

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）

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-

平成 29 年度～31 年度 総合研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・部長

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)、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。

計画通りに、平成 29 年度は 2E1H、平成 30 年度は TPM、平成 31 年度（今年度）は TPD について、SH レベル（2E1H：0、0.02、0.07、0.2 ppm；TPM：0、0.03、0.1、0.3 ppm；TPD：0、8.5、27、85 ppb）での 22 時間/日×7 日間反復吸入ばく露を実施し、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暴露した SH 化学物質と、2E1H と TPM は同程度に、TPD は弱く観測され、これらの 3 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 2E1H と TPM は回復していたが TPD の場合は回復が遅れた。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、平成 29 年度は 2E1H、平成 30 年度は TPM、平成 31 年度は 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、化学構造の異なる 2E1H と TPM 共に、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。他方 TPD の場合は、情動認知行動異常は認められなかった。これによりマウス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、平成 31 年度は指針値(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。

本研究成果は、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（2E1H、TPM 及び 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示唆するものと考えられる。本法は、短期小規模試験に遺伝子発現解析を組み合わせて、既に構築したデータベースとの照合により格段に高いスループット性を発揮するものであり、シックハウス対策に寄与することが期待される。

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
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

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）、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。

[必要性]従来の吸入毒性試験の有害性判

定の根拠は病理組織学的所見に求められるが、SHレベルのばく露の際には、ほとんど組織学的変化が観測されないため、有害性の検証に対応していなかった。

[特色・独創的な点]本研究が用いるPercellome法は、細胞一個当たりの遺伝子発現量の絶対値を比較するもので、脳・肺・肝のデータを直接比較する事が可能であるという特徴を有する。「不定愁訴」を含む多臓器への影響を、その発現機構から包括的、定量的に捕捉する点が独創的である。

[期待される効果]本研究により、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物質が、SHの誘因となるか否かの質的情報について明らかになる事が期待され、また濃度指針値の適切な設定に利用可能な量的情報を提供する事が出来るものとする。この際、Percellomeデータベースに登録された約150の化学物質との照合を行い、分子機構解析により、ハザード同定・予測の範囲と精度を確保する。

本評価法は、短期、小規模動物試験に遺伝子発現解析を組み合わせ、既に構築したデータベースとの照合により格段に高いスループット性を発揮するものであり、シックハウス対策に寄与することが期待される。

B. 研究方法

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の実施と神経科学的所見による中枢影響の確認を行う。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、本研究でも遅発影響の検討を行う。これと並行し、同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得、解析し、これらの毒性連関性を確認する。Percellomeデータベースに登録された約150の化学物質との照合を行い、ハザード同定・予測の範囲と精度を確保する。そこで研究班を次の3つの分担課題によって構成し研究を開

始した。すなわち、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と研究の総括（北嶋）、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（種村）、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（菅野）。

計画通りに、平成 29 年度は 2E1H、平成 30 年度は TPM、平成 31 年度は TPD について、成熟期マウスに S H 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、遺伝子発現変動解析 (Percellome 法) および情動認知行動解析について検討した。以下に実験方法の概要を示す。

トキシコゲノミクスのための吸入ばく露実験：

雄性マウス（成熟期[12 週齢]）を対象とし、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）を実施する。採取臓器は、肺・肝・脳 4 部位（海馬、皮質、脳幹、小脳）とする。解析結果に応じて、2 時間単回ばく露実験（2、4、8、24 時間後に観測）を実施する。

2-エチル-1-ヘキサノール (2E1H) (2-Ethyl-1-hexanol; 分子量: 130.23、CAS No. 104-76-7、密度 (20°C) 0.83 g/ml) は、特級グレードを使用した（ロット番号: TWR5537、カタログ番号: 052-03826、純度 99.8% [キャピラリーカラム GC]、富士フィルム和光純薬工業）。

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°C) 0.95 g/ml) は特級グレードを使用した（ロット番号: S09A045、カタログ番号: 581-60401、純度 99.0%、富士フィルム和光純薬工業 [製造元: Alfa Aesar 社]）。

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) は東京化成 1 級 (EP) グレードを使用した（ロット番号: 4G6PD、カタログ番号: T0997、純度 99.0%、東京化成工業株式会社）。

上記 3 物質共に、ガスの発生方法は予備実験の検討結果を基に、バブリングし気化させる方法により行い、吸入チャンバー内の被験物質の濃度検知は、捕集管を用いる方法（固相吸着-溶媒抽出法 [二硫化炭素 (富士フィルム和光純薬工業株式会社製、作業環境測定用) 使用]）により、ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies 社製 5890A あるいは 7890A) を用いて測定した。

海馬、肺、肝の遺伝子発現データの取得と連関解析：

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。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 を使用する。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既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、多臓器連関及びインフォマティクス解析の開発を進める。

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：

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

C-1: S Hレベルの極低濃度吸入ばく露実験の実施 (北嶋):

「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。

計画通りに、平成 29 年度は 2E1H、平成 30 年度は TPM、平成 31 年度(今年度)は TPD について、目標通りに S H レベルでの極低濃度下(2E1H: 0、0.02、0.07、0.2 ppm; TPM: 0、0.03、0.1、0.3 ppm; TPD: 0、8.5、27、85 ppb)でのトキシコゲノミクスの為の 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。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、2E1H の場合、目標暴露濃度 0.02、0.07 及び 0.20 ppm に対し、測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、それぞれ 0.0203±0.0030 ppm (0.0167～0.0235 ppm)、0.0696±0.0090 ppm (0.0556～0.0793 ppm) 及び 0.196±0.030 ppm (0.151～0.218 ppm)であった。いずれの場合も、目標濃度に対しそれぞれ 101.5、99.4 及び 98.0%と、98～102%の濃度でばく露できた。TPM の場合、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 (0.0280～0.0311 ppm)、0.0930±0.0113 ppm (0.0690～0.0999 ppm) 及び 0.295±0.016 ppm (0.263～0.307 ppm)であった。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。一方 TPD の場合、目標暴露濃度 0、8.5、27 及び 85 ppb に対し、測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、それぞれ 8.5±0.7 ppb (7.5 ppb～9.8 ppb)、2.67±0.08 ppb (2.55 ppb～2.76 ppb) 及び 81.7±1.7 ppm (78.8 ppm～83.4 ppm)であった。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。

加えて、成熟期マウスにおける情動認知行動解析の為の 22 時間/日×7 日間反復吸入ばく露実験(2 用量、6 群構成、各群 8 匹)を平成 29 年度は 2E1H、平成 30 年度は TPM、平成 31 年度は TPD (それぞれ指針値の 10 倍程度の濃度)について実施した結果、2E1H TPM 及び TPD それぞれの目標濃度 0.2 ppm、0.3 ppm 及び 85 ppb に対してそれぞれ、0.30±0.03 ppm、0.35±0.09 ppm 及び 83.9±5.3 ppb (各 150、117 及び 99%)となった。平成 31 年度は指針値の 10 倍濃度 TPM の幼若期ばく露も実施し、目標濃度 0.3 ppm に対して、0.32±0.07 ppm (107%)と概ね目標濃度で吸入ばく露できた。

C-2: 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 (菅野):

計画通りに、平成 29 年度は 2E1H、平成 30 年度は TPM、平成 31 年度(今年度)は TPD を対象とした S H レベルでの極低濃度下(2E1H: 0、0.02、0.07、0.2 ppm; TPM: 0、0.03、0.1、0.3 ppm; TPD: 0、8.5、27、85 ppb)、雄性成熟期マウスに 22 時間/日×7 日間反復吸入ばく露(4 用量、各群 3 匹、[ばく露 22、70、166、199 時間後に観測(ばく露 190 時間後はばく露休止 24 時間後にあたる)])させ、得られた脳、肺、肝サンプルについて、我々が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現につき解析した。

海馬での解析の結果、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暴露した S H 化学物質と、2E1H と TPM は同程度に、TPD は弱く観測され、これらの 3 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 2E1H と TPM は回復していたが TPD の場合は回復が遅れた。具体的には、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4 遺伝子であった。2E1H の場合、Nr4a1、Junb、Egr4 遺伝子については有意ではなく、発現減少傾向が認められたが、TPM の場合は、

上記の IEG は全て有意に、発現減少が認められた。TPD の場合は、有意ではあるが発現抑制の程度が弱く、またばく露 166 時間後に、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、3 物質共に、ばく露 24 時間後に、上記のいずれの IEG 遺伝子においても認められなかった。

平成 29 年度実施の 2E1H 及び平成 30 年度実施 TPM の吸入ばく露に際し（平成 31 年度実施の TPM の場合の肺は未解析）、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する。

C-3 : 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（種村）:

計画通りに、平成 29 年度は 2E1H、平成 30 年度は TPM、平成 31 年度は TPD を対象とし、指針値(案)の 10 倍濃度の、22 時間/日×7 日間反復吸入ばく露を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。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では 3 物質共に対照群と比較し有意な変化は認められなかったが、明暗往来試験では、2E1H の場合は初往来時間の有意な抑制が認められたが、TPM 及び TPD の場合は有意な変化は認められなかった。また、条件付け学習記憶試験においては、2E1H と TPM 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、ばく露 3 日後(遅発性影響の検討)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。他方 TPD の場合は、情動認知行動異常は認められなかった。

加えて平成 31 年度は TPM を対象とし(指針値(案)の 10 倍濃度)、幼若期(2 週齢)マウスに 22 時間/日×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。

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 に対し、本評価系を適用し、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という目的に向け、計画通りに、平成 29 年度は 2E1H (指針値(案): 0.02 ppm)、平成 30 年度は TPM (指針値(案): 0.03 ppm)、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 (SH レベル (2E1H : 0、0.02、0.07、0.2 ppm; TPM : 0、0.03、0.1、0.3 ppm; TPD : 0、8.5、27、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

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暴露したSH化学物質と、2E1HとTPMは同程度に、TPDは弱く観測され、これらの3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2E1HとTPMは回復していたがTPDの場合は回復が遅れた。

このIEGの抑制機序として、先行研究では、6時間/日×7日間反復暴露時の肝・肺の連関解析において、化学構造の異なる3物質(ホルムアルデヒド、キシレン、パラジクロロベンゼン)に共通して発現増加が認められ、またin silicoでのプロモーター解析(Upstream analysis、Ingenuity Pathways Analysis)にてIEGの転写を調節し得るI11b遺伝子を候補分子として報告し、肺或いは肝からの二次的シグナルとしてIL-1 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。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、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I11bが血液脳関門を通過できなければ、海馬に影響を与える事が出来ない事となるが、この点、血液脳関門を通過するという報告(Banks WAら、J Pharmacol Exp Ther 259(3): 988-996, 1991)(トランスポーターは未同定)を見いだし、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レベルの反復吸入暴露時の、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、暴露群共に全てのサンプルについて検出限界以下の濃度(1.03 pg/mL)であったため、今後、IL-1 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。

他方、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倍濃度の平成29年度は2E1H、平成30年度はTPM、平成31年度は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、化学構造の異なる2E1HとTPM共に、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。他方TPDの場合は、情動認知行動異常は認められなかった。認められなかった理由として、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。程度は弱いとはいえ、IEGの発現抑制は認められているため、より高濃度(指針値(案)の10倍以上)の吸入ばく露により、情動認知行動異常が誘発される可能性は否定できないものとする。以上の結果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、平成31年度は指針値(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。

E. 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、2E1H、TPM及びTPDの3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伝達抑制が示唆された。ただしTPDの場合はこの抑制程度が弱かった。さらに、この遺伝子発現解析から予見された情動認知行動の異常を確認すべく、2E1H、TPM及びTPDの3物質を対象に、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、2E1H及びTPMの場合は、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が、他方 TPD の場合は、情動認知行動異常は認められなかった。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、平成 31 年度は指針値(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。本研究結果により、2E1H、TPM 及び TPD 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示唆するものと考えられる。

加えて、2E1H 及び TPM 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する。

本評価法は、短期小規模動物試験に遺伝子発現解析を組み合わせ、既に構築したデータベースとの照合により格段に高いスループット性を発揮するものであり、急増する「新規物質」のシックハウス(室内空気汚染)対策に寄与することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表 (直近より、抜粋)

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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, et al., Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017.

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. *J Toxicol Sci* 42(2): 121-128, 2017.

Saito H, Hara K, Tanemura K., Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice. *Reprod Toxicol* 74: 108-115, 2017.

Ohtani N, Iwano H, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Inoue H, Yokota H., Adverse effects of maternal exposure to bisphenol F on the anxiety- and depression-like behavior of offspring. *J Vet Med Sci* 79(2): 432-439, 2017.

2. 学会発表 (直近より、抜粋)

○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.)

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 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

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 「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

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 (ICT XV) (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

○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

○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, 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

酒井和哉、大塚（出田）まき、斉藤洋克、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開発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111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、斉藤洋克、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

○ 斉藤洋克、原健士郎、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

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017.5.17.), Daejeon, Korea

北嶋 聡、シックハウス症候群レベルの極低濃度ばく露の際の海馬における Percellome 法による 吸入トキシコゲノミクスと遅発性の情動認知行動影響解析、第44回日本毒性学会学術年会(2017.7.12.)

相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、菅野 純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析、第44回日本毒性学会学術年会(2017.7.11.)

菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第20回研究発表会、(2017.12.12) 神戸、特別講演

Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop, (2017.12.4) NC USA, Plenary

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for

the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia(2017.9.13) 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