

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、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 ± 0.07 （0.90～1.09ppm）、 3.11 ± 0.19 （2.72～3.32ppm）、 9.84 ± 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 ± 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・高度化への活用に寄与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 ± 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。

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。

<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 ± 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

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 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×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、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 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 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・高度化への活用寄予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 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

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

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