

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3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に関する研究（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ないために、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日間の短期小規模動物実験を行い、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（昨年度）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、測定値の平均は、それぞれ0.99、3.11、9.84と、目標濃度に対し98～104%の濃度で実施できた。網羅的な遺伝子発現変動を解析した結果、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、海馬神経活動の活性化を示唆する所見が得られた。情動認知行動解析では、ホルムアルデヒド（0、3ppm）（3ppmは指針値の30倍程度の濃度）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は3.00ppm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。

令和3年度（今年度）は予定通り、キシレンについて、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2、7及び20ppmに対し、測定値の平均はそれぞれ2.29、7.25、20.07と、目標濃度に対し100～115%の濃度で実施できた。網羅的な遺伝子発現変動を解析した結果、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。情動認知行動解析では、キシレン（0、20ppm）（20ppmは以前の指針値の100倍程度の濃度）について、22時間/日×7日間反復吸入曝露試験を実施し、吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標曝露濃度20ppmに対し測定値の平均は21.83ppmと、目標濃度に対し109.2%の濃度で実施できた。情動認知行動解析の結果、不安の亢進及び空間-連想記憶の低下が、曝露直後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。今後、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じ、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・高度化への活用にとり寄与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・高度化への活用寄予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、多臓器関連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（昨年度）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、令和 3 年度（今年度）は予定通り、ヒトに対する発がん性が分類できない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「キシレン」（通し番号 125 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。被験物質は、ホルムアルデヒド（formaldehyde；分子量：30.03、CAS No.：50-00-0）の場合は、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、富士フィルム和光純薬（株）を使用した。キシレン（xylene）；分子量：106.17、CAS No.：1330-20-7）の場合は、試薬としてキシレン（カタログ番号：244-00081、特級、80%（o-, m-, p-キシレンの含量）、ロット番号：DLJ5960、DLF3233（12/15～12/20）、富士フィルム和光純薬（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（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 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。

<ガスの発生方法と濃度測定方法>

ホルムアルデヒドの場合：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。なお、HPLC の分析条件に関して、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 SUPELCOSIL(TM) LC-18 (4.6 mm ϕ \times 250 mm、粒径: 5 μ m Supelco 社製)、検出波長は UV 360 nm、試料注入量は 1 μ L 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。

キシレンの場合：ガス発生方法は、先行研究での検討を基に、キシレンをバブリングし気化させる方法によりおこなった。

キシレン濃度は、捕集管（チャコールチューブ・ジャンボ、カタログ番号：080150-0532、柴田科学（株））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。測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ（MP-Σ100H、柴田科学株式会社製）を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引した。

捕集管に吸着したキシレンの前処理及び分析方法は以下の通りとした。捕集管の活性炭（一層及び二層）を 10mL 容密栓付き遮光ガラス試験管にそれぞれ取り出し、二硫化炭素（富士フィルム和光純薬株式会社製、作業環境測定用）5mL を正確に加え、蓋をしたのち、およそ 15 分に 1 回上下に振とうしながら 2 時間静置し、得られた上清を抽出液とした。各活性炭から得られた抽出液は、検量線の範囲に入るように二硫化炭素で適宜希釈した。次に抽出液又は希釈した溶液 2mL を 10mL 容密栓付き遮光ガラス試験管に採り、内部標準溶液（トルエン- d_8 の二硫化炭素溶液、7.5 μ L/mL）50 μ L をマイクロシリンジで添加し、これを測定溶液とした。

検量線用の標準溶液は、*o*-キシレン（純度 98%以上、東京化成工業株式会社製）、*m*-キシレン（純度 99%以上、同社製）および *p*-キシレン（純度 99%以上、同社製）を混合し、二硫化炭素で適宜希釈して 0.1~100 μ g/mL の混合溶液として調製した。これらの溶液 2mL に内部標準溶液 50 μ L を添加したものを検量線用の標準測定溶液とした。

測定溶液および標準測定溶液を測定用バイアル（0.2mL MS-SPEC Sc-Vial, Thermo Fisher Scientific 社製）に移し、キャップ（PTFE/シリコーン、スリット入り、同社製）をしてガスクロマトグラフ（7890A GC&5975C MSD 又は 6890N GC&5975 MSD、い

ずも Agilent Technologies 社製）を用いて、以下の分析条件により測定した。

カラム：DB-1MS（60m \times 0.25mm、膜厚 1 μ m、Agilent Technologies 社製）

オープン温度：40 $^{\circ}$ C-10 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C（2分保持）

注入口温度：200 $^{\circ}$ C

注入方式：スプリット

スプリット比：20：1

キャリアーガス：He

流速：1.2 mL/min（定流量）

定量イオン（*m/z*）：91（キシレン 3 種）、98（トルエン- d_8 ）

得られた各キシレン及びトルエン- d_8 の内標比から検量線を作成し定量した。ただし、本分析条件では *m*-および *p*-キシレンの保持時間が重複し分離定量することができないため、これらは混合比 1:1 の混合物として定量した。捕集管中のキシレン濃度は、これらの定量値および *o*-キシレンの定量値を合算した。さらにこの定量値からチャンバー内のキシレン濃度を計算して求めた。

この測定部分は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部の六鹿元雄室長、阿部裕主任研究官及び、片岡洋平主任研究官の協力を仰いだ。

なお先行研究とは、測定法と測定機器が異なったため、ガス発生 of 予備検討に時間を要してしまった。

海馬、肺、肝の遺伝子発現データの取得と

関連解析：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]及び幼若期[2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程、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＞

ホルムアルデヒドの場合：令和2年度（昨年度）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）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10ppm曝露群で体重減少が有意に認められた（対照群が27.0±0.7gに対して、20.6±1.8g）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±0.6gに対して、23.6±1.0g）。また解剖時、肺の腫大（+）が10ppm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。

キシレンの場合：令和3年度（今年度）は予定通りキシレンについて、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）を実施した。吸入チャンバー内の被験物質濃度は、目標曝露濃度2、7及び20ppmに対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ2.29±0.64（1.41～2.98ppm）、7.25±0.20（6.97～7.53ppm）、20.07±2.62（17.69～23.30ppm）と、いずれの場合も、目標濃度に対しそれぞれ114.5、103.6及び100.4%と、100～115%の濃度で実施できた。なお、吸入チャンバーが存在する室内のキシレン濃度は0.0005ppmであった。

いずれの曝露群でも体重変化は有意には認められなかった。解剖時、肺の腫大（+）が、20ppm曝露群の曝露22時間後と、7及び20ppm曝露群の曝露70、166、そして曝露休止24時間目にあたる190時間後にも認められた。

＜情動認知行動解析のための吸入曝露実験＞

ホルムアルデヒドの場合：令和2年度（昨年度）は予定通りホルムアルデヒド（0、3ppm）（3ppmは指針値の30倍程度の濃度）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3ppmに対し、測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、3.00±0.21ppm（2.69～3.28ppm）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、10ppm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3ppmの濃度を採用した。

キシレンの場合：令和3年度（今年度）は予定通りキシレン（0、20ppm）（20ppm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、成熟期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20 ppmに対し、測定値の平均±標準偏差(最低～最高値)は、 21.83 ± 2.90 (25.29～18.71 ppm)と、目標濃度に対し109.2%の濃度で実施できた。コントロール曝露群におけるキシレンの濃度は 0.00 ± 0.00 ppmであった。なお、吸入チャンバーが存在する室内のキシレン濃度は 0.0005 ppmであった。

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):

ホルムアルデヒドの場合:令和2年度(昨年度)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。

肺と肝での解析の結果、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。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。

なお、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ところ、現時点での解析結果からは、BBBの障害を強く示唆するデータは得られなかった。

キシレンの場合:令和3年度(今年度)は予定通りキシレン(0、2、7、20 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時間後にあたる)])させ、得られた肺、肝、脳サンプルについて、Percellome手法を適用した網羅的遺伝子発現につき解析した。

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。

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):

ホルムアルデヒドの場合:令和2年度(昨年度)は予定通り、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。

キシレンの場合：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、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。

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、トキシコゲノミクスならびに情動認知行動解析を実施した。

ホルムアルデヒドの場合：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IL1 β 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。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

変動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 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、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考えられる。

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。

キシレンの場合：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×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。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考えられる。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。

他方、海馬に対する影響を検討するため、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成熟期マウスに実施し、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 (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。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。今後検討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。

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。

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)

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata K, Kitajima S: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam Toxicol Sci* 2021; 8: 169-175.

doi.org/10.2131/fts.8.169

Igarashi T, Yasuhiko Y, Ono R, Tachihara E, Uchiyama M, Takagi A, Takahashi Y, Kuwagata M, Kitajima S: Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam Toxicol Sci.* 2021;8(5):161-167.

doi: org/10.2131/fts.8.161

Kuwagata M, Hasegawa, T, Takashima H, Shimizu M, Kitajima S, Yamazaki H: Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci* 2021;46(12):553-560.

doi:10.2131/jts.46.553.

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki KI, Kitajima S: A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation. *Fundam Toxicol Sci.* 2022; 9: 17-21.

doi.org/10.2131/fts.9.17

Kanno S, Okubo Y, Kageyama T, Yan L, Kitajima S, Fukuda J: Establishment of a Developmental Toxicity Assay based on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption. *iScience.* 2022, 25, 103770.

doi:10.1016/j.isci.2022.103770

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].

Hoyo 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]

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.

2. 学会発表 (抜粋)

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S: Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15)

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48回日本毒性学会学術年会 (2021.6.30)

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)

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 α 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) J. Kanno, K. 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、「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

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)

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)

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)

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)

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)

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S: Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress

(2021. 9. 29)

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

Taquahashi Y, Yamamoto E, Kuwagata M, Saito H and Kitajima S: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging.

The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS (2021.11.2)

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