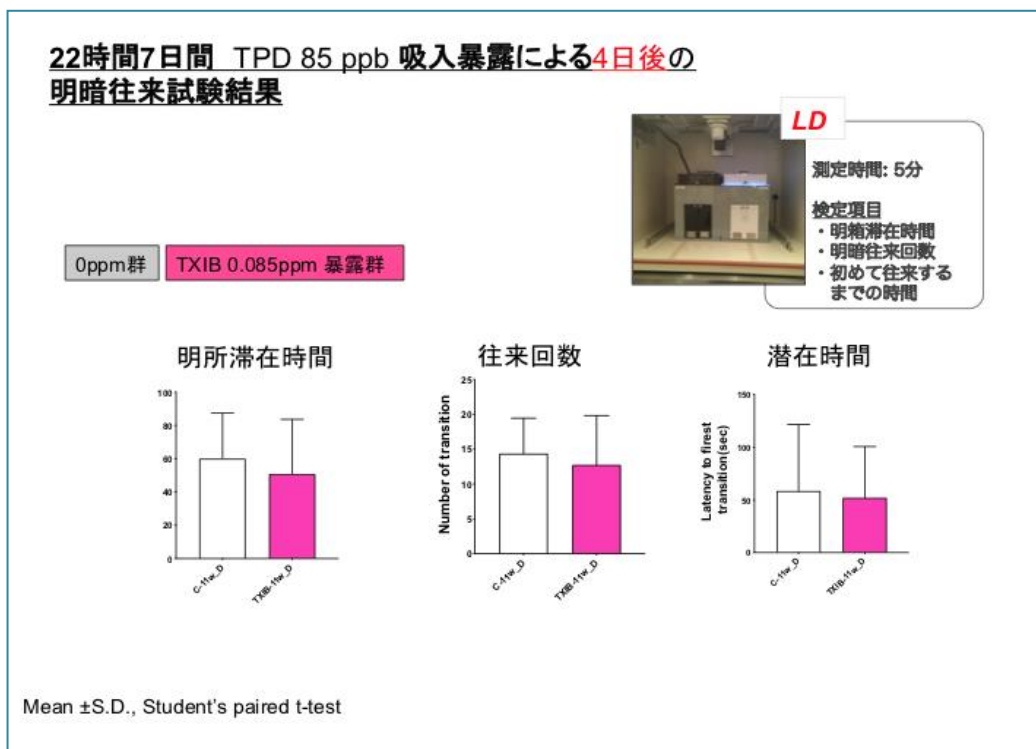


図 7

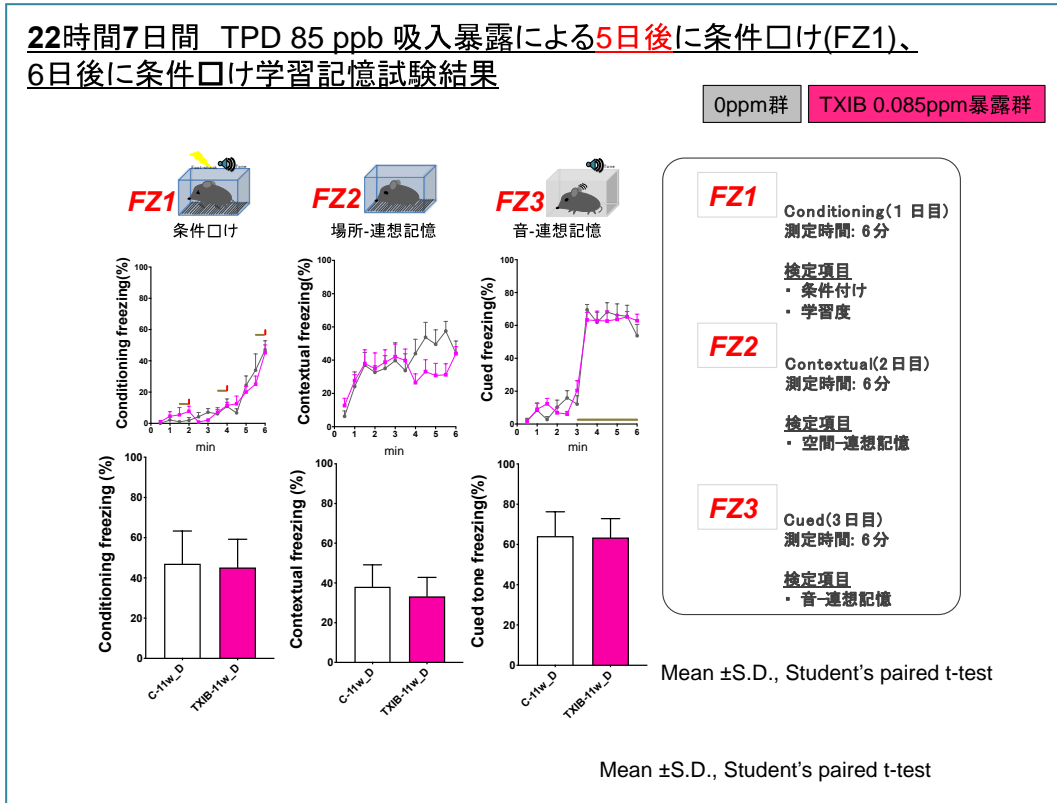


図 8

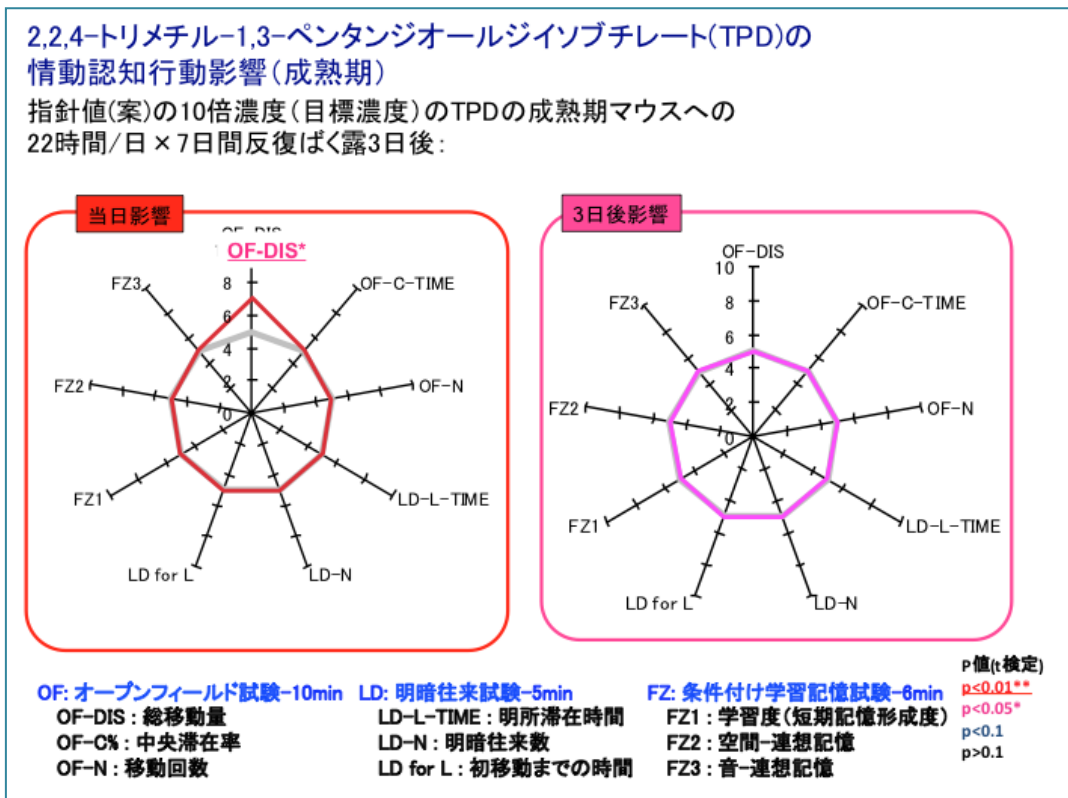


図 9

TPMの幼若期吸入暴露後  
12週齢(成熟期)時の情動認知行動影響の解析(遅発性影響の検討)

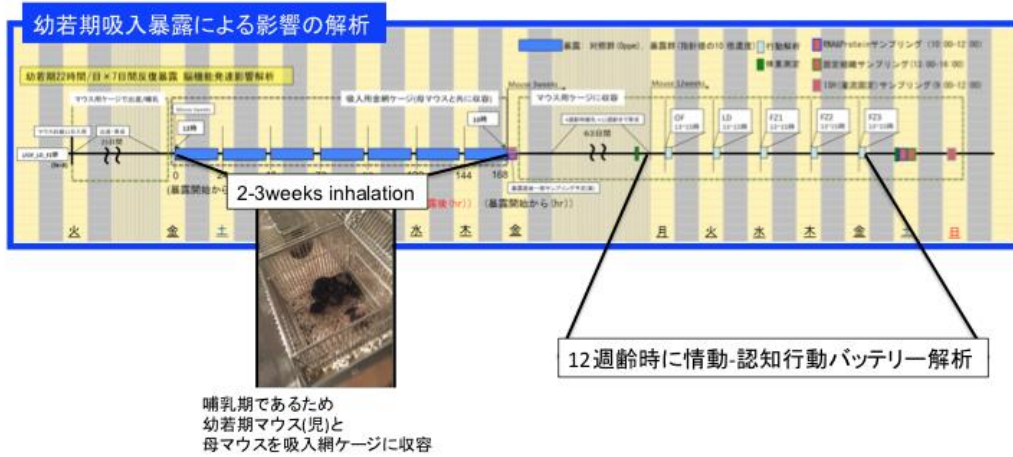


図 1 0

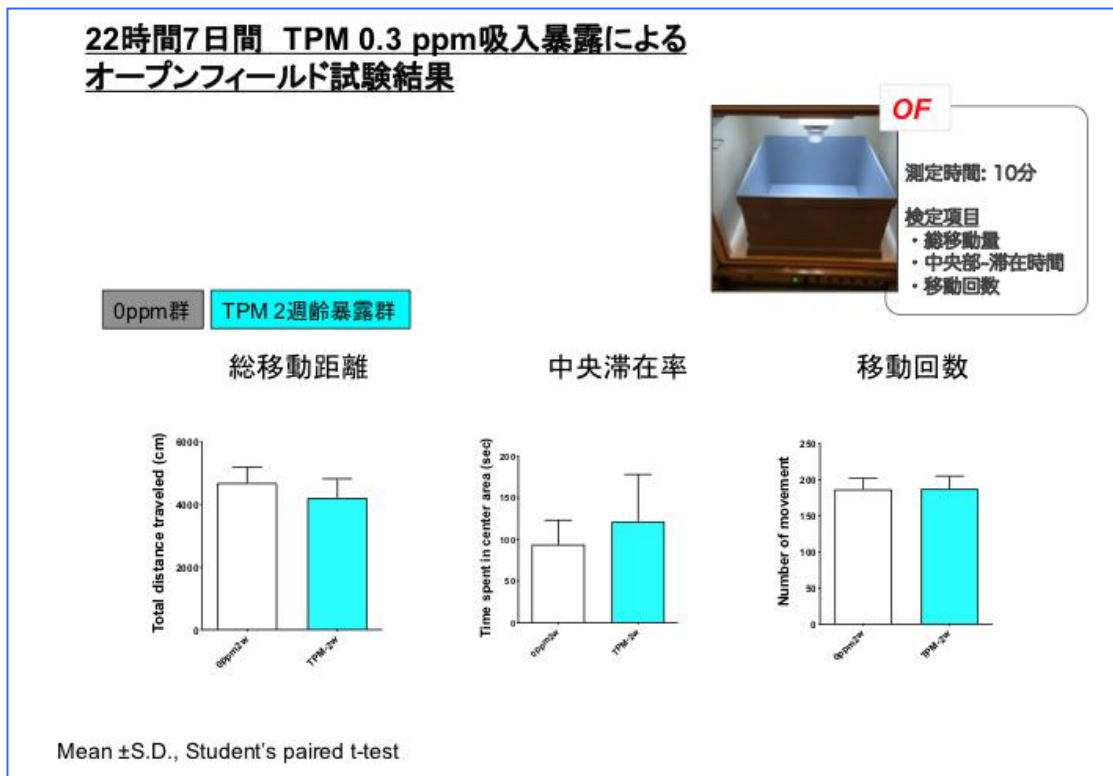




図 1 1

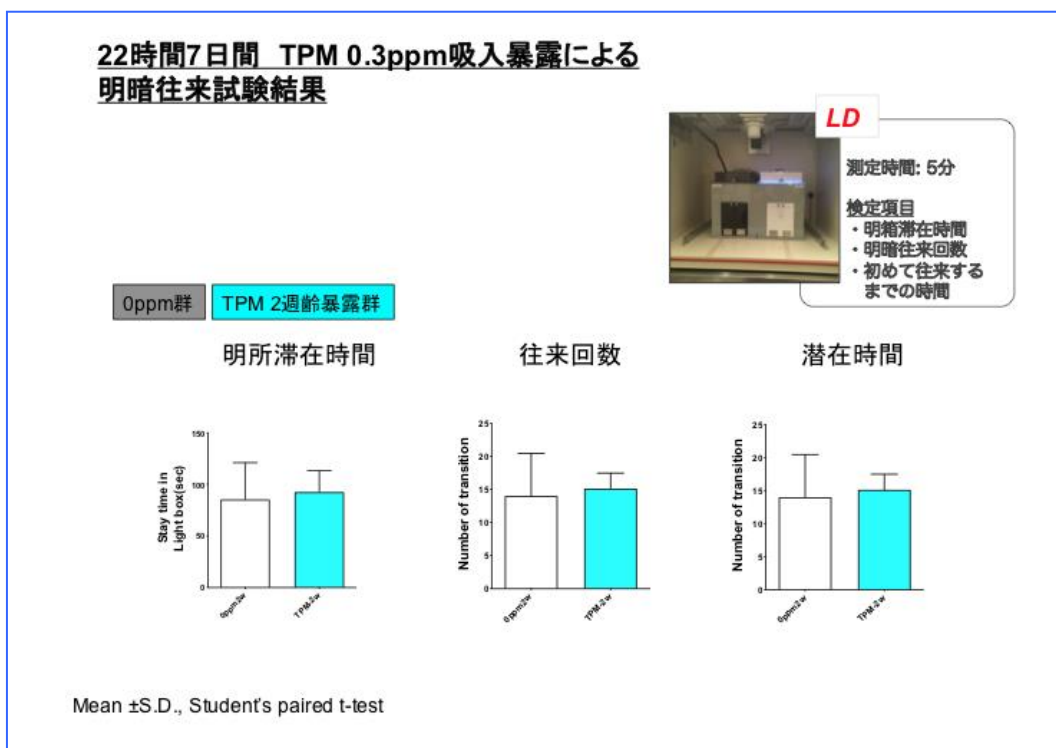


図 1 2

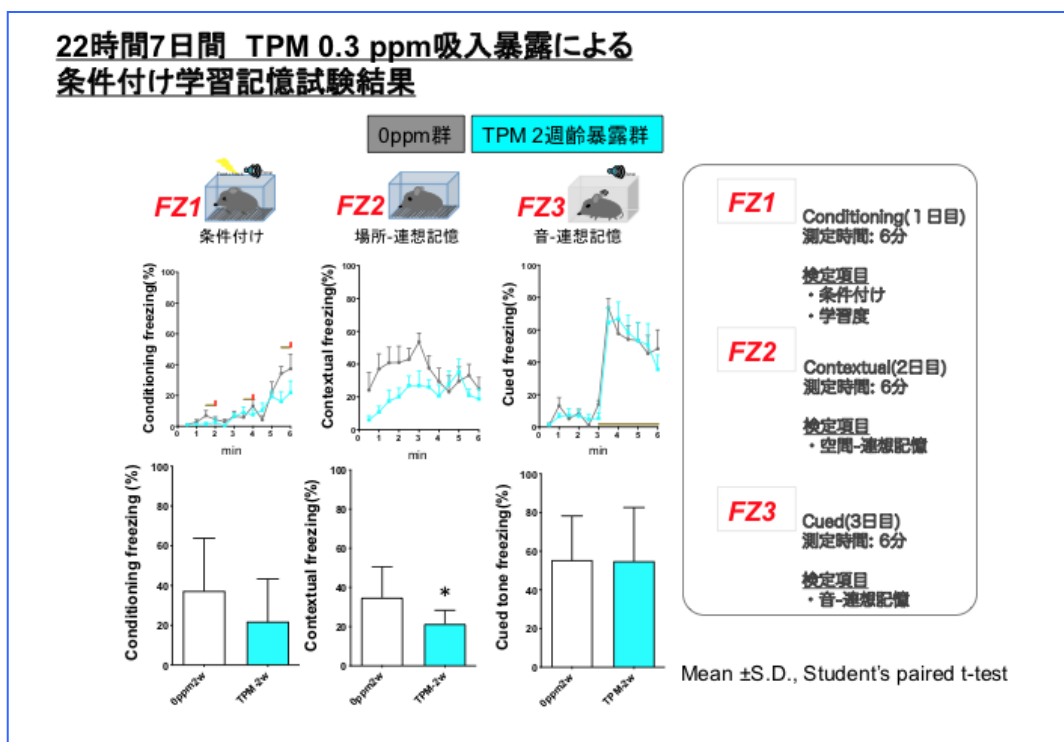


図 1 3

幼若期マウス

TPM 0.3 ppm 22時間7日間吸入暴露による遅発性の情動認知行動影響のまとめ

