

令和3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。

令和3年度（今年度）は予定通り、キシレン（0、20 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、不安の亢進（オープンフィールド試験の中央滞在時間の減少）及び、空間-連想記憶の低下（学習記憶異常）が、曝露終了日の時点では認められなかったが、曝露3日後では有意に認められ、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。

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（遅延性影響の検討）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の配慮を十分行い、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 3 年度（今年度）は予定通り、キシレン（0、20 ppm）（20 ppm は以前の指針値の 100 倍程度、現在の指針値の 400 倍程度の濃度）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（キシレン濃度：0、2、7 及び 20 ppm）において、いずれの曝露群においても体重減少が有意に認められなかったため、当情動認知行動解析では高濃度曝露群の濃度である 20 ppm 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）では、不安の亢進（情動行動試験の一つの明暗往来試験における明室滞在時間の減少）が有意ではないが、その傾向が認められた（図 3 として、明暗往来試験の結果を示す）。他方、曝露 3 日後では、不安の亢進（情動行動試験の一つのオープンフィールド試験の中央滞在時間の減少）及び、空間-連想記憶の有意な低下（学習記憶異常）が有意に認められ（図 4 及び図 5）、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キシレンの吸入曝露の場合、曝露終了日の時点では、空間-連想記憶及び音-連想記憶の低下が有意に認められており、また曝露 3 日後ではこれらの変化は回復し、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、マウスが興奮あるいは緊張するのか（実際、不安の亢進傾向は認められている）、こうした記憶の低下は誘発されず、むしろ、曝露終了後、キシレン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、キシレン（0、20 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、不安の亢進（オープンフィールド試験の中央滞在時間の減少）及び、空間-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 日後では有意に認められ、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 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。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Sakai K, Hiradate Y, Hara K, [Tanemura K](#). Potential of sperm small non-coding RNAs as biomarkers of testicular toxicity in a doxorubicin-induced mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Oct 22; 28: 101160. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101160. PMID: 34729424; PMCID: PMC8545667.

Kawahara T, Kanouchi M, Naniwa Y, Koyago M, Numabe T, Mizutani K, [Tanemura K](#), Hara K. Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle. *Anim Sci J*. 2021 Dec;92(1):e13572. doi: 10.1111/asj.13572. PMID: 34254411; PMCID: PMC8365669.

Umezu K, Kurata S, Hara K, [Tanemura K](#). Caffeine induces sperm detachment from sperm head-to-head agglutination in bull. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jul 12; 562: 105-111. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.060. Epub 2021 May 26. PMID: 34049203.

Ogasawara S, Ezaki M, Ishida R, Sueyoshi K, Saito S, Hiradate Y, Kudo T, Obara M, Kojima S, Uozumi N, [Tanemura K](#), Hayakawa T. Rice amino acid transporter-like 6 (OsATL6) is involved in amino acid homeostasis by modulating the vacuolar storage of glutamine in roots. *Plant J*. 2021 Sep;107(6):1616-1630. doi: 10.1111/tpj.15403. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34216173.

Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K,

Tanemura K. Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 18; 558: 175-182. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.080. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33932777.

Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K. Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation. *J Toxicol Sci.* 2021;46(2):83-90. doi: 10.2131/jts.46.83. PMID: 33536392.

Makino Y, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor ϵ Subunit (AChRe) in Mouse Sperm. *Biology (Basel).* 2021 Jan 11; 10(1): 46. doi: 10.3390/biology10010046. PMID: 33440720; PMCID: PMC7826850.

2. 学会発表

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)

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. 9)

富永貴志、種村 健太郎、富永洋子、膜電位感受性色素 (VSD) による全神経回路活動計測の開発：海馬スライス標本へのビスフェ

ノール A 関連物質の急性投与、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021. 7. 9)

佐々木 貴熙、長谷川 彩乃、酒井 和哉、平舘 裕希、原 健士朗、Jahidul ISLAM、野地 智法、種村健太郎、アセフェートの発生-発達期慢性ばく露による成熟後のマウス行動影響と腸内細菌叢の解析第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021. 7. 9)

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

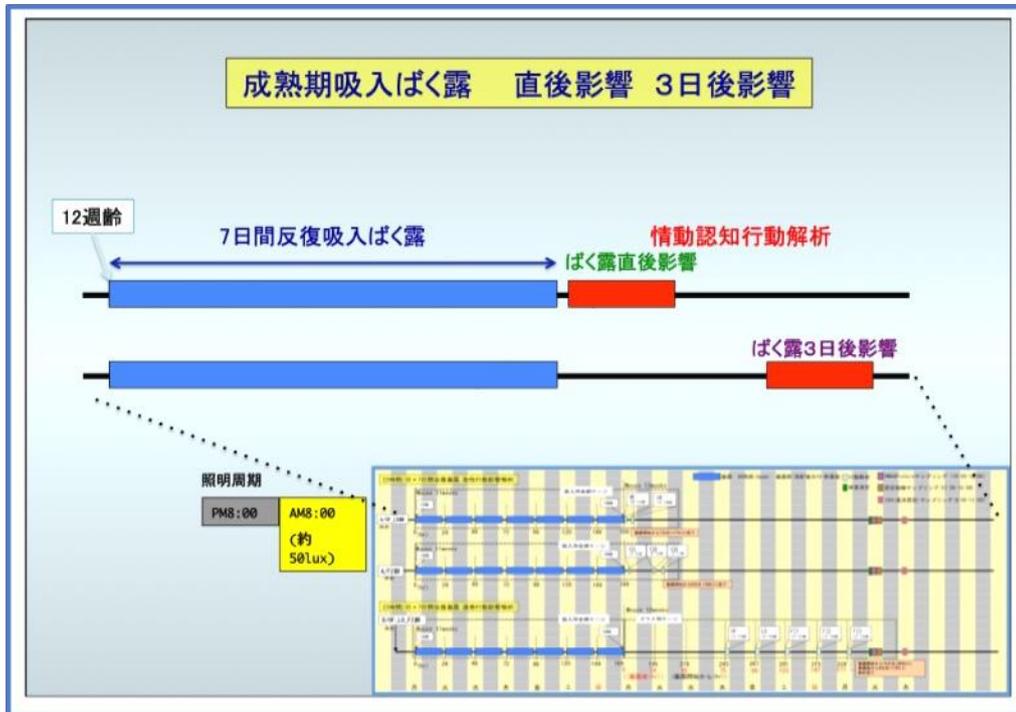


図2

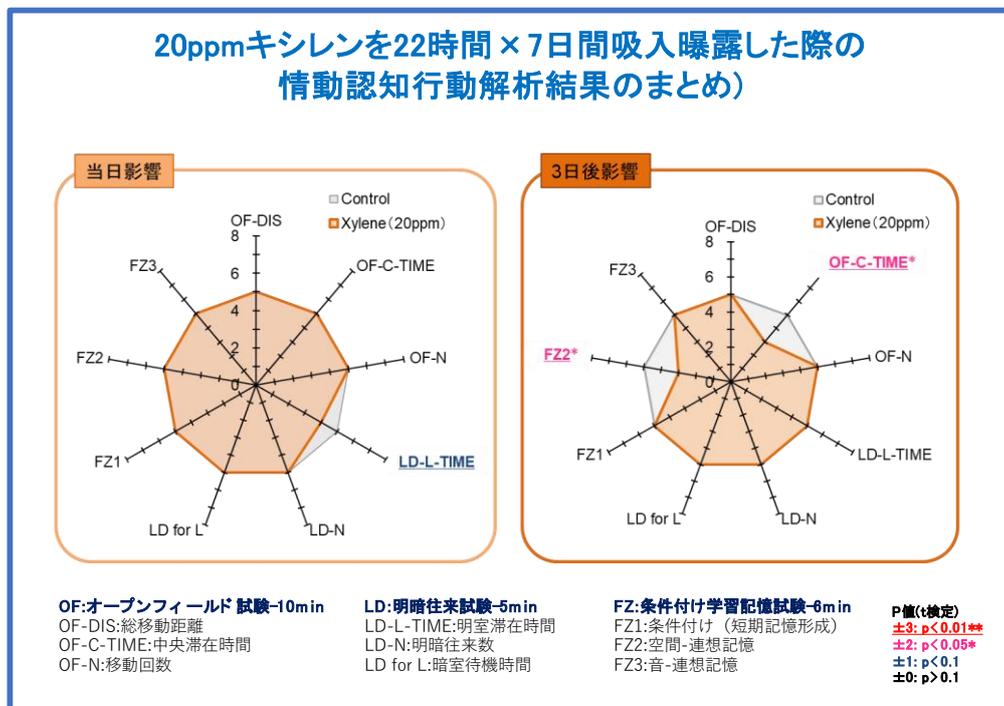


図 3

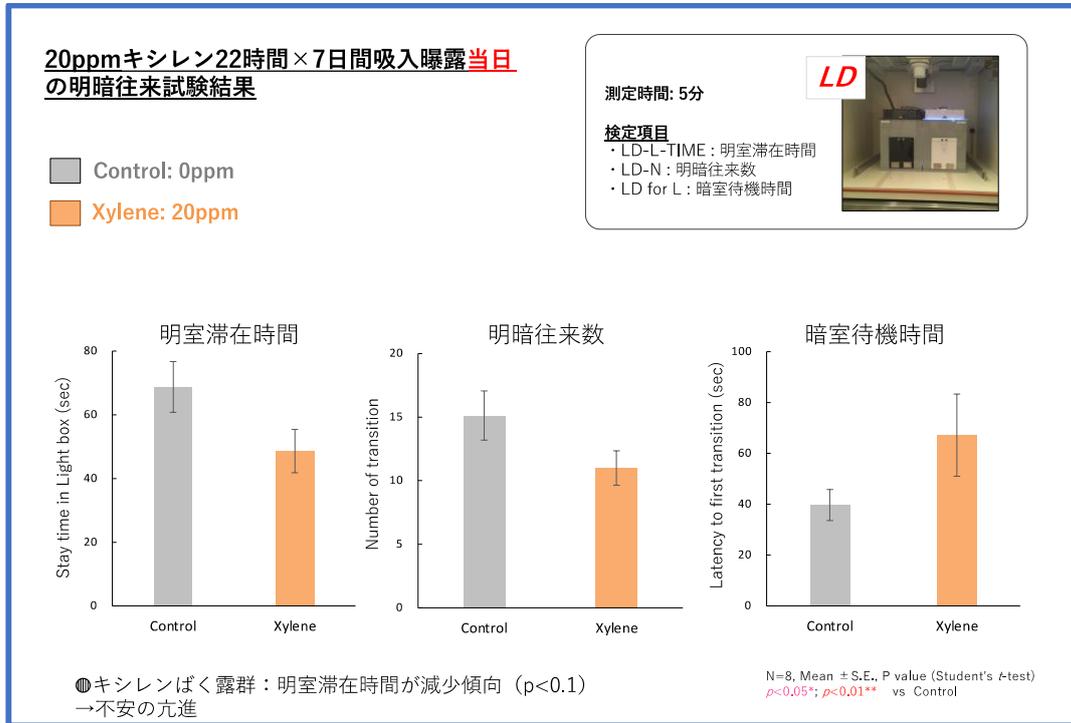


図 4

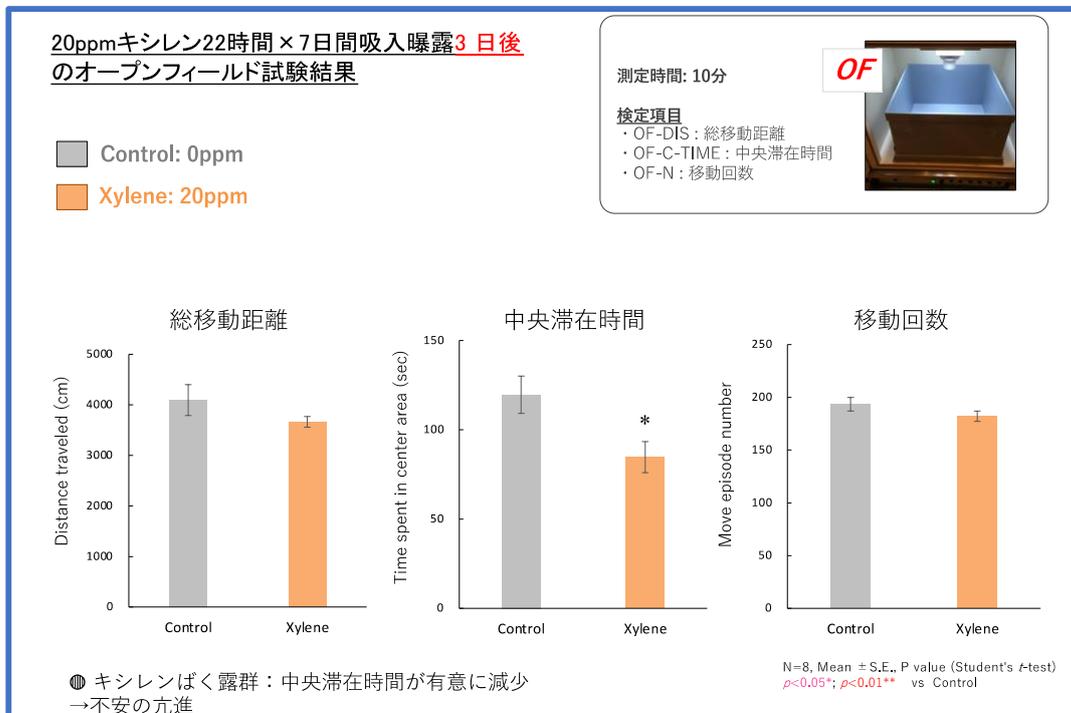


図 5

