

令和3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に関する研究

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、肝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結果、肺と肝ではサイトカインシグナルを介する炎症、また概日リズムの乱れ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。

令和3年度（今年度）は予定通り、キシレン（0、2、7及び20ppm）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肝サンプルの遺伝子発現変動を網羅的に解析した結果、肺では酸化的ストレスシグナル及び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。肝では有害事象に関わる顕著な遺伝子発現変動は認められなかった。海馬については解析中で、令和4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、臓器毎及び臓器関連解析とそのデータベース化を行う。昨年度（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。今年度（令和 3 年度）は予定通り、キシレン（0、2、7 及び 20 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碎液を調製した。得られた破碎液の 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ールに従い、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]

ホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量: 30.03、CAS No.: 50-00-0) は、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。

キシレン (xylene; 分子量: 106.17、CAS No.: 1330-20-7) は、試薬としてのキシレン (カタログ番号: 244-00081、試薬特級、キシレン濃度: 80% (o-, m-, p-キシレンの含量)、ロット番号: DLJ5960, DLF3233、富士フイルム和光純薬(株)) を使用した。

#### <曝露濃度設定根拠>

ホルムアルデヒドの場合: 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 10, 3, 1, 0 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として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 (15、6、2、0.5、0 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 設定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(10, 3, 1, 0 ppm)を設定した。

キシレンの場合：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 20, 7, 2, 0 ppm を目標値とした。すなわち、1) キシレンの室内汚染化学物質としての室内濃度指針値は 0.20 ppm (→H31 年 1 月 17 日以降、0.05 ppm に変更された) 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(2.0, 0.7, 0.2, 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(20, 7, 2, 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)、ラットの 3 ヶ月間(6 時間/日)吸入曝露(m-キシレン: 100, 50, 0 ppm)では、50 ppm 以上の濃度で痛覚の感受性増加が観察され(Korsak ら、1994)、またラットの 90 日間(6 時間/日)吸入曝露(o-キシレン: 78, 0 ppm)では、56 日目に 1 例の死亡が観察(Jenkins ら、1970)されている。なお、ラットの 13 週間(6 時間/日)吸入曝露(o-キシレン: 810, 460, 180, 0 ppm)では、異常なしとする報告がある(Carpenter ら、1975)。情動認知行動解析を考慮すると、マウスではなくラットの場合の報告ではあるが、痛覚の感受性増加が認められる 50 ppm 以下の濃度が望ましく、この点、上述の高濃度 20 ppm 設定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異常が観察されない最大の濃度程度で、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、本実験でのキシレンの濃度として、4 濃度(20, 7, 2, 0 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、昨年度(令和 2 年度)実施したホルムアルデヒド(0, 1, 3, 10 ppm)(以下、C-1)及び、今年度(令和 3 年度)実施したキシレン(0, 2, 7 及び 20 ppm)(以下、C-2)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。

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。



C-1: ホルムアルデヒドの場合 :

C-1-1: 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、サイトカインである IL (インターロイキン) 1B、IFN (インターフェロン) G あるいは TGFβ1 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、加えて、概日リズム関連遺伝子である CLOCK が抽出されてきた (この際のカLOCK 関連遺伝子: ANGPL4、CCN2、FAM107A、FKBP5、Hspa1b、MYLK、NR1D2、PER1、TEF)。このことから、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、また概日リズムの乱れを示唆する所見が得られた。曝露終了 24 時間後、炎症に関連する遺伝子の発現増加は認められなかったが、概日リズム関連遺伝子 Per1 の場合は、発現増加が減少しつつも持続した。

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、VSP 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-1-2: 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 :

発現が有意 (t 検定での P 値<0.05) に増加するものとして 400 ps、VSP として 165 ps が見いだされた。IPA による検索で、概日リズムシグナルネットワークが抽出されてきた。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、IPA 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、IL6、あるいは TNF 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、加えて、概日リズム関連遺伝子である CLOCK が抽出されてきた (この際のカLOCK 関連遺伝子: BHLHE40、DBP、FKBP5、GJA1、HIPK3、MKNK2、NOCT、NR1D2、PER1、POR、SLC1A2、ST3GAL5、TEF、USP2)。抽出されてきた。このことから、肝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、また概日リズムの乱れ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。曝露終了 24 時間後、炎症に関連する遺伝子の発現増加は認められなかったが、概日リズム関連遺伝子 Per1 の場合は、発現増加が減少しつつも持続した。

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 1,148 ps、VSP として 58 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-2-3: 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、VSP 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。

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、VSP 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。

血液-脳脊髄液関門 (blood-cerebrospinal fluid barrier; BCSFB) 関連遺伝子の発現変動: 他臓器からの二次的シグナルの関与を含め、被験物質の海馬への影響を考慮する際、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の障害の有無に関する検討は、有害性誘発機序を考える上で有用と考える。本研究では、直接、BBB サンプルの採取をしていないが、海馬サンプルに脈絡叢が含まれているため、脈絡叢に存在する血液-脳脊髄液関門 (blood-cerebrospinal fluid barrier; BCSFB) の状態から BBB 障害が類推できると考え、BBB 関連遺伝子の発現変動について検討した。

BBB において、内皮細胞間結合に参与するタイトジャンクション (密着結合) を構成する、膜貫通型蛋白質クローディング (claudin) ファミリー (Clcn5 等 22 種) やオクルジン (Oc1n) 遺伝子については、顕著な発現変動は認められなかった (なお、Clcn5 のノックアウトマウスでは血液脳関門不全や致死が報告されている)。薬剤等のトランスポーターの P-糖タンパク (MDR1) である Abcb1b 遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。また BBB の障害に寄与すると考えられるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) ファミリーの遺伝子についても、顕著な発現変動は認められなかった。他方、ブドウ糖を運ぶグルコーストランスポーター 1 (GLUT1) (Slc2a1) 遺伝子では、濃度依存的で有意な発現増加が認められ、ブドウ糖の取込み能の促進が示唆された (なお、Slc トランスポーター関連遺伝子の中で、顕著な発現変動を示した遺伝子は、この Slc2a1 遺伝子のみであった)。この促進は、海馬におけるエネルギー面での代償作用の可能性が示唆されたが、神経細胞にも存在することから BBB と

の関連は不明であった。以上の解析結果から、現時点では BBB の障害を強く示唆するデータは得られなかった。

C-2: キシレンの場合:

C-2-1: キシレン [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 1,090 ps、VSP として 493 ps が見いだされた。IPA による検索で、酸化ストレス、タンパクのユビキチン化、折りたたみ不全タンパク質 (unfolded protein) 反応、グルタチオン反応が抽出されてきた。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、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 (NFE2L2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)、アポトーシスに関係するがん抑制遺伝子 TP53 (p53)、抗酸化機構に参与する TXNRD1a、小胞体ストレス応答の下流に位置する ATF4、サイトカインである IL (インターロイキン) 1B、TNF、TGFB1 あるいは CXCL8 が抽出されてきた。この事から、肺においてはキシレンの吸入曝露により、酸化ストレスが誘発され、また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。この際、タンパクのユビキチン化や折りたたみ不全タンパク質の産生が更新し、小胞体ストレスが誘発されることも示唆された。曝露終了 24 時間後、酸化ストレスや炎症に関連する遺伝子の多くは、その発現増加が認められなかったが、分子シャペロンとして機能し、タンパク質が折りたたみ不全とならないように働く、熱ショックタンパク質関連遺伝子の発現は持続した。

上記の酸化ストレス関連遺伝子の内、Srxn1、Txnrd1、Gsta2 および Gpx2 遺伝子の発現変動について図 1 に示す。

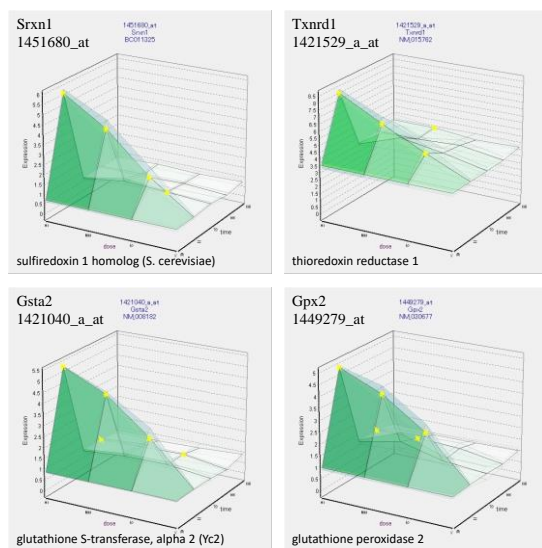


図 1 キシレン[22 時間/日×7 日間反復]曝露時の「肺」における酸化ストレス関連遺伝子内の、Srxn1 と Txnrd1（上段、左から）及び、Gsta2 と Gpx2 遺伝子（下段、左から）の発現変動

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 66 ps、VSP として 25 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-2-2: キシレン[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：

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 111 ps、VSP として 26 ps が見いだされた。IPA による検索で、折りたたみ不全タンパク質 (unfolded protein) 反応が抽出されてきた。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、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、熱ショック転写因子 HSF1 及び HSF2 が

抽出されてきた (なお、HSF1 の標的遺伝子は、DNAJA1、HSPA1A/HSPA1B、Hspa1b、HSPA8、HSPH1 であった)。この事から、肝においてはキシレンの吸入曝露により、肺の場合とは異なり、酸化ストレス反応は示唆されなかったが、タンパク質の変性が亢進していることが示唆された。ただし、発現変動する遺伝子数が 26 ps と、肺の場合 (493 ps) と比較すると非常に少なく、顕著な反応とは考えられなかった。

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 837 ps、VSP として 19 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-2-3: キシレン[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：

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

昨年度 (令和 2 年度)、ホルムアルデヒド (0、1、3 及び 10 ppm) の 22 時間/日×7 日間反復吸入曝露の際の遺伝子発現変動解析の結果、成熟期マウス肺と肝において、サイトカインシグナルを介する炎症、また概日リズムの乱れ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 IL1β の肺における発現増加が含まれていた (肝では有意な発現変動は認められなかった)。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・肺の関連解析においても、IL1β 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。また概日リズム関連遺伝子の発現変動は、先行研究における肝・肺においても認められている。この概日リズムの乱れを誘発する因子は現時点では不明であり、また有害事象との直接的な関連は不明であるが潜在的に、生理現象 (睡眠、摂食、細胞の分裂・再生、ホルモン分泌など) における体内リズムの変調によるなんらかの異常が誘発される可能性



が示唆された。

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 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、IEG 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する。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。

今年度（令和 3 年度）、キシレン（0、2、7 及び 20 ppm）の 22 時間/日 $\times$ 7 日間反復吸入曝露の際の遺伝子発現変動解析の結果、成熟期マウス肺において、酸化的ストレスシグナル及び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。先行研究において、極低濃度のキシレン（0.2、0.7、2.0 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。また、この際、タンパクのユビキチン化や折りたたみ不全タンパク質の産生が更新し、小胞体ストレスが誘発されることも示唆されたため、強い細胞障害性が懸念された。分子シャペロンとして機能し、タンパク質が折り

たたみ不全とならないように働く、熱ショックタンパク質関連遺伝子の発現が、曝露終了 24 時間後も持続していたことは、この障害の可能性を指示するものとする。一方、肝では有害事象に関わる顕著な遺伝子発現変動は認められなかったことから、この場合の肺と肝との連関性は低いものと考えられた。なお海馬との連関性は、解析後、検討する。

## E. 結論

昨年度（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。

肺と肝において、サイトカインシグナルを介する炎症、また概日リズムの乱れを示唆する所見が得られた。

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。

今年度（令和 3 年度）は予定通り、キシレン（0、2、7 及び 20 ppm）の 22 時間/日 $\times$ 7 日間反復吸入曝露の際の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。肺において、酸化的ストレスシグナル及び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。肝では有害事象に関わる顕著な遺伝子発現変動は認められなかった。

海馬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。

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。

吸入曝露に際しては、棟・施設全体の空調設備の調整、ガス発生器の調整、ガス補集方法の条件検討や濃度測定法の予備検討など、多岐にわたる条件検討を同時並行的に進めることが必須であるが、こうした予備検討の、より円滑で効率的な遂行が、今後の課題となった。

令和4年度(来年度)は計画に則り、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)

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. *Development*. 2021 Oct 1;148(19): Epub 2021 Oct 4. [DOI: 10.1242/dev.193664].

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci*. 2021 Jun;112(6):2185-2198. Epub 2021 May 2. [DOI: 10.1111/cas.14873]

### 2. 学会発表 (抜粋)

Jun Kanno, Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. ASIATOX-IX, (2021.10.22)、Virtual、Oral

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima, Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress, (2021.9.29)、Oral

菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純、ナノマテリアルの吸入曝露による肺免疫応答と線維化の分子機構。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、「子供の毒性学:脳の発達を中心に」-イントロダクション-。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価-発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に-。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純: PPAR $\alpha$  リガンドの比較毒性オミクス。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, S. KITAJIMA, Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15)、Virtual、Oral

## 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