

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。

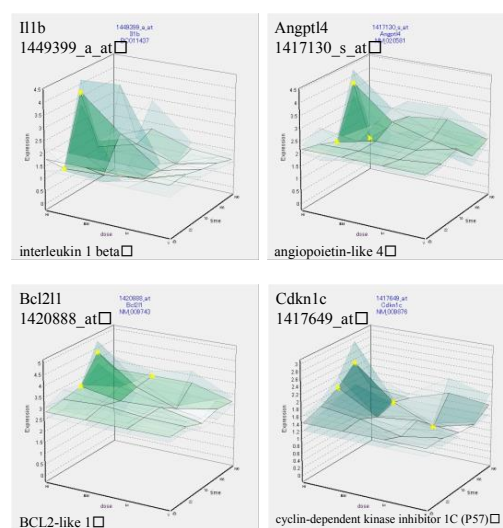


図1 ホルムアルデヒド [22時間/日×7日間反復] 曝露時の「肺」における IEG の内、I11b と Angpt14 (上段、左から)及び Bcl211 と Cdkn1c (下段、左から) 遺伝子の発現変動

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。

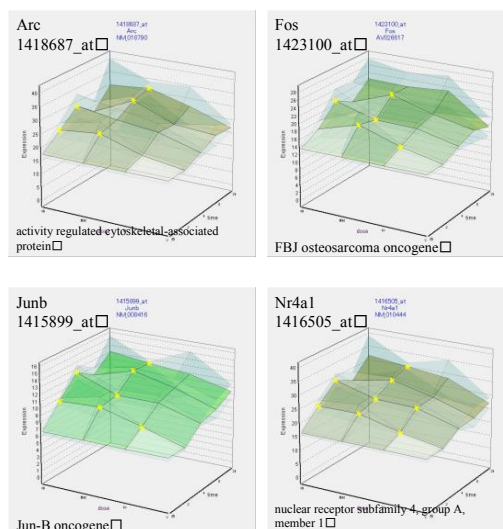


図 2 ホルムアルデヒド [22 時間/日 × 7 日間反復] 曝露時の「海馬」における IEG の内、Arc、Fos、Junb 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動

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 β 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 β 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 β 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 β が海馬に働き IEG の発現を抑制するという可能性を示唆した。この事は、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 β による IEG の発現抑制影響を超えて、IL-1 β 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 β 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 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

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