

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10ppm）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、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10ppm）に対して、それぞれ0.99、3.11及び9.84ppm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（3ppm）に対して3.00ppm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 m³、Photo 1）とし、チャンバー内にサーキュレーター（Photo 2）を設置し強力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 α 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

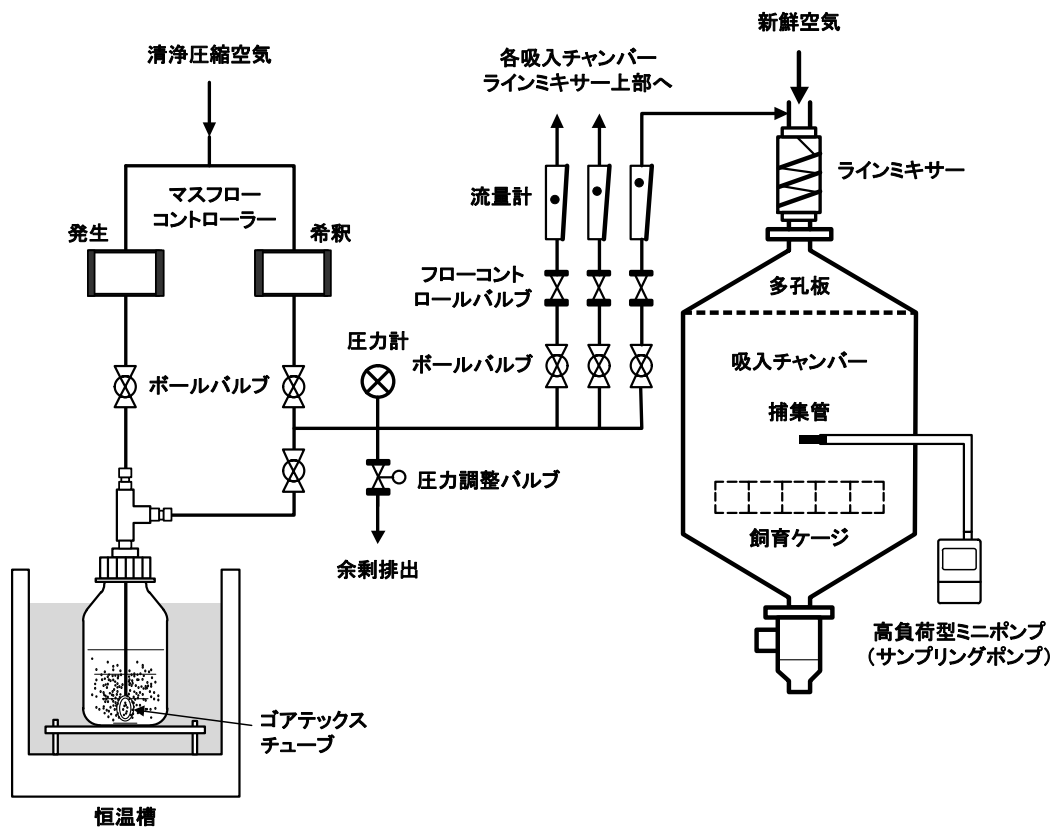


図1 吸入曝露装置のシステム



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)

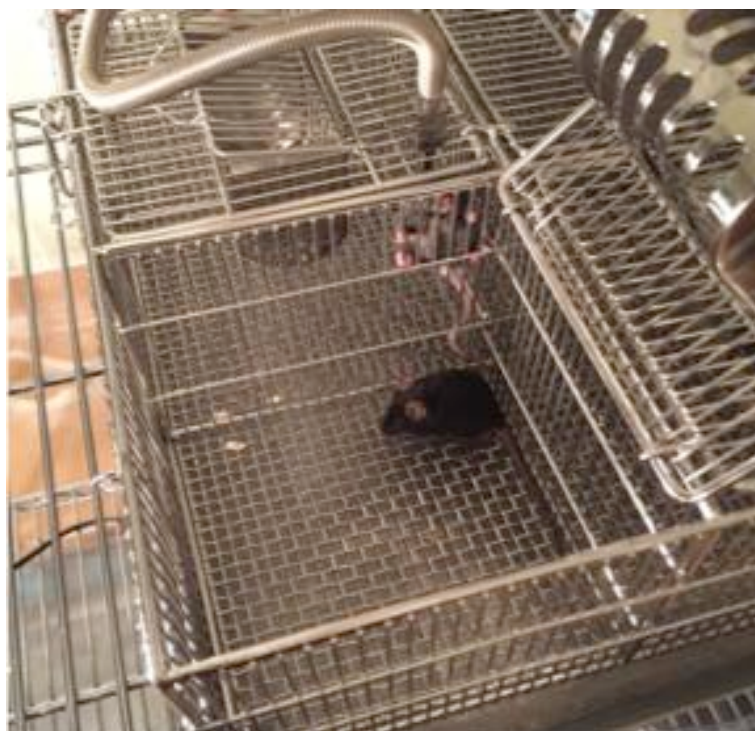


Photo 3 マウスを曝露ケージ(柴田科学)に収容した状態



Photo 4 捕集管採気用ポンプ MP Σ -30、(柴田科学)

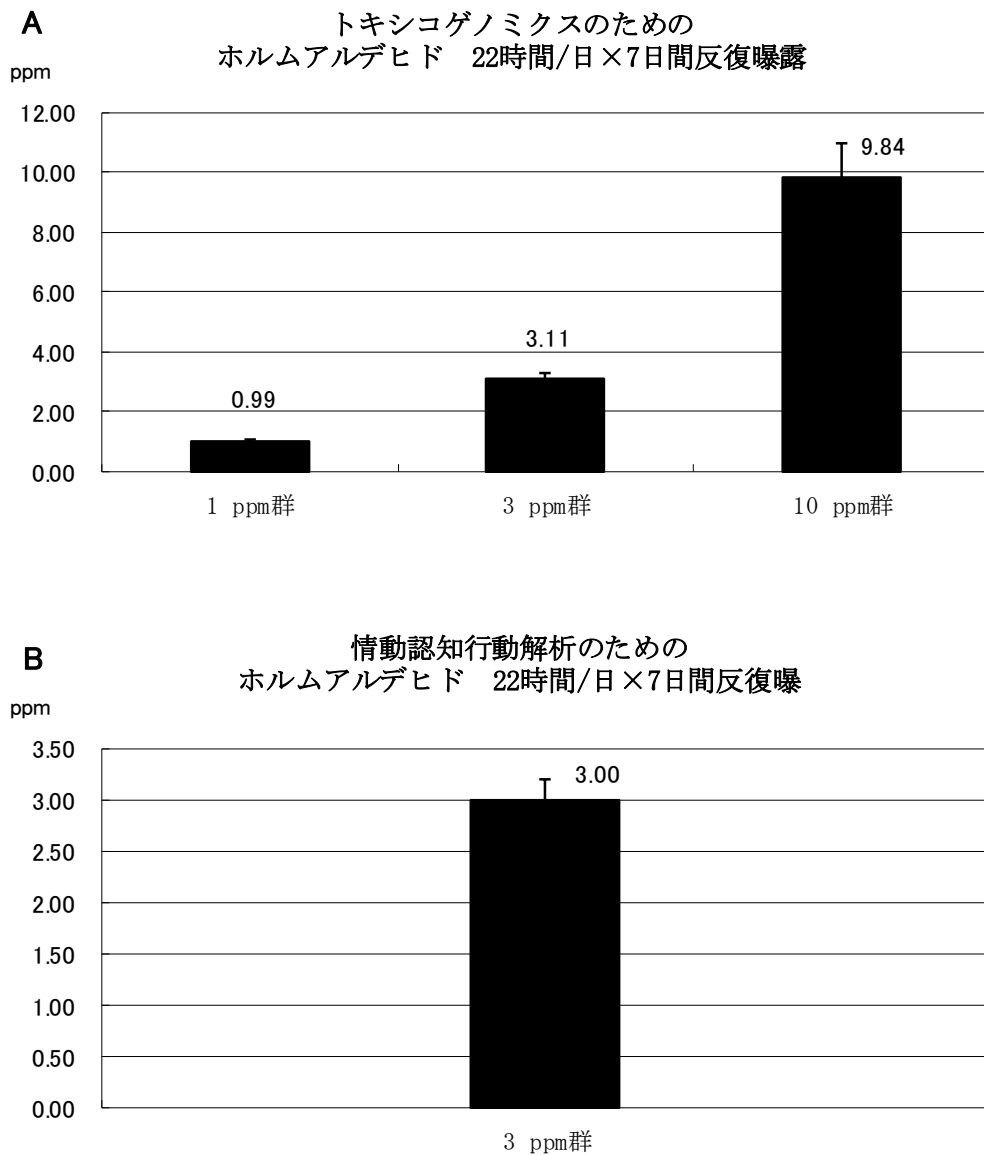


図2 ホルムアルデヒド曝露濃度の測定結果
 A: トキシコゲノミクスのための22時間/日×7日間反復曝露の場合、B: 情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復曝露の場合 (平均値±標準偏差)。平均値をグラフ中に記載した。