

別添 1

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する  
短期小規模吸入曝露評価系の開発  
(20KD1001)

令和2年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 北嶋 聡

令和3(2021)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する  
短期小規模吸入曝露評価系の開発

北嶋 聡 ----- 1

II. 分担研究報告書 (別添 4)

1. 吸入曝露実験の実施

北嶋 聡 ----- 9

2. 吸入曝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 純 ----- 19

3. 吸入曝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 健太郎 ----- 26

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5)

----- 32

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
令和2年度総括研究報告書

ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する  
短期小規模吸入曝露評価系の開発（20KD1001）

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

スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物：VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該VOCの吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤なVOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成17年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等のSH関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SHに関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。

そこで独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るかを検討する。

令和2年度（初年度）は予定通り、ホルムアルデヒドについて、トキシゲノミクスの為の22時間/日×7日間反復吸入曝露試験（4用量、16群構成、各群3匹）を実施し、吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標曝露濃度1、3及び10ppmに対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ $0.99 \pm 0.07$ （0.90～1.09ppm）、 $3.11 \pm 0.19$ （2.72～3.32ppm）、 $9.84 \pm 1.17$ （7.99～11.52ppm）と、いずれの場合も、目標濃度に対しそれぞれ99.0、103.7及び98.4%と、98～104%の濃度で実施できた。

上記、吸入曝露に向けた予備検討に手間取り、実施まで時間を要したが、経時的に採取した肺及び海馬サンプルについて、網羅的に遺伝子発現変動を解析した結果、肺ではサイトカインシグナルを介する炎症を示唆する所見が得られ、他方、海馬では神経活動の活性化及び長期記憶に関与するCREB及びCREMシグナル関連遺伝子あるいは神経活動の指標となるImmediate early gene（IEG）の発現の増加が観測され、海馬神経活動の活性化を示唆する所見が得られた。この増加は、曝露終了24時間後にも弱いながらも認められた。肝については解析中で、令和3年度上半期中に、他臓器関連解析とあわせ実施する。情動認知行動解析についても、吸入曝露に向けた予備検討に手間取り時間を要したが、ホルムアルデヒド（0、3ppm）について、22時間/日×7日間反復吸入曝露試験（2用量、6群構成、各群8匹）を実施し、吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標曝露濃度3ppmに対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、 $3.00 \pm 0.21$ （2.69～3.28ppm）と、目標濃度に対し100.0%の濃度で実施できた。情動認知行動解析の結果、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が、曝露終了日の時点では認められなかったが、曝露3日後では認められ、これらの低下は遅発性の影響であることが示唆された。

今後、多臓器連関を含む本解析結果と、先行研究であるSH対策に向けたハザード評価研究における、指針値レベルの極低濃度下での吸入曝露の際の解析結果との比較し、当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系としての妥当性につき検討する。

本手法は、吸入曝露による短期小規模動物試験に遺伝子発現解析と情動認知行動解析とを組み合わせ、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、本評価系の開発を通し、長期毒性試験情報のないガス状「優先評価化学物質」の長期毒性評価の迅速化・高度化への活用寄予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 国立医薬品食品衛生研究所  
客員研究員

#### A. 研究目的

(背景) スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物:VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該 VOC の吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤な VOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成 17 年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等の SH 関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7 日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome 法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SH に関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。

(目的) 独自開発の短期間小規模のハザ

ード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るかを検討する。

(必要性) 吸入曝露による長期毒性評価を、革新的に迅速に進める必要がある。

(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。

(期待される効果) 本手法は、吸入曝露による短期小規模動物試験に遺伝子発現解析と情動認知行動解析とを組み合わせ、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、本評価系の開発を通し、長期毒性試験情報のないガス状「優先評価化学物質」の長期毒性評価の迅速化・高度化への活用寄予することが期待される。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。

また成果物については言うまでもなく、国内のみならず国際的なコンセンサスを得られるレベルを以って、テストガイドラインへの提案に繋がるように図る。

#### B. 研究方法

モデル物質としてガス状「優先評価化学物質」を中心に据え、極低濃度下での独自データを取得済みの SH 関連物質や国際的な発がん性分類（IARC 分類）を参照し選択した物質につき 7 日間吸入曝露実験を実施し、同一個体の海馬、肺、肝の網羅的遺伝子発現プロファイルを取得し、多臓器連関の解析及びデータベース化を行う。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。これと並行し、吸入曝露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。曝露濃度は、長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度とし、この濃度選択の際、SHレベルの10倍程度の濃度も考慮する。

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、吸入曝露実験の実施と研究の総括(北嶋)、吸入曝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)、吸入曝露実験の実施と、吸入曝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)。また若手の研究協力者として齊藤洋克 研究員(30歳)(国立医薬品食品衛生研究所 毒性部)が、主として情動認知行動解析に参画した。

令和2年度(初年度)は予定通り、ヒトに対する発がん性が認められる物質として国際的に分類され、かつ、SH関連物質である優先評価化学物質「ホルムアルデヒド」(通し番号25番)について、成熟期マウスに22時間/日×7日間反復吸入曝露実験を実施し、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曝露実験：雄性成熟期マウスを対象とし、先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露実験(4用量、16群構成、各群3匹)(22、70、166、190時間後に観測)(190時間後は、曝露休止24時間後とするプロトコル)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。被験物質をホルムアルデヒド(formaldehyde; 分子量:30.03、CAS No.:50-00-0)とし、試薬としてホルムアルデヒド液(カタログ番号:064-00406、試薬特級、ホルムアルデヒド濃度37.0%及び37.5%(ロットによる)(mass/mass)[メタノール7.7%含有、ギ酸含量0.04%以下]、ロット番号:SKP3949、SKH3051、富士フイルム和光純薬(株))を使用した。

＜曝露濃度設定根拠＞

マウスへの曝露濃度を、以下の計算根拠を基に、公比 $\sqrt{10}$ で0、1、3、10 ppmを目標値とした。すなわち、1)ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質の室内濃度指針値は0.08 ppmであり、これを受け、先行研究ではこの濃度が低濃度となるように、4濃度(1、0.3、0.1、0 ppm)に亘る吸入曝露群を設定し実験を実施しており、上述の通り、SHレベルの10倍程度の濃度を低濃度とすると、4濃度(10、3、1、0 ppm)の設定が考えられた(先行研究におけるデータとのブリッジという意味もある)。2)一方、実験動物を用いた吸入曝露による毒性試験の結果からは(文献調査)、マウスの3日間(6時間/日)吸入曝露(0、15、6、2、0.5 ppm)では、15 ppmの濃度で鼻粘膜における組織病理学的変化が観察されており(Swenbergら、1983、1986)、24ヶ月間(6時間/日、5日間/週)吸入曝露の場合では、5.6 ppm以上で鼻炎、扁平上皮異形成が観察され(Kernsら、1983)、また系統の異なるラットの発がん性試験で、気道に組織傷害を起こす濃度以上(10~15 ppm)で、鼻腔の扁平上皮がんの発生増加が認められている(Woutersenら、1989等)。そのため、実験動物を用いた長期吸入毒性試験の結果からは、病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度という判断基準からは、マウスの3日間(6時間/日)吸入曝露における15 ppm未満ということとなり、この点、上述の高濃度10 ppmはこの条件に適合します。総じて、「長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度とし、この濃度選択の際、SHレベルの10倍程度の濃度も考慮」という観点から、本実験でのホルムアルデヒドの濃度として、4濃度(0、1、3、10 ppm)を設定した。

＜ガスの発生方法と濃度測定方法＞

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ミリQ水で10倍に薄めたホルムアルデヒド水溶液をバブリングし気化させる方法によりおこなった。

当初、ホルムアルデヒド液原液(濃度38.0%)、すなわち飽和ホルムアルデヒド溶

液をバブリングし気化させる方法を選択し、予備検討を実施したところ、発生ガス圧が急速に低下した。この原因として、バブリングによるガス発生により、飽和ホルムアルデヒド溶液が、過飽和となり、結晶物（沈殿物）が析出し、これが発生機のガス発生器具の目詰まりを引き起こしたためと考えられた。そこでこの方策として、シックハウス症候群対策に向けた先行実験の際のように、ミリQ水で10倍に薄めたホルムアルデヒド液を使用することとした。このように、ガス発生の予備検討に時間を要してしまった。

濃度検知は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管（LpDNPH H Series Cartridges H300、カタログ番号：505331、スペルコ社）を用いる方法で測定した。捕集時間は曝露時間（曝露開始から曝露停止まで）に合わせ22時間とした。捕集管の曝露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2本とした。ホルムアルデヒドは、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、ホルムアルデヒド2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集管内に生成される。反応・生成したホルムアルデヒド2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル（アルデヒド分析用、カタログ番号：011-17741、ロット番号：ESL3955、ESG0603、APH6163、富士フイルム和光純薬（株））100 mLによりメスフラスコに抽出し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）（LC-20AD システム 島津製作所）により分析を実施した。HPLCの分析条件に関しては、移動相組成はアセトニトリル：超純水=60：40、流量は1 mL/min、カラムはSUPELCO SIL(TM) LC-18（4.6 mmφ×250 mm、粒径：5 μm Supelco社製）、検出波長はUV 360 nm、試料注入量は1 μLとした。また、検量線はホルムアルデヒドの量を換算したホルムアルデヒド2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンのホルムアルデヒド-2,4-DNPH標準原液（カタログ番号：16120-96 関東化学（株））を用い、2～100 ngの範囲で検量線を作成した。この分析部分は、国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部の酒井信夫室長及び、大嶋直浩

研究員の協力を仰いだ。

海馬、肺、肝の遺伝子発現データの取得と  
連関解析：吸入曝露後、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。

吸入曝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]）を対象とした22時間/日×7日間反復曝露試験（2用量、6群構成、各群8匹）を実施し、曝露終了日（急性影響の検討）及び曝露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：吸入曝露実験の実施（北嶋）：

<トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験>

令和2年度は予定通り、ホルムアルデヒドについて成熟期雄性マウスを対象に、トキシコゲノミクスの為の22時間/日×7日間反復吸入曝露試験（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、目標曝露濃度1、3及び10 ppmに対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ0.99±0.07（0.90

～1.09 ppm)、 $3.11 \pm 0.19$  (2.72～3.32 ppm)、 $9.84 \pm 1.17$  (7.99～11.52 ppm)であった。いずれの場合も、目標濃度に対しそれぞれ99.0、103.7及び98.4%と、98～104%の濃度で曝露できた。

166時間目に10 ppm曝露群で体重減少が有意に認められた(対照群が $27.0 \pm 0.7$  gに対して、 $20.6 \pm 1.8$  g)が、曝露休止24時間目にあたる190時間目には回復傾向となった(対照群が $27.1 \pm 0.6$  gに対して、 $23.6 \pm 1.0$  g)。また解剖時、肺の腫大(+)が10 ppm曝露群の曝露22、70、166、190時間後に認められたが、曝露休止24時間目にあたる190時間目には回復傾向(腫大(±))となった。

#### <情動認知行動解析のための吸入曝露実験>

加えて、吸入曝露に向けた予備検討に手間取り時間を要したが、ホルムアルデヒド(0、3 ppm)について、成熟期雄性マウスにおける情動認知行動解析の為の22時間/日×7日間反復吸入曝露実験(2用量、6群構成、各群8匹)を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標曝露濃度3 ppmに対し、測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 $3.00 \pm 0.21$  ppm (2.69～3.28 ppm)と、目標濃度に対し100.0%の濃度で実施できた。トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験において、10 ppmの22時間/日×7日間反復吸入曝露の際に体重減少が有意に認められ、当情動認知行動解析では体重変化による影響を排除したいため、その下の用量である3 ppmの濃度を採用した。

#### C-2：吸入曝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)：

吸入曝露に向けた予備検討に手間取り、実施まで時間を要したが、令和2年度は予定通り、ホルムアルデヒド(0、1、3、10 ppm)を対象とし、成熟期雄性マウスに22時間/日×7日間反復吸入曝露(4用量、各群3匹、[曝露22、70、166、199時間後に観測(曝露190時間後は曝露休止24時間後にあた

る)])させ、得られた肺、肝、脳サンプルについて、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。

肺での解析の結果、サイトカインシグナルを介する炎症を示唆する所見が得られた。曝露終了24時間後には、この影響を示唆する関連遺伝子の発現増加は認められなかった。

海馬での解析の結果、神経活動の活性化と長期記憶に関与するCREB及びCREMシグナル関連遺伝子あるいは神経活動の指標となるImmediate early gene (IEG)の発現の増加等が観測され、海馬神経活動の活性化を示唆する所見が得られた。この増加は、曝露終了24時間後にも弱いながらも認められた。

肝については解析中で、令和3年度上半期中に、他臓器連関解析とあわせ実施する。

#### C-3：吸入曝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)：

吸入曝露に向けた予備検討に手間取り、実施まで時間を要したが、令和2年度はホルムアルデヒド(0、3 ppm)について成熟期雄性マウスを対象に、22時間/日×7日間反復吸入曝露を実施し(2用量、6群構成、各群8匹)、情動認知行動を3種類の試験により解析した。解析時点として、曝露終了日と曝露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。曝露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ールでの測定時点である為であり、これらのデータとの比較解析が可能となるためである。

情動認知行動解析の結果、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が、曝露終了日の時点(急性影響の検討)は認められなかったが、曝露3日後では認められ、これらの低



下は遅発性の影響であることが示唆された。

#### D. 考察と結論

以上の通り、独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るかを検討するという目的に向け、令和2年度（初年度）は予定通り、ホルムアルデヒド（トキシコゲノミクス：0、1、3、10 ppm、情動認知行動解析：0、3 ppm）について、22 時間/日×7 日間反復吸入曝露試験を実施した。いずれも目標濃度通りに吸入曝露できた。

遺伝子発現変動解析の結果、成熟期マウス肺において、サイトカインシグナルを介する炎症を示唆する所見が得られた。この中には、サイトカインの一種である IL1 $\beta$  の発現増加が含まれていた。先行研究において、極低濃度のホルムアルデヒド(0.1、0.3、1.0 ppm)の6 時間/日×7 日間反復吸入曝露の際の肝・肺の連関解析においても、IL1 $\beta$  の発現増加が認められており、この事は、本実験の結果、肺において炎症を示唆する所見が得られたことを支持する。

海馬での解析の結果、神経活動の活性化と長期記憶に関与する CREB 及び CREM シグナル関連遺伝子あるいは神経活動の指標となる IEG の発現の増加が観測され、海馬神経活動の活性化を示唆する所見が得られた。この増加は、曝露終了24 時間後にも弱いながらも認められた。この点、先行研究では SH レベルの極低濃度のホルムアルデヒドの吸入曝露により、肺あるいは肝からの IL-1 $\beta$  が海馬における 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挙げている。すなわち、肺或いは肝からの二次的シグナルとして IL-1 $\beta$  が海馬に働き IEG の発現を抑制するという可能性を示唆した。この事は、上述の海馬神経活動の活性化とは一見、矛盾する。この点に関しては、併行して、神経活動の活性化を示唆する CREB シグナル関連遺伝子の発現増加が認められることから、今回のよう

な比較的高濃度のホルムアルデヒドの吸入曝露の場合、なんらかのシグナルが、IL-1 $\beta$  による IEG の発現抑制影響を超えて、IL-1 $\beta$  の発現増加を誘発している可能性が示唆され、この事は、後述する情動認知行動解析の結果、すなわち曝露終了日の時点では影響が認められない、という解析結果と矛盾しないものと考えられる。

肝については解析中で、令和3 年度上半期中に、他臓器連関解析とあわせ実施する。他方、この海馬に対する影響を実証するため、ホルムアルデヒド (0、3 ppm) について、22 時間/日×7 日間反復吸入曝露試験を成熟期マウスに実施し、情動認知行動解析の結果、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が、曝露終了日の時点（急性影響の検討）では認められなかったが、曝露3 日後では認められた。したがって、これらの低下は遅発性の影響であることが示唆された。

この点、先行研究の SH レベル(1 ppm)の極低濃度のホルムアルデヒドの吸入曝露の場合、曝露3 日後時点では同様に、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められているが、曝露終了日の時点でもこれらの低下が認められており、本実験結果と一見、矛盾する。他方、海馬における遺伝子発現変動解析の結果からは、本実験のような比較的高濃度のホルムアルデヒドの場合は、曝露終了24 時間後の時点でも、こうした記憶の低下は示唆されなかった。以上のことを考慮すると、曝露終了後、ホルムアルデヒドの濃度が低下するに従って、少なくとも曝露終了24 時間後から終了3 日後までの間に、先行研究と同様の極低濃度の曝露濃度となり、その結果、上述した記憶異常が生じた可能性が考えられた。また、このことを通して、曝露終了時ではなく3 日後の時点という、遅発性の影響が生じた可能性が考えられた。

今後、多臓器連関を含む本解析結果と、先行研究である SH 対策に向けたハザード評価研究における、指針値レベルの極低濃度下での吸入曝露の際の解析結果との比較をより詳細に検討し、当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系としての妥当性につき検討する。

令和3 年度（来年度）は計画に則り、キシレンあるいはトルエンにつき、同様な実

験を実施、検討する予定である。

本手法は、吸入曝露による短期小規模動物試験に遺伝子発現解析と情動認知行動解析とを組み合わせ、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、本評価系の開発を通し、長期毒性試験情報のないガス状「優先評価化学物質」の長期毒性評価の迅速化・高度化への活用に寄与することが期待される。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表 (抜粋)

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi: Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CC14. *Toxicol Rep.* 2020; 7: 685-692. [doi 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

Richard Nock, Natalia Polouliakh, Frank Nielsen, Keigo Oka, Carlin R Connell, Cedric Heimhofer, Kazuhiro Shibana, Samik Ghosh, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Taketo Akama, Hiroaki Kitano: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. *PLoS One* 2020; 15(7): e0233755. [doi 10.1371/journal.pone.0233755]

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura: Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reproductive Toxicology* 2020; 98: 225-232. [doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003]

### 2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドキシンの中枢影響評価、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドーモイ酸投与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2～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第47回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非意図的変異、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロゲン受容体 $\alpha$ 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第113回日本繁殖生物学会大会(2020.9.25.)、オンライン

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻樹子、北嶋聡、CRISPR/Cas9のゲノム編集によるノックインマウス作製時に認められたオンターゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24.)、オンライン

齊藤洋克、原健士朗、北嶋聡、種村健太郎、「ビタミンE欠乏給餌によるマウス雄性生殖器および精子への影響と加齢による退化変化との類似性」日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24-12.8.)、オンライン

北嶋聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第18回食品安全フォーラム(2020.11.27.)

北嶋聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究—極低濃度吸入曝露の際のマウス海馬Percellomeトキシコゲノミクスによる中枢影響予測—、令和2年度化学物質の安全管理に関するシンポジウム(2021.2.4.) オンライン

種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期曝露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会

議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) オンライン

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y: Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing, Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome (2020.2.10) on-line

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update, 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2020.3.15) on-line

Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y: Evaluation of extracellular vesicles (EVs) as toxic biomarkers in mouse, 59th Annual Meeting of Society of Toxicology (2020.3.15) on-line

F. 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

別添 4

## Ⅱ. 分担研究報告書

ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する  
短期小規模吸入曝露評価系の開発

分担研究報告書

分担研究課題：「吸入曝露実験の実施」

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	齊藤洋克	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
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	酒井信夫	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
	大嶋直浩	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部

研究要旨

スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物:VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該 VOC の吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤な VOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成17年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等のSH関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SHに関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。

そこで独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るかを検討する。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施する。

令和2年度（初年度）は予定通り、ホルムアルデヒドについて、トキシコゲノミクスの為の22時間/日×7日間反復吸入曝露試験（4用量、16群構成、各群3匹）を、目標曝露濃度（1、3及び10 ppm）下で実施し、また、情動認知行動解析のための吸入曝露実験に向け、ホルムアルデヒド（0、3 ppm）について、22時間/日×7日間反復吸入曝露試験（2用量、6群構成、各群8匹）を実施した。その結果、トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験において、目標曝露濃度（1、3及び10 ppm）に対して、それぞれ0.99、3.11及び9.84 ppmと、それぞれほぼ目標曝露濃度（それぞれ99.0、103.7及び98.4%と、98～104%の濃度）にて、マウスに安定して吸入曝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曝露実験においては、目標曝露濃度（3 ppm）に対して3.00 ppmと、目標濃度に対し100.0%の濃度で実施できた。

## A. 研究目的

スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物：VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該VOCの吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤なVOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成17年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等のSH関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SHに関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。

そこで独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るか

を検討する。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした吸入曝露実験を、先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露のプロトコールにより実施する。

令和2年度（初年度）は予定通り、ホルムアルデヒドについて、トキシコゲノミクス（Percellome法）のための吸入曝露実験に向け、雄性マウス（成熟期）を対象とし先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露実験（4用量、16群構成、各群3匹）（2、4、8、24時間後に観測）にて、目標曝露濃度（1、3及び10 ppm）下で実施し、またホルムアルデヒド（0、3 ppm）について、情動認知行動解析のための吸入曝露実験に向け、雄性マウス（成熟期）を対象とし先行研究での曝露条件である22時間/日×7日間反復曝露試験（2用量、6群構成、各群8匹）にて実施した。

曝露濃度は、長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度とし、この濃度選択の際、SHレベルの10倍程度の濃度も考慮する。

### <曝露濃度設定根拠>

マウスへの曝露濃度を、以下の計算根拠を基に、公比 $\sqrt{10}$ で0、1、3、10 ppmを目標値とした。すなわち、1)ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質の室内濃度指針値は0.08 ppmであり、これを受け、先行研究ではこの濃度が低濃度となるように、4濃度（1、0.3、0.1、0 ppm）に亘る吸入曝露群を設定し実験を実施しており、上述の通り、SHレベルの10倍程度の濃度を低濃度とすると、4濃度（10、3、1、0 ppm）の設定が考えられた（先行研究におけるデータとのブリッジングという意味もある）。2)一方、実験動物を用いた吸入曝露による毒性試験の結果からは（文献調査）、マウスの3日間（6時間/日）吸入曝露（0、15、6、2、0.5 ppm）では、15 ppmの濃度で鼻粘膜における組織病理学的変化が観察されており（Svenbergら、1983,1986）、24ヶ月間（6時間/日、5日間/週）吸入曝露の場合では、5.6 ppm以上で鼻炎、扁平上皮異形成が観察され（Kernsら、1983）、また系

統の異なるラットの発がん性試験で、気道に組織傷害を起こす濃度以上（10～15 ppm）で、鼻腔の扁平上皮がんの発生増加が認められている（Woutersenら、1989等）。そのため、実験動物を用いた長期吸入毒性試験の結果からは、病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度という判断基準からは、マウスの3日間（6時間/日）吸入曝露における15 ppm未満ということとなり、この点、上述の高濃度10 ppmはこの条件に適合する。総じて、「長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度とし、この濃度選択の際、SHレベルの10倍程度の濃度も考慮」という観点から、本実験でのホルムアルデヒドの濃度として、4濃度（0, 1, 3, 10 ppm）を設定した。

## B. 研究方法

### B-1：被験物質

ホルムアルデヒド（formaldehyde；分子量：30.03、CAS No.：50-00-0）は以下の試薬を使用した。

ホルムアルデヒド液

カタログ番号：064-00406

試薬特級

ホルムアルデヒド濃度：37.0%及び37.5%（ロットによる）（mass/mass）[メタノール7.7%含有、ギ酸含量0.04%以下]

ロット番号：SKP3949, SKH3051

製造元：富士フイルム和光純薬（株）

### B-2：ガスの発生方法と吸入チャンバー内の濃度測定方法

吸入装置のシステムを図1に示した。3Lの発生容器内のホルムアルデヒドを循環式恒温槽で一定温度（35℃）にしながらか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）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、設定濃度としたホルムアルデヒドを吸入チャンバーに送り込んだ（図1）。

ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、ミリQ水で10倍に薄めたホルムアルデヒド水溶液をバブリングし気化させる方法により実施した。

当初、ホルムアルデヒド液原液（濃度38.0%）、すなわち飽和ホルムアルデヒド溶液をバブリングし気化させる方法を選択し、予備検討を実施したところ、発生ガス圧が急速に低下した。この原因として、バブリングによるガス発生により、飽和ホルムアルデヒド溶液が、過飽和となり、結晶物（沈殿物）が析出し、これが発生機のガス発生器具の目詰まりを引き起こしたためと考えられた。そこでこの方策として、シックハウス症候群対策に向けた先行実験の際のように、ミリQ水で10倍に薄めたホルムアルデヒド液を使用することとした。このように、ガス発生の予備検討に時間を要してしまった。

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）を設置し強力で空気を攪拌した状態で動物への曝露を行うこととした（Photo 3）。

濃度検知は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンがあらかじめ添加された捕集管（LpDNPH H Series Cartridges H300、カタログ番号：505331、スペルコ社）を用いる方法で測定した。サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP-Σ300（0, 1 ppm）、MP-Σ30（3, 10 ppm）、柴田科学株式会社、Photo 4）を用い、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管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100（3, 10 ppm）、500mL/分（0, 1 ppm）とした。捕集時間は曝露時間（曝露開始から曝露停止まで）に合わせ22時間とした。捕集管の曝露1回当たりの使用本数は、各濃度とも2本とした。ホルムアルデヒドは、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、ホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとして捕集管内に生成される。反応・生成したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンは、アセトニトリル（アルデヒド分析用、カタログ番号：011-17741、ロット番号：ESL3955, ESG0603, APH6163、富士

フィルム和光純薬(株)100 mLによりメスフラスコに抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)(LC-20ADシステム 島津製作所)により分析を実施した。なお、HPLCの分析条件に関して、移動相組成はアセトニトリル：超純水=60：40、流量は1 mL/min、カラムはSUPELCO SIL(TM) LC-18 (4.6 mm φ × 250 mm、粒径：5 μm Supelco社製)、検出波長はUV 360 nm、試料注入量は1 μLとした。また、検量線はホルムアルデヒドの量を換算したホルムアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンのホルムアルデヒド-2,4-DNPH標準原液(カタログ番号：16120-96 関東化学(株))を用い、2~100 ngの範囲で検量線を作成した。

#### (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。

#### 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日間反復吸入曝露実験の場合：

令和2年度は予定通り、ホルムアルデヒドについて、トキシコゲノミクスのための22時間/日×7日間反復吸入曝露試験(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、目標曝露濃度1、3及び10 ppmに対し、測定値の平均±標準偏差(最低~最高値)は、それぞれ0.99±0.07 (0.90~1.09 ppm)、3.11±0.19 (2.72~3.32 ppm)、9.84±1.17 (7.99~11.52 ppm)であった。いずれの場合も、目標濃度に対しそれぞれ99.0、103.7及び98.4%と、98~104%の濃度で曝露できた(図2)。

166時間目に10 ppm曝露群で体重減少が有意に認められた(対照群が27.0±0.7 gに対して、20.6±1.8 g)が、曝露休止24時間目にあたる190時間目には回復傾向となった(対照群が27.1±0.6 gに対して、23.6±1.0 g)。また解剖時、肺の腫大(+)が10 ppm曝露群の曝露22、70、166、190時間後に認められたが、曝露休止24時間目にあたる190時間目には回復傾向(腫大(±))となった。

C-2: 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露実験の場合：

吸入曝露に向けた予備検討に手間取り時間を要したが、ホルムアルデヒド(0、3 ppm)について、成熟期マウスにおける情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復吸入曝露実験(2用量、6群構成、各群8匹)を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標曝露濃度3 ppmに対し、測定値の平均±標準偏差(最低~最高値)は、3.00±0.21 (2.69~3.28 ppm)と、目標濃度に対し100.0%の濃度で実施できた(図2)。トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験において、10 ppmの22時間/日×7日間反復吸入曝露の際に体重減少が有意に認められ、当情動認知行動解析では体重変化による影響を排除したいため、その下の用量である3 ppmの濃度を採用した。

#### D. 結論

令和2年度(今年度)は、ホルムアルデヒドについて、トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験に向け、目標曝露濃度(0、1、3及び10 ppm)下、22時間/日×7日間反復曝露を、また情動認知行動解析のための吸入曝露実験に向け、目標曝露濃度(0、3 ppm)下、22時間/日×7日間反復曝露を実施した。その結果、トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験において、目標曝露濃度(1、3及び10 ppm)に対して、それぞれ0.99、3.11及び9.84 ppmと、それぞれほぼ目標曝露濃度(それぞれ99.0、103.7及び98.4%と、98~104%の濃度)にて、マウスに安定して吸入曝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曝露実験においては、目標曝露濃度(3 ppm)に対して3.00 ppmと、目標濃度に対し100.0%の濃度で実施できた。

当初、ホルムアルデヒド液原液(濃度38.0%)、すなわち飽和ホルムアルデヒド溶液をバブリングし気化させる方法を選択し予備検討を実施したところ、過飽和となり結晶物(沈殿物)が析出し、これが発生機のガス発生器具の目詰まりを起こしてしまい、この方策立てを含め、ガス発生



予備検討に時間を要してしまった。

令和3年度(来年度)は計画に則り、キシレンあるいはトルエンにつき、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(抜粋)

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi: Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4. *Toxicol Rep.* 2020; 7: 685-692. [doi 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

Richard Nock, Natalia Polouliakh, Frank Nielsen, Keigo Oka, Carlin R Connell, Cedric Heimhofer, Kazuhiro Shibana, Samik Ghosh, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Taketo Akama, Hiroaki Kitano: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. *PLoS One* 2020; 15(7): e0233755. [doi 10.1371/journal.pone.0233755]

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura: Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reproductive Toxicology* 2020; 98: 225-232. [doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

登田美桜、北嶋 聡、シリーズ: 日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシン; フグ毒のリスク評価について、*中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.)* 2021; 34: 58-62. [ISSN: 0914-3777]

### 2. 学会発表(抜粋)

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマ

ウス中枢神経系への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドローモイ酸投与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2~、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性曝露による成熟後の雄マウス行動影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期曝露による情動認知行動毒性~情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応~、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第47回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非意図的変異、第47回日本

毒性学会学術年会(2020. 6. 29.) オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロジェン受容体 $\alpha$ 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第 113 回日本繁殖生物学会大会(2020. 9. 25.)、オンライン

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻樹子、北嶋聡、CRISPR/Cas9 のゲノム編集によるノックインマウス作製時に認められたオンターゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (2020. 11. 24.)、オンライン

北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第 18 回食品安全フォーラム(2020. 11. 27.)

北嶋 聡、シックハウス (室内空気汚染) 対策に関する研究—極低濃度吸入曝露の際のマウス海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測—、令和 2 年度化学物質の安全管理に関するシンポジウム(2021. 2. 4.) オンライン

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y: Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing、Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome (2020. 2. 10) on-line

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update、59th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2020. 3. 15) on-line

Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y: Evaluation of extracellular vesicles (EVs) as toxic biomarkers in mouse、59th Annual Meeting of Society of Toxicology (2020. 3. 15) on-line

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

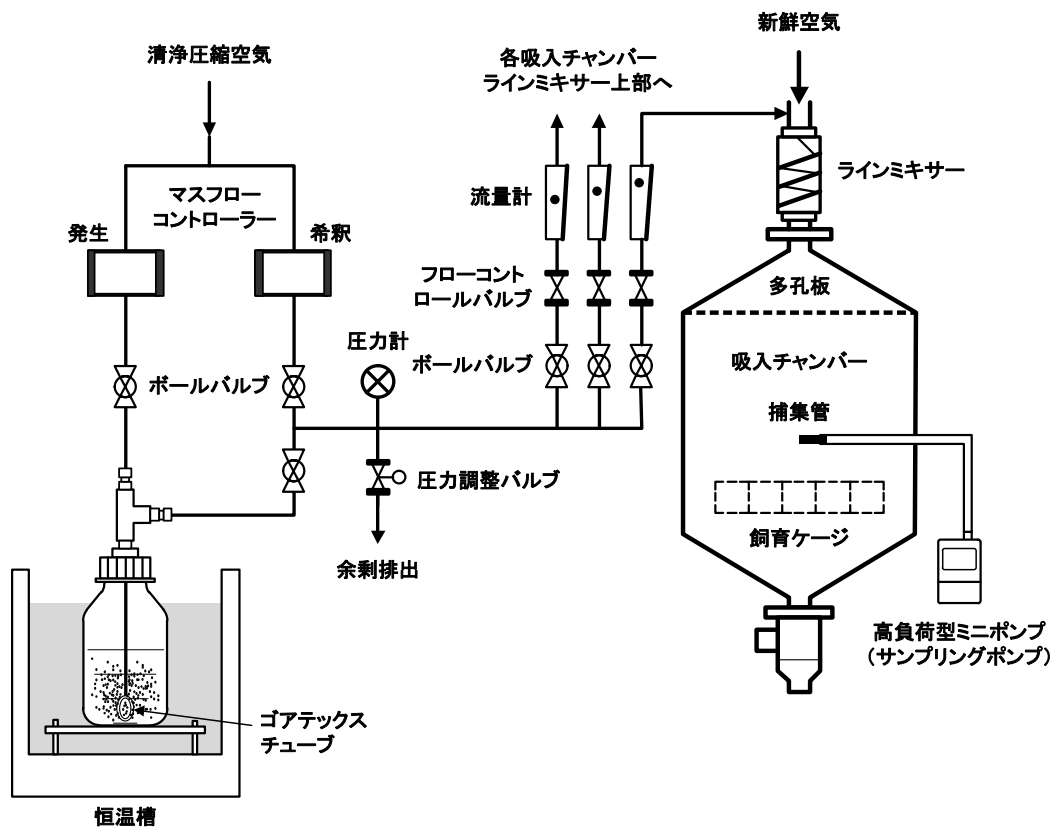


図1 吸入曝露装置のシステム



Photo 1 ガス発生装置（左）と 3m3 横層流方式吸入曝露チャンバー（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 マウスを曝露ケージ(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)

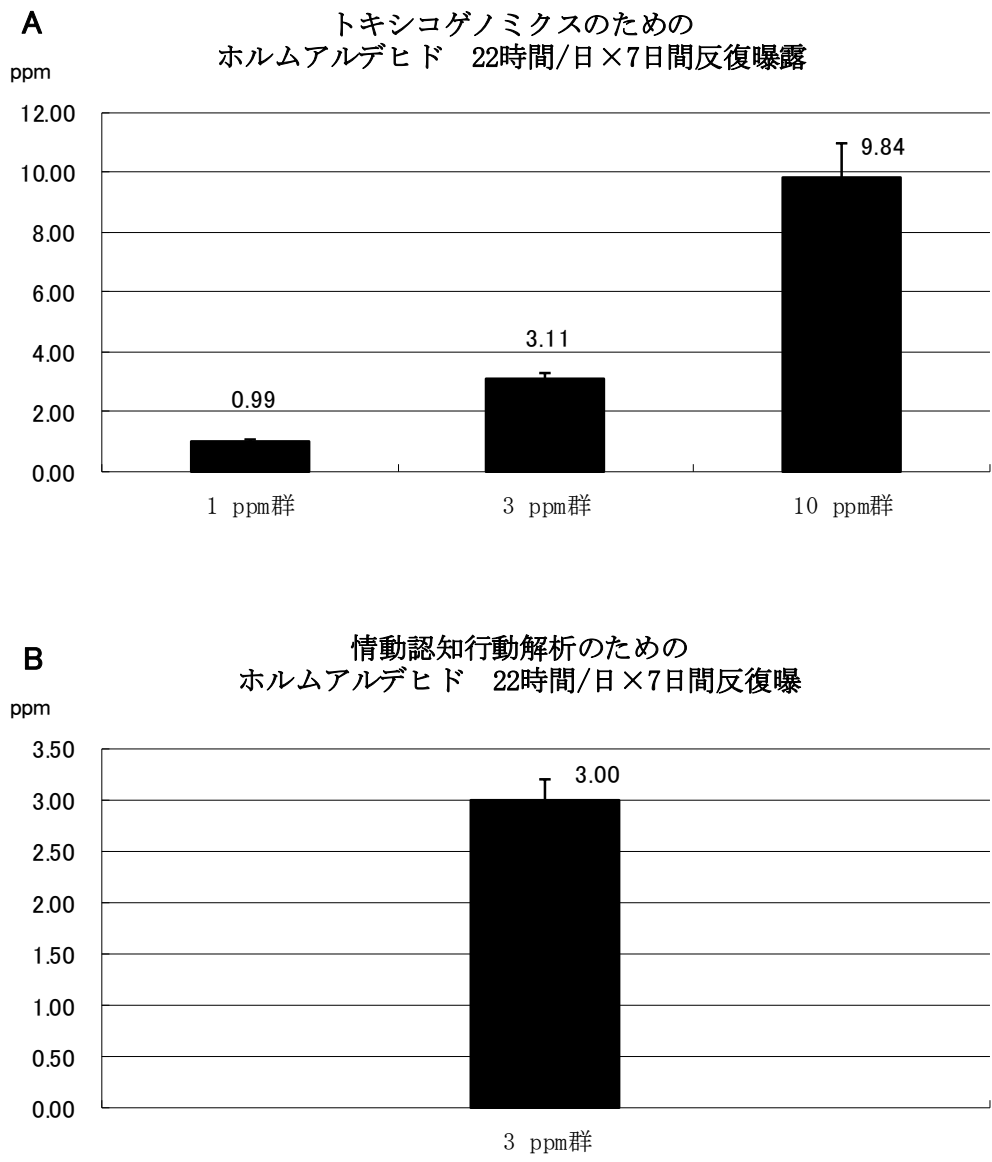


図2 ホルムアルデヒド曝露濃度の測定結果  
 A: トキシコゲノミクスのための22時間/日×7日間反復曝露の場合、B: 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露の場合 (平均値±標準偏差)。平均値をグラフ中に記載した。

令和2年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）（20KD1001）  
ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する  
短期小規模吸入曝露評価系の開発

## 分担研究報告書

分担研究課題：「吸入曝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

スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物：VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該VOCの吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤なVOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成17年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等のSH関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SHに関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。

そこで独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性連関性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るかを検討する。

本分担研究では、当該ガス状物質について、雄性マウスを対象とした22時間/日×7日間反復吸入曝露実験（4用量、16群構成、各群3匹）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。

令和2年度（初年度）は予定通り、ホルムアルデヒド（0、1、3及び10ppm）について22時間/日×7日間反復吸入曝露を実施し、経時的に採取した肺及び海馬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、肺ではサイトカインシグナルを介する炎症を示唆する所見が得られ、他方、海馬では神経活動の活性化と長期記憶に関与するCREB及びCREMシグナル関連遺伝子あるいは神経活動の指標となるImmediate early gene（IEG）の発現の増加が観測され、海馬神経活動の活性化を示唆する所見が得られた。この増加は、曝露終了24時間後にも弱いながらも認められた。肝については解析中で、令和3年度上半期中に、他臓器連関解析とあわせ実施する。

## A. 研究目的

[背景] スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物：VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該 VOC の吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤な VOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成 17 年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等の SH 関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7 日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome 法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SH に関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。

[目的] 独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速

化・高度化に資する評価系となり得るかを検討する。

本分担研究では、当該ガス状物質について、雄性マウスを対象とした 22 時間/日×7 日間反復吸入曝露実験を実施し、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（令和 2 年度）は、ホルムアルデヒド（0、1、3 及び 10 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 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail（Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液）を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

### 遺伝子発現変動解析

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、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。

吸入曝露後、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。

#### 吸入曝露実験

雄性成熟期マウスを対象とし、先行研究での曝露条件である 22 時間/日×7 日間反復曝露実験 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) (22、70、166、190 時間後に観測) (190 時間後は、曝露休止 24 時間後とするプロトコール) 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。被験物質をホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量: 30.03、CAS No.: 50-00-0) とし、試薬としてホルムアルデヒド液 (カタログ番号: 064-00406、試薬特級、ホルムアルデヒド濃度 37.0% 及び 37.5% (ロ

ットによる) (mass/mass) [メタノール 7.7% 含有、ギ酸含量 0.04% 以下]、ロット番号: SKP3949、SKH3051、富士フイルム和光純薬 (株) を使用した。

#### ＜曝露濃度設定根拠＞

マウスへの曝露濃度を、以下の計算根拠を基に、公比 $\sqrt{10}$ で 0, 1, 3, 10 ppm を目標値とした。すなわち、1) ホルムアルデヒドの室内汚染化学物質の室内濃度指針値は 0.08 ppm であり、これを受け、先行研究ではこの濃度が低濃度となるように、4 濃度 (1, 0.3, 0.1, 0 ppm) に亘る吸入曝露群を設定し実験を実施しており、上述の通り、SH レベルの 10 倍程度の濃度を低濃度とすると、4 濃度 (10, 3, 1, 0 ppm) の設定が考えられた (先行研究におけるデータとのブリッジングという意味もある)。2) 一方、実験動物を用いた吸入曝露による毒性試験の結果からは (文献調査)、マウスの 3 日間 (6 時間/日) 吸入曝露 (0, 15, 6, 2, 0.5 ppm) では、15 ppm の濃度で鼻粘膜における組織病理学的変化が観察されており (Svenberg ら、1983, 1986)、24 ヶ月間 (6 時間/日、5 日間/週) 吸入曝露の場合では、5.6 ppm 以上で鼻炎、扁平上皮異形成が観察され (Kerns ら、1983)、また系統の異なるラットの発がん性試験で、気道に組織傷害を起こす濃度以上 (10~15 ppm) で、鼻腔の扁平上皮がんの発生増加が認められている (Woutersen ら、1989 等)。そのため、実験動物を用いた長期吸入毒性試験の結果からは、病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度という判断基準からは、マウスの 3 日間 (6 時間/日) 吸入曝露における 15 ppm 未満ということとなり、この点、上述の高濃度 10 ppm はこの条件に適合します。総じて、「長期吸入曝露実験において病理組織学的な変化が観察されない最大の濃度程度とし、この濃度選択の際、SH レベルの 10 倍程度の濃度も考慮」という観点から、本実験でのホルムアルデヒドの濃度として、4 濃度 (0, 1, 3, 10 ppm) を設定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科

学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程（平成27年4月版）」。

### C. 研究結果

以下に、ホルムアルデヒド(0, 1, 3, 10 ppm)について22時間/日×7日間反復曝露の際の海馬、肝及び肺における解析結果を示す。

C-1: ホルムアルデヒド[22時間/日×7日間反復] 曝露時の「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237 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125 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、サイトカインに関するIL(インターロイキン)1B、IFN(インターフェロン)GあるいはTGFB1が、また炎症に関与する(抗炎症作用)グルココルチコイドの核内受容体であるNR3C1[グルココルチコイド受容体]が抽出されてきた。この事から、肺においてはホルムアルデヒドの吸入曝露により、IL1Bなどのサイトカインシグナルが活性化され、炎症が誘発されることが示唆された。このI11b遺伝子と、Upstream Analysisにおいてその標的遺伝子として示されている遺伝子の内、Angpt14、Bcl211 および Cdkn1c 遺伝子の発現変動について図1に示す。曝露終了24時間後には、この影響を示唆する関連遺伝子の発現増加は認められなかった。

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。

投与後経過時間は、22、70、166 及び 190 時間後であり、この内 190 時間後は、曝露休止24時間後とするプロトコールで実施した。

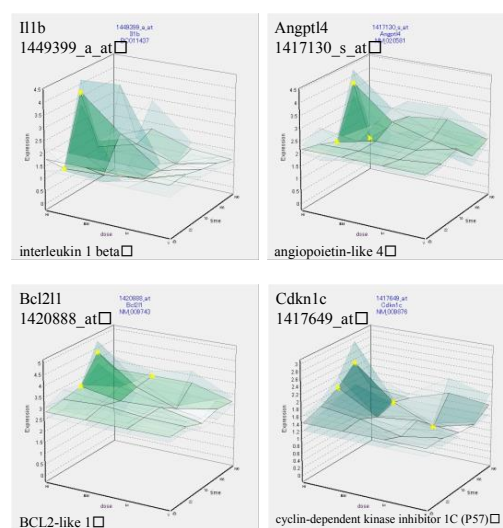


図1 ホルムアルデヒド [22時間/日×7日間反復] 曝露時の「肺」における IEG の内、I11b と Angpt14 (上段、左から)及び Bcl211 と Cdkn1c (下段、左から) 遺伝子の発現変動

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

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 173 ps、V S P として 49 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: ホルムアルデヒド [22 時間/日 × 7 日間反復] 曝露時の「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 1,102 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 147 ps が見いだされた。神経伝達に絡む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) 遺伝子群が見出された。この増加は、曝露終了 24 時間後にも弱いながらも認められた。なお 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。加えて、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、神経活動の活性化と長期記憶に関与する CREB ならびに CREB と代償的に働く CREM が抽出されていった。これらの事 (IEG 及び CREB・CREM シグナルネットワークの活性化を示す所見) から、海馬における神経活動の活性化が示唆された。

この IEG の遺伝子の内、Arc、Fos、Junb 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動について図 2 に示す。

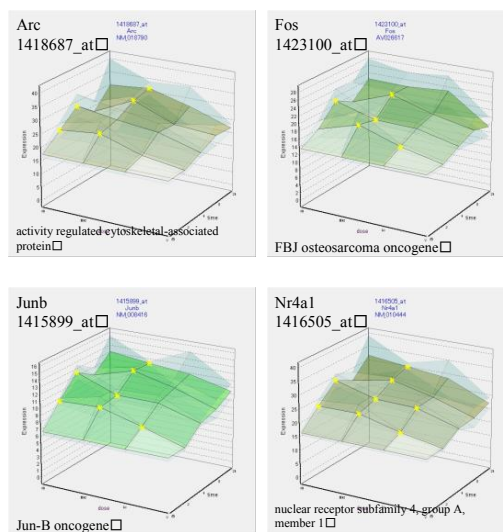


図 2 ホルムアルデヒド [22 時間/日 × 7 日間反復] 曝露時の「海馬」における IEG の内、Arc、Fos、Junb 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動

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。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。

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 759 ps、V S P として 20 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-3: ホルムアルデヒド [22 時間/日 × 7 日間反復] 曝露時の「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。

#### D. 考察

遺伝子発現変動解析の結果、成熟期マウス肺において、サイトカインシグナルを介する炎症を示唆する所見が得られた。この

中には、サイトカインの一種である IL1 $\beta$  の発現増加が含まれていた。先行研究において、極低濃度のホルムアルデヒド(0.1、0.3、1.0 ppm)の6時間/日 $\times$ 7日間反復吸入曝露の際の肝・肺の連関解析においても、IL1 $\beta$  の発現増加が認められており、この事は、本実験の結果、肺において炎症を示唆する所見が得られたことを支持する。

海馬での解析の結果、長期記憶に関与する CREB シグナル関連遺伝子あるいは神経活動の指標となる IEG の発現の増加が観測され、海馬神経活動の活性化を示唆する所見が得られた。この増加は、曝露終了24時間後にも弱いながらも認められた。この点、先行研究ではSHレベルの極低濃度のホルムアルデヒドの吸入曝露により、肺あるいは肝からの IL-1 $\beta$  が海馬における 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挙げている。すなわち、肺或いは肝からの二次的シグナルとして IL-1 $\beta$  が海馬に働き IEG の発現を抑制するという可能性を示唆した。この事は、上述の海馬神経活動の活性化とは一見、矛盾する。

この点に関しては、併行して、神経活動の活性化を示唆する CREB や CREM シグナル関連遺伝子の発現増加が認められることから、今回のような比較的高濃度のホルムアルデヒドの吸入曝露の場合、なんらかのシグナルが、IL-1 $\beta$  による IEG の発現抑制影響を超えて、IL-1 $\beta$  の発現増加を誘発している可能性を示唆され、この事は、研究分担者による情動認知行動解析において、曝露終了日の時点では影響が認められない、という解析結果と矛盾しないものと考えられる。すなわち、海馬においては、神経伝達にブレーキをかける肺からの IL-1 $\beta$  の影響に加えて、神経伝達を促進するアクセルのはらきを有する、CREB、CREM シグナルや IEG 遺伝子群を活性化するなんらかのシグナルの両方が働いており、少なくとも吸入曝露終了24時間後までは、このアクセルの作用の方が強く、神経伝達は活性化しているものと考えられた。今後、肝における解析及び他臓器連関解析とあわせ、引き続き、この神経伝達の活性化に係る分子の探索をおこ

なう。

## E. 結論

令和2年度は予定通り、ホルムアルデヒド(0、1、3、10 ppm)を対象とし、雄性成熟期マウスに22時間/日 $\times$ 7日間反復吸入曝露(4用量、各群3匹、[曝露22、70、166、199時間後に観測(曝露190時間後は曝露休止24時間後にあたる)])させ、得られた肺、肝、脳サンプルについて、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。

肺での解析の結果、サイトカインシグナルを介する炎症を示唆する所見が得られた。曝露終了24時間後には、この影響を示唆する関連遺伝子の発現増加は認められなかった。

海馬での解析の結果、神経活動の活性化と長期記憶に関与する CREB 及び CREM シグナル関連遺伝子あるいは神経活動の指標となる Immediate early gene (IEG) の発現の増加等が観測され、海馬神経活動の活性化を示唆する所見が得られた。この増加は、曝露終了24時間後にも弱いながらも認められた。

肝については解析中で、令和3年度上半期中に、他臓器連関解析とあわせ実施する。

令和3年度(来年度)は計画に則り、キシレンあるいはトルエンにつき、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(抜粋)

Richard Nock, Natalia Polouliakh, Frank Nielsen, Keigo Oka, Carlin R Connell, Cedric Heimhofer, Kazuhiro Shibana, Samik Ghosh, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Taketo Akama, Hiroaki Kitano: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. PLoS One 2020; 15(7): e0233755.

[doi 10.1371/journal.pone.0233755]

### 2. 学会発表(抜粋)

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第

47 回日本毒性学会学術年会 (2020. 6. 30.)  
オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドーモイ酸投与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 2 ～、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020. 6. 29.) オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020. 6. 29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020. 6. 30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020. 6. 30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020. 6. 30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020. 7. 1.) オンライン

原唯香、平館裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロジェン受容体 $\alpha$ 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第 113 回日本繁殖生物学会大会 (2020. 9. 25.)、オンライン

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y: Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing、Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome (2020. 2. 10) on-line

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update、59th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2020. 3. 15) on-line

## 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

令和2年度厚生労働科学研究補助金（20KD1001）

分担研究課題： 吸入曝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

スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物：VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該VOCの吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤なVOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成17年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等のSH関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SHに関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。そこで独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るかを検討する。

本分担研究では、雄性成熟期マウスを対象とした反復吸入曝露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。

令和2年度（初年度）は予定通り、ホルムアルデヒド（0、3 ppm）について、22時間/日×7日間反復吸入曝露試験を実施し、情動認知行動解析の結果、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が、曝露終了日の時点では認められなかったが、曝露3日後では認められ、これらの低下は遅発性の影響であることが示唆された。

## A. 研究目的

[背景] スクリーニング評価の結果得られた、化審法の規制区分「優先評価化学物質」には、長期毒性試験の情報が無いために、長期曝露時のヒトへの健康影響を判定できない物質が多数存在する。この理由として、長期試験に要する多大な労力とコスト高が挙げられる。加えてガス状物質については評価の際に、吸入曝露による長期試験情報が必要となるが、吸入曝露の場合、経口の場合よりもさらに労力とコストがかかり、特にその有害性評価の迅速化・高度化が求められている。実際「優先評価化学物質」にはガス状物質（揮発性有機化合物：VOC）が数多く存在し、また国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対する発がん性が認められると分類される物質（ホルムアルデヒド等）も含まれることから、当該 VOC の吸入曝露による長期毒性評価の迅速化は喫緊の課題である。さらに長期曝露により中枢影響が重篤な VOC（トルエン等）も含まれ、中枢への影響評価の観点も重要となる。

一方、我々は平成 17 年より、シックハウス症候群（SH）対策に向けたハザード評価研究を実施してきた。ここでは、ホルムアルデヒド等の SH 関連物質について指針値レベルの極低濃度下、7 日間の短期間小規模の動物実験を行い、肺、肝、脳の遺伝子発現変動を高精度に測定し分析し（Percellome 法）、毒性予測を行ってきた経験と実績があり、SH に関する毒性試験情報をヒトへ外挿することの困難さを克服し得ることを明らかにしてきた。また中枢影響も予測して実際に情動認知行動にて実証し、その分子機序に関わる共通因子を推定している。しかし高濃度下での吸入曝露の場合、本手法により長期毒性の予測が可能かは不明である。

[目的] 独自開発の短期間小規模のハザード評価手法を、ガス状「優先評価化学物質」に適用し、①吸入曝露時の肺、肝、海馬の遺伝子発現データを取得、解析し、②肺、肝、海馬の毒性関連性を確認し、③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、④当該物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する評価系となり得るかを検討する。

本分担研究では、雄性成熟期マウスを対象とした反復吸入曝露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]）を対象とした 22 時間/日×7 日間反復曝露試験（2 用量、6 群構成、各群 8 匹）を実施し、曝露終了日（急性影響の検討）及び曝露 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

令和 2 年度は予定通り、ホルムアルデヒド（0、3 ppm）について、22 時間/日×7 日間反復吸入曝露を成熟期マウスに実施し（2 用量、6 群構成、各群 8 匹）、情動認知行動を 3 種類の試験により解析した。別途、トキシコゲノミクスのための吸入曝露実験（ホルムアルデヒド濃度：0、1、3、10 ppm）において、10 ppm の 22 時間/日×7 日間反復吸入曝露の際に体重減少が有意に認められ、当情動認知行動解析では体重変化による影響を排除したいため、その下の用量である 3 ppm の濃度を採用した。

解析時点として、曝露終了日と曝露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。曝露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ールでの測定時点である為であり、これらのデータとの比較解析が可能となるためである。

解析の結果、曝露終了日の時点(急性影響の検討)は全ての試験項目で対照群と有意な差は認められなかった(図3として、条件付け学習記憶試験の結果を示す)。他方、曝露3日後では、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められ(図4)、これらの低下は遅発性の影響であることが示唆された。

この点、先行研究のSHレベルの極低濃度のホルムアルデヒドの吸入曝露の場合、曝露終了日の時点では、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が認められており、本実験結果と一見、矛盾する。海馬における遺伝子発現変動解析の結果を考慮する必要があるが、この理由として、今回のように高濃度の場合の吸入曝露の場合は、こうした記憶の低下は誘発されず、むしろ、曝露終了後、ホルムアルデヒドの濃度が低下するに従って、先行研究と同様の極低濃度の曝露濃度となり、その結果、上述した記憶異常が生じた可能性が考えられた。また、このことを通して、遅発性の影響が生じた可能性が考えられた。

#### D. 結論

このように、ホルムアルデヒド(0、3 ppm)について、22時間/日×7日間反復吸入曝露試験を実施し、情動認知行動解析の結果、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が、曝露終了日の時点では認められなかったが、曝露3日後では認められ、これらの低下は遅発性の影響であることが示唆された。

曝露終了日の時点と曝露3日後の時点に

おける解析バッテリーでの変化の比較を、行動の逸脱レベルを示すレーダー図として示す(図2)。

令和3年度(来年度)は計画に則り、キシレンあるいはトルエンにつき、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

Saito H, Hara K, Kitajima S, Tanemura K. Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reprod Toxicol.* 2020 Oct 9;S0890-6238(20)30225-2. doi: 10.1016/j.reprotox. 2020.10.003. Epub ahead of print. PMID: 33045311..

Umezu K, Kurata S, Takamori H, Numabe T, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Characteristics and Possible Role of Bovine Sperm Head-to-Head Agglutination. *Cells.* 2020 Aug 9;9(8):1865. doi: 10.3390/cells9081865. PMID: 32784858; PMCID: PMC7463926.

Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Effect of neurotensin on cultured mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev.* 2020 Oct 13;66(5):421-425. doi: 10.1262/jrd.2020-002. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32493860; PMCID: PMC7593629.

Umezu K, Hara K, Hiradate Y, Numabe T, Tanemura K. Stromal cell-derived factor 1 regulates in vitro sperm migration towards the cumulus-oocyte complex in cattle. *PLoS One.* 2020 Apr 30;15(4):e0232536. doi: 10.1371/journal.pone.0232536. PMID: 32353075; PMCID: PMC7192438.



## 2. 学会発表

種村健太郎、佐々木貴熙、齊藤洋克、高橋祐次、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへのドーモイ酸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2～」第47回日本毒性学会学術年会（2020.6.29-7.1）、オンライン

種村健太郎、齊藤洋克、古川佑介、相崎健一、北嶋聡、菅野純「低用量／低濃度化学物質の発生—発達期ばく露による情動認知行動毒性—情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～」第47回日本毒性学会学術年会（2020.6.29-7.1）、オンライン

齊藤洋克、原健士朗、富永貴志、中島欽一、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、「低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響」第47回日本毒性学会学術年会（2020.6.29-7.1）、オンライン

梅津康平、倉田笙平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシにおける凝集精子の特性と役割」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎「エストロジェン受容体 $\alpha$ 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

張磨琉亜、平舘裕希、松山誠、藤井渉、原健士朗、種村健太郎「Axdnd1 遺伝子欠損マウスに精子形成不全」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

山下司朗、小賀坂祐平、平舘裕希、種村健太郎、千代豊「ブタ受精卵へのCRISPR/Cas9導入による遺伝子組換え胚作出とTrex2共導入によるモザイク胚低減」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

齊藤洋克、原健士朗、北嶋聡、種村健太郎、

「ビタミンE欠乏給餌によるマウス雄性生殖器および精子への影響と加齢による退行変化との類似性」日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会（2020.11.24-12.8）、オンライン

種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」（2020.12.5）Web口演

## 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

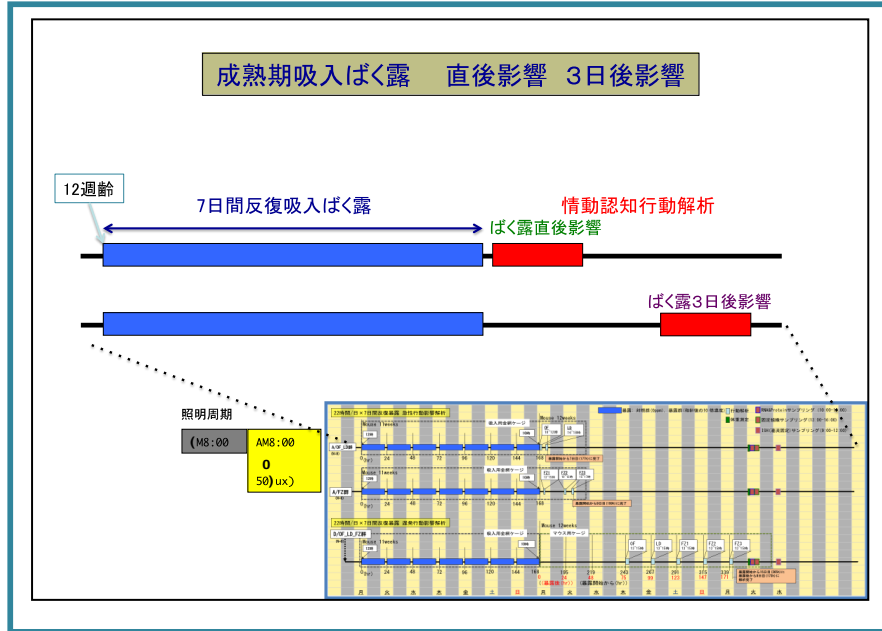


図 2

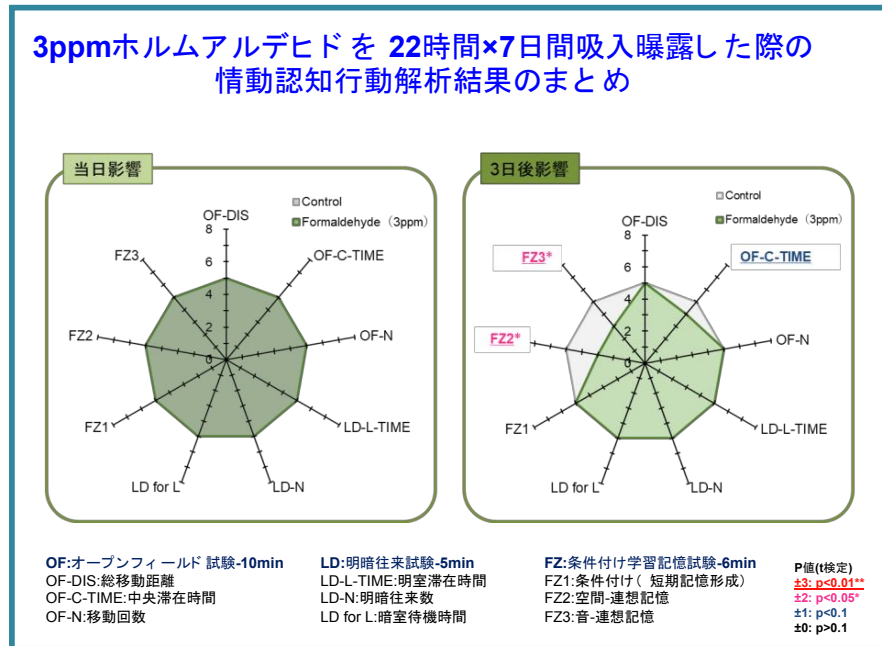


図 3

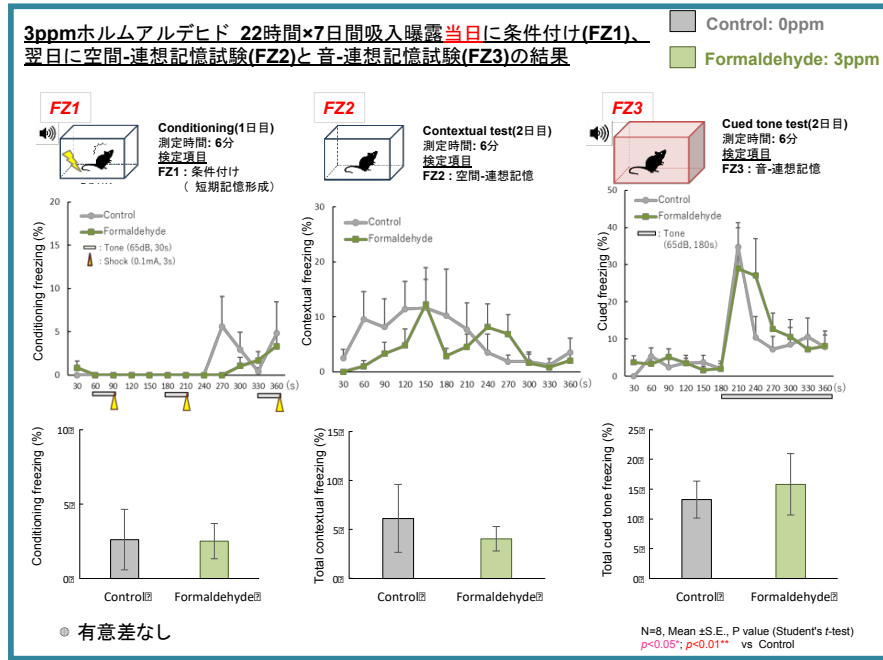
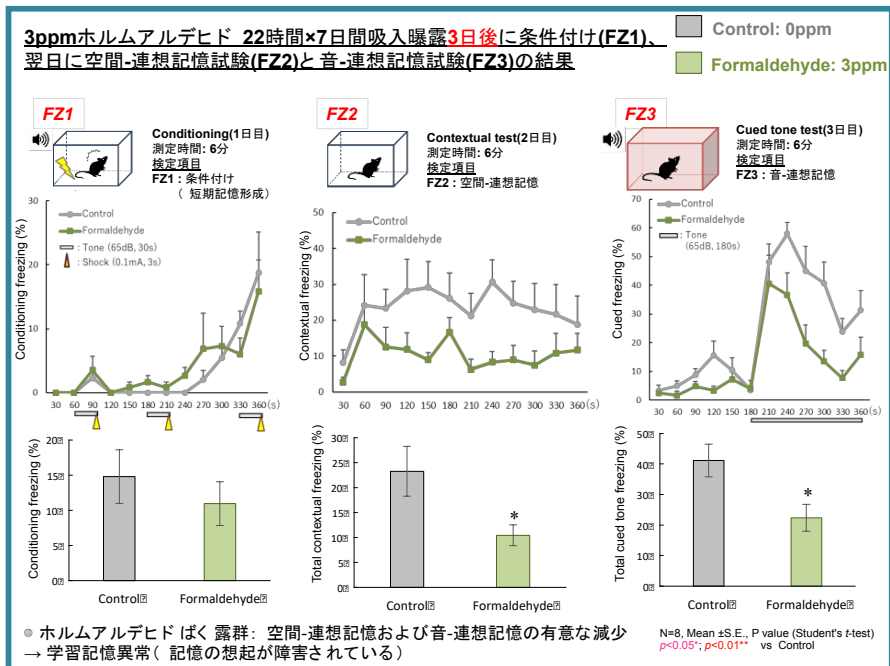


図 4



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Ku wagata M, Ochiya T, Kitajima S, Yoko H.	Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4.	Toxicol Rep	7	685 - 692	2020
Nock R, Polouliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell R C, Heimhofer C, Shibana i K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama T, Kitano H.	A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions.	PLoS One	15(7)	e023 3755	2020
Saito H, Hara K, Kitajima S, Tanemura K.	Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging.	Reprod Toxicol.	98	225 - 232	2020

令和3年 3 月 29 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する短期小規模吸入曝露評価系の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・部長  
(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年 3 月 29 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する短期小規模吸入曝露評価系の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター安全性予測評価部・客員研究員  
(氏名・フリガナ) 菅野 純・カンノ ジュン

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

令

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 英

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

2. 研究課題名 ガス状優先評価化学物質の長期毒性評価の迅速化・高度化に資する短期小規模吸入曝露評価系の開発（20KD1001）

3. 研究者名 （所属部局・職名） 東北大学大学院農学研究科・教授

（氏名・フリガナ） 種村 健太郎・タネムラケンタロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東北大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （有の場合はその内容：研究実施の際の留意点を示した）

（留意事項） ・該当する口にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。