

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一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 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（2020.9.23-25）、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

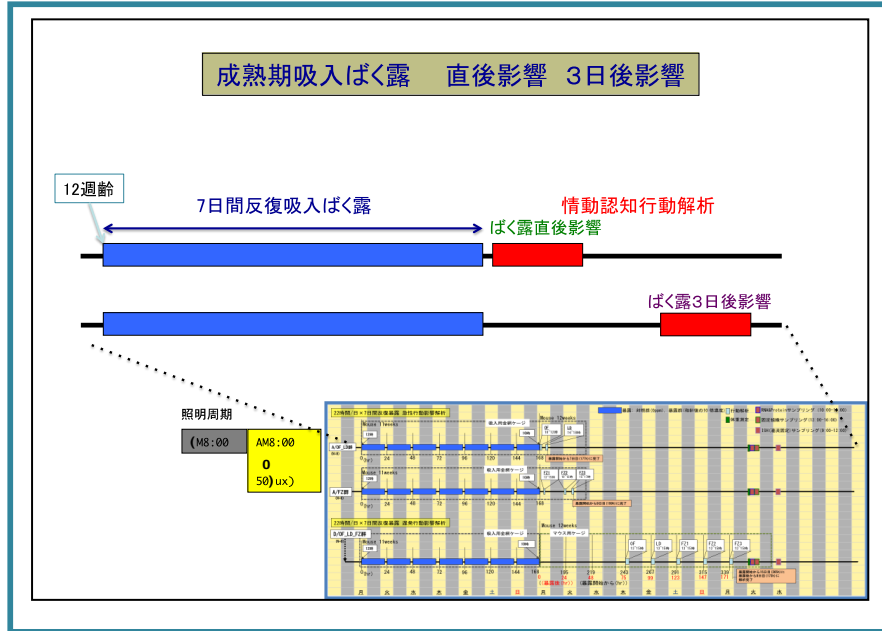


図 2

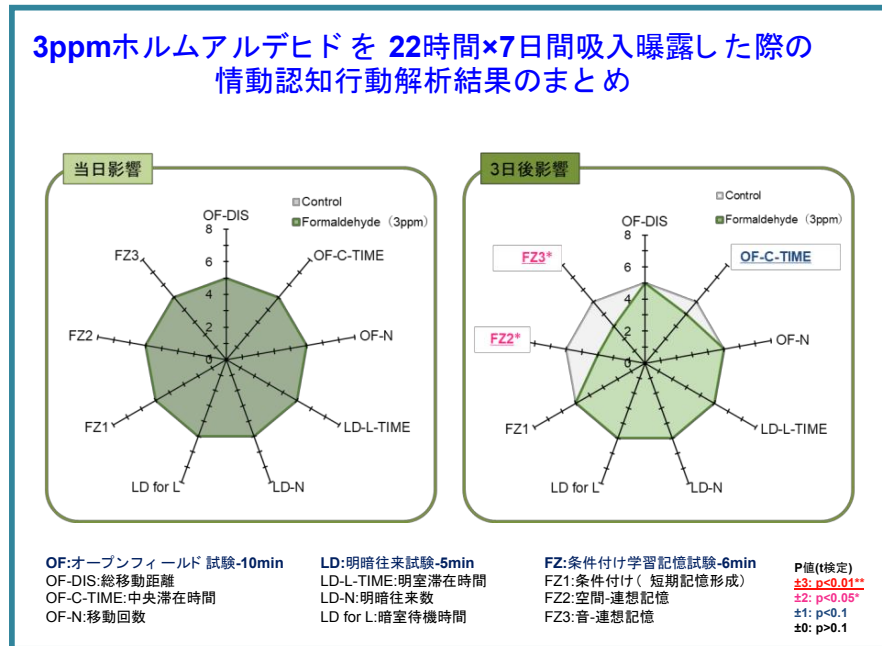


図 3

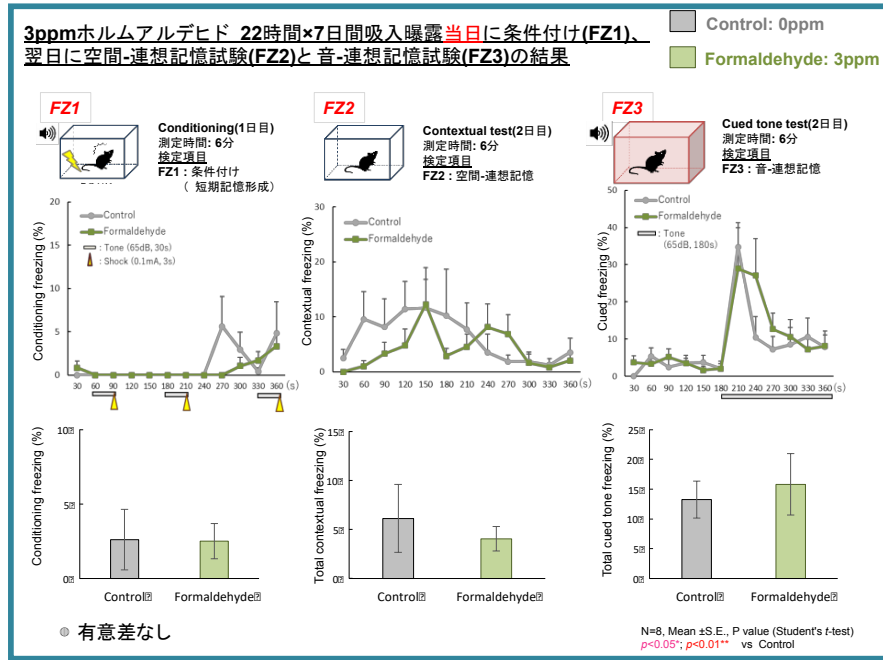


図 4

