

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

研究課題名=内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究

主任研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部長

研究要旨

内分泌かく乱化学物質問題を包括的に把握するために、本研究は、高次生命系としての神経・内分泌・免疫それぞれのネットワークに対する諸影響を横軸に置き、発生・生殖と時間との両軸から検討した。また、以上の各要素相互の連携を司るシグナル伝達系を解析する必要性から、①核内レセプターとその共役転写因子、②エストロジェン受容体とセカンドメッセンジャーの相互作用、③ステロイド代謝活性機構をも併せて検討した。これらの研究過程で集積される科学情報および研究結果の統合（データベース化）と成果の出版をすすめている。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名

垣塚 彰 大阪バイオサイエンス研究所
部長

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
室長

広川勝昱 東京医科歯科大学医学部
教授

井口泰泉 横浜市立大学理学部 教授

鈴木勝士 日本獣医畜産大学 教授

西原 力 大阪大学大学院・薬学系研究
科 教授

藤本成明 広島大学原爆放射能医学研
究所 助教授

笹野公伸 東北大学大学院・医学系研究
科 教授

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の標的には、いわゆる内分泌臓器（下垂体、甲状腺、副腎、卵巣、精巣など）およびそれらホルモンの支配下にある諸臓器（乳腺、子宮、前立腺など）があげられ、問題の中心を占めている。あわせて、高次系生命維持機構としての神経・内分泌・免疫ネットワーク機構は、ホルモンを含む共通のシグナル分子種を用いて相互に情報交換を行って、生体のホメオスターシスの維持に役割を果している。このため、内分泌かく乱化学物質がいわゆる内分泌臓器のみならず、神経系や免疫系を標的として、ホメオスターシスに影響を及ぼす可能性、ひいては、全身の諸臓器を標的とし得る可能性を考慮しなければなら

ない。また、内分泌かく乱化学物質をめぐる window 問題（胎生期、発達期における高感受期）など、成熟した個体での作用と大きく異なる可能性が指摘されており、この問題に関しては極めて基礎的な発生生殖機構研究が重要であることが示唆されている。加えて、内分泌かく乱化学物質の作用は、核内レセプターを介しており、転写の共役因子等する多種多様なシグナル伝達共役分子との相互作用によって大きく修飾されることが知られている。

本研究では、内分泌かく乱化学物質に関する研究を他の試験研究分野で行われている分析や研究とは異なり、高次生命系の発生・維持機構とそれに関わる組織特異的機能制御における核内レセプター分子の発現と機能修飾の分子メカニズムを多角的かつ系統的に解明することを目的としている。そのため、1) 神経、2) 免疫、3) 発生・生殖、4) 核内レセプター、5) ステロイド代謝活性機構各分野について 8 つの研究テーマと内分泌かく乱化学物質に関する文献収集・評価課題を実施した。

高次生命系を標的として捉えた場合の内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響のメカニズムの解明は、内分泌かく乱化学物質問題に対応する知的基盤構築に貢献するものと期待される。

B. 研究方法

研究方法は以下の通りである。

1) 高次系ネットワーク：神経 ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析（垣塚）

ポリグルタミンの発現に伴って、同調的に発現するテトラサイクリン等の薬剤によるコントロールシステムを導入した神経細胞株の樹立を試みた。そして、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的な解析を行った。

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響（菅野）

胎生10日目の雌マウスの胚の頭部を採取し、トリプシン処理後に壁接着性の弱い成分を繰り返し選択継代し、初代神経幹細胞培養系の樹立を試みた。また、エストロゲンレセプターaの各エクソンを個別に認識するPCRプライマーを設計し、PCRの条件検討を行った。先手、ヒトエストロゲンレセプターaに対するPCRプライマーを作成し、ヒト乳癌細胞MCF-7細胞から抽出したtRNAを用いて、RT-PCRの条件検討を行った。次に、これをもとに、マウスエストロゲンレセプターaに対するPCRプライマーを作成し、マウスの子宮のtRNAを材料として、マウスエストロゲンレセプターaを検出するRT-PCRの条件検討を行い、ポリグルタミン発現系をモデル化する可能性についての検討をすすめた。

2) 高次系ネットワーク：免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (広川)

Diethylstilbsterol (DES) 用いて、低用量 (3 mg/kg) と高用量 (15 mg/kg) を雄マウスの腹腔内に投与し、胸腺、脾臓の重量およびT細胞、B細胞の数の変化を検討した。

3) 高次系ネットワーク：生殖

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (井口)

妊娠 10 日目から 9 日間、2 μ g のジェチルスチルベストロール (DES) および 3 mg のビスフェノール-A (BA) を母親マウスにそれぞれ投与し、妊娠 19 日目の胎仔生殖器官を組織学的に検討することにより、出生直後の DES 処理による、膈上皮での不可逆的増殖について解析した。また、細胞増殖制御異常と細胞死 (アポトーシス) の異常についても観察した

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究 (鈴木)

硫酸エストロン 0.01ng/ μ l/g を鶏受精卵に、気室内と卵黄内経路で投与し、48 時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較検討して、試験法としての確立を試みた。

4) 核内レセプター

内分泌かく乱物質のホルモンレセプターを介する作用発現機構に関する研

究 (西原)

酵母Two-hybrid法を用い、コアクチベーターのうちCBP、P300、SRC1、RIP140、TIF1、TIF2についてER alphaとのエストロゲン依存的な相互作用を調べ、次に、エストロゲン様活性を持つことが知られている既知の化学物質について検討した。ER betaについても同様のシステムを構築し、一部の化学物質についてはER alphaとER betaの差異について検討した。

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本)

ヒト乳癌細胞、ヒト前立腺癌細胞等に、レポーター遺伝子、受容体コ・ファクター発現遺伝子のトランスフェクションを行い細胞株を確立した。そして、ER alpha 発現ベクターとレポーター遺伝子を共導入した培養細胞で、ERE 部位と AP-1 部位を介するエストロゲン応答を比較検討した。

5) ステロイド代謝活性機構

ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究 (笹野)

17 β -HSD2がヒト臍帯静脈におけるE2の濃度が母体血中との解離に関係していると考え、種々の妊娠週数の胎盤を用いて17 β -HSD 1 及び2の発現を検討した。

6) 内分泌かく乱化学物質に関する文

文献収集評価に関する研究（総括班）
研究成果のデータベース化と、社会への還元を本班会議で得られた成果をモノグラフとして出版する事により具体化する。平成10～12年度は、各班員からの結果の集積とコンピュータによるデータベース化を行い、最終報告を待って、科学研究モノグラフの刊行を行なう。

C. 研究結果

1) 神経

ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析（垣塚）

培養神経細胞 PC12 を用い、ポリグルタミンをコードする CAG リピートをテトラサイクリンで発現誘導可能な培養細胞株を樹立する事に成功した。ポリグルタミンは、発現誘導後核内凝集体形成し、それに一致して SEK1 というキナーゼが活性化されることが見出された。今後、内分泌かく乱化合物の神経毒性の作用点として、このキナーゼカスケードの重要性が考えられた。

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響（菅野）

得られた細胞は神経幹細胞集団いわゆるニューロン・ボールと呼ばれるもので、プラスチックシャーレで培養7日目には、ニューロン様に分化したのものや、グリア細胞様に分化した細胞がみられた。また、ヒトエストロジェンレセプタ

ー a とマウスエストロジェンレセプター a の各エクソンを検出する RT-PCR 法を確立した。この系を用いて、マウス子宮には、エストロジェンレセプターのスプライシングバリエーションが存在することを明らかにした。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究（広川）

若齢の雄と雌マウスを用い、低用量と高用量を5日間連続投与し、最終投与の2日後に屠殺し検索に用いた。この場合には胸腺の明瞭な萎縮とその逆に脾臓の肥大を認め、どちらもその程度は雌の方に顕著であった。脾臓で見ると T 細胞、B 細胞共に減少し、抗 S R B C 抗体産生能の低下が認められた。しかし、NK 細胞には明瞭な数の変化はなく、活性で見ると雄では寧ろ亢進する傾向が見られた。

3) 発生・生殖

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究（井口）

ビスフェノール-A (BA) を母親マウスにそれぞれ投与し、妊娠19日目の胎仔生殖器官を組織学的に解析したところ、雌マウスでは子宮、膈の上皮の丈の高さが DES、BA 投与群ともに有意に増加し、細胞分裂率は BA 投与群のみ有意に増加していた。雄マウスでは DES 投与により潜伏精巣が発生し、精巣も小さく単位面

積当たりの精細管の数も有意に減少していることを見いだした。また、細胞増殖制御異常と細胞死 (アポトーシス) の異常について観察したところ、出産直後の DES 処理マウスの膈では、卵巢の有無に関わらず DNA の断片化が同程度に認められ、卵巢摘出による上皮細胞死は見られなかった。

初期發育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究 (鈴木)

硫酸エストロンを卵黄内に投与することにより約 20%の胚で胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常が生じた。気室内投与でも胚発生が遅延 (体節数低下) などの軽度の影響があることを見いだした。

4) 核内レセプター

内分泌かく乱物質のホルモンレセプターを介する作用発現機構に関する研究 (西原)

ER alpha の β -estradiol 依存的な相互作用は TIF2 が一番強く、次に SRC1、RIP140、TIF1 の順であり、CBP、P300 はほとんど相互作用しなかった。また、 β -estradiol の濃度を変化させてその応答を調べたところ、TIF2、SRC1、RIP140、TIF1 について 10^{-9} M から β -galactosidase 活性の上昇が認められ、 10^{-7} M で飽和し、それ以上濃度を上げて活性は変わらなかった。

既知のエストロゲン様化合物によるアッセイ系の検証: 酵母細胞内でのエストロゲンレセプターとコアクチベーターの相互作用の実験では、ER α の β -estradiol 依存的な相互作用は TIF2 が一番強く、次に SRC1、RIP140、TIF1 の順であり、CBP、P300 はほとんど相互作用しなかった。また、 β -estradiol の濃度を変化させてその応答を調べたところ、TIF2、SRC1、RIP140、TIF1 について 10^{-9} M から β -galactosidase 活性の上昇が認められ、 10^{-7} M で飽和し、それ以上濃度を上げて活性は変わらなかった。

既知のエストロゲン様化合物によるアッセイ系の検証実験では、diethylstilbestrol と estrone は β -estradiol と同等の活性を示し、ついで estriol、genistein、p-nonylphenol、DHT、bisphenol A の順でエストロゲン様活性を示した。また、他のステロイドの testosterone や β -sitosterol には 10^{-3} M まで全く応答性を示さなかった。

これらの結果は、他の方法で調べたエストロゲン様活性の強さとよく相関していた。また、コアクチベーター間での化学物質による応答性に大差は認められなかった。

ER α と ER β の差異の検討では、ER α と ER β のリガンド結合領域 GAL4DBD に繋ぎ、コアクチベーターの TIF2 との相互作用を調べる系を作製した。ER α と ER β のいずれを用いた時にも、 β -estradiol への

応答性は 10^{-9} Mからみられ、ER α とER β で本来のリガンドである β -estradiolへの結合親和性は同程度であると考えられた。それに対し、植物エストロゲンであるgenisteinで処理した時には、ER α への応答性は 10^{-7} Mからしかみられなかったのに比べ、ER β では 10^{-9} Mから応答性が見られた。同様のことが防腐剤として知られているパラベン類においても観察された。これらのことから、ER α とER β で化学物質の構造によって結合特性が違うことが推察された。

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本)

エストロゲン (E2) に応答性の増殖をするラット下垂体腫瘍株 MtT/E-2 が樹立した。この株のエストロゲン応答性の増殖について解析したところ、(1) 下垂体腫瘍遺伝子 PTTG の mRNA 発現は、ラットの正常下垂体では検出されず、MtT/E-2 細胞においてのみ発現していた。(2) E2 投与後、c-myc、cyclin D の上昇がみられたが、そのとき PTTG 発現の増加は観察されず、E2 の反応性との関わりは低いと考えられた。この細胞は下垂体組織と同様に α 型のエストロゲン受容体 (ER) を発現していた。(3) 上記により得られて細胞株は E2 様の内分泌かく乱物質に対してもよい増殖活性を示し、それ自体よいアッセイ系になると考えられた。

エストロゲン受容体を持ち生理的な

応答をしている細胞モデルとして、ヒト乳ガン細胞 MCF-7、上記 MtT/E-2 および前立腺細胞 PC-3 をとり、ERE-luc および AP-1-luc レポーターをトランスフェクトしてその ERE および AP-1 を介した応答の解析を試みた。さらに、ER α 発現ベクターを co-トランスフェクトした NIH/3T3 での解析を行った。(1) エストロゲン受容体の発現は、PC-3 で β 型が主で他は α 型がドミナントであった。(2) MtT/E-2、MCF-7 では、ERE を介した転写活性化は確認できたが、いずれの株でも

AP-1 を介した応答は観察できなかった。(3) NIH/3T3+ER の系では、E2 により ERE 応答および AP-1 応答が見られた。ER の AF-1 アゴニストであるタモキシフェンやナフォキシジンでは、AP-1 応答のみが観察された。E2 作用を持つ内分泌かく乱物質について検討した結果、ERE、AP-1 応答に有意な差はなかった。

5) ステロイド代謝活性機構

ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究 (笹野)

17β -HSD1は妊娠期間を通して全ての胎盤組織のhCG陽性のsyncytiotrophoblastsにおいてのみ認められた。これに対して 17β -HSD2は妊娠11週までの胎盤組織においてはまったく発現していなかった。妊娠12週から 17β -HSD2は絨毛の中のCD34, UEA-I陽性の血管内皮細胞で発現が認め

られはじめ、妊娠の経過と共にこの17β-HSD2陽性の血管内皮細胞の面積は増大する傾向にあった。又絨毛の中の一部の間質細胞 (interstitial or stromal cells) ではこの17β-HSD2の発現が認められた。一方臍帯の臍帯静脈では内皮細胞で17β-HSD2の発現が認められたが、臍帯動脈では発現は見られなかった。一方CD34は妊娠4週の絨毛から認められはじめた。17β-HSD1及び2の2重染色では17β-HSD1がsyncytiotrophoblastsに17β-HSD2が絨毛内の血管内皮細胞に認められ、絨毛内で異なる細胞でこれらのエストロゲン代謝酵素が発現しているのが確認された。

3) 文献収集・評価

内分泌かく乱化学物質に関する文献収集評価に関する研究 (総括班)

本班研究によりもたらされた研究結果の集積を開始した。また、国際的データベースである、GEDRI (THE GLOBAL ENDOCRINE DISRUPTOR RESEARCH INVENTORY) への対応を含めたデータベース化を開始した。これと並行して、文献集積を開始した。

D. 考察

内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズムを解明するため

1) 神経、2) 免疫、3) 発生・生殖、4) 核内レセプター、5) ステロイド代謝活性機構各分野について8つの研究

テーマについて検討し新たな知見をいくつか得た。

今後、さらに基礎的研究として、詳しく検討し、また、内分泌かく乱化学物質に関する文献収集・評価を実施することで、最終的には総合領域すなわち高次生命系の発生・維持機構とそれに関わる組織特異的機能制御における核内レセプター分子の発現と機能修飾の分子メカニズムを系統的な解明を目指したい。

E. 結論

本研究班では、内分泌かく乱化学物質問題を包括的に時間軸を考慮に入れつつ、高次生命系としての神経・内分泌・免疫ネットワークに対する影響を解析する立場から、神経、免疫、および発生・生殖について検討した。また、そのネットワークのシグナル伝達系に対する影響を解析する立場から、核内レセプターとその共役転写因子およびエストロゲン受容体とセカンドメッセンジャーとの相互作用、ステロイド代謝活性機構を検討した。加えて、これらの研究過程で集積される科学情報および研究結果の統合 (データベース化) と出版の準備に着手した。

本研究班では、内分泌かく乱化学物質のヒトの健康への影響のメカニズムを個体発生から成体での内分泌機能への影響に至るまでの広い範囲を視野に入れ、生命科学の立場から探求している。

こうした視点に立った本年度の当班に

おける研究の成果は、内分泌かく乱化学物質問題に関する 9 省庁連絡会のカバーする研究企画の中でも他にみられない特異な位置を占めており、この問題での近い将来における国際的な Scientific Assessment の際にも高い貢献をなすものと期待される。また、その学際的性格は本研究の有効性を更に際立たせるものと結論される。

1. 論文発表

Kawasaki Y, Umemura T, Saito M, Momma J, Matsushima Y, Sekiguchi H, Matsumoto M, Sakemi K, Isama K, Inoue T, Kurokawa Y, Tsuda M: Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *Toxicol Sci*, 1998, Feb;23(1):53-68

Hirabayashi Y, Matsumura T, Matsuda M, Kuramoto K, Motoyoshi K, Yoshida K, Sasaki H, Inoue T: Cell kinetics of hemopoietic colony-forming units in spleen (CFU-S) in young and old mice. *Mech Ageing Dev*, 1998, Apr 1;101(3):221-231

Sai K, Kai S, Umemura T, Tanimura A, Hasegawa R, Inoue T, Kurokawa Y: Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat

liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol*, 1998, Dec;36(12):1043-1051

Sai K, Upham BL, Kang KS, Hasegawa R, Inoue T, Trosko JE: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. *Cancer Lett*, 1998, Aug 14;130(1-2):9-17

Mitsumori K, Imazawa T, Onodera H, Takahashi M, Kitajima S, Inoue T, Kurokawa Y: Ultrastructural changes in motor endplates of the lumbrical muscles of rats induced by a microsomal Ca²⁺ ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone. *Arch Toxicol*, 1998, 72(2):115-118

Trosko JE, and Inoue T: Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells*, 1997, 15 (suppl2), 59-67.

Sasaki H, Matsuda M, Lu Y, Ikuta K, Matuyama S, Hirabayashi Y, Mitsui H, Matsumura T, Muramatsu M,

Tsukada T, Aizawa S, and Inoue T. :
A fraction unresponsive to growth
inhibition by TGF- β among the
high-proliferative potential
progenitor cells in bone marrow of
p53-deficient mice. *Leukemia*, 1997,
11, 239-244.

Nishimura Y, Hirabayashi Y,
Matuszaki Y, Musette P, Ishii A,
Nakauchi H, Inoue T., and Yonehara
S.: In vivo analysis of Fas
antigen-mediated apoptosis:
Effects of agonistic anti-mouse
Fas monoclonal antibody on thymus,
spleen, and liver. *Int Immunol* ,
1997, 19, 307-316.

Yoshida K, Inoue T., Nojima K,
Hirabayashi Y, and Sado T. : Calorie
restriction reduces the incidence of
myeloid leukemia induced by a single
whole-body radiation in C3H/He mice.
Proc Natl Acad Sci USA , 1997, 94,
2615-2619.

Inoue T., Cronkite EP, Hirabayashi Y,
Bullis JE, Mitsui H, Umemura T. :
Lifetime treatment of mice with
azidothymidine (AZT) produces
myelodysplasia. *Leukemia*, 1997, 11
(Suppl 3), 123-127.

Inoue T., Hirabayashi Y, Matsuda M,
Furuta Y, Aizawa S, Sasaki H. :
Model of MDS-like myelodysplasia
that transforms into single
lineage-hemopoietic malignancies
upon transplantation-implication
for pediatric myelodysplastic
syndrome-. *Intnt'l J Ped
Hematl/Oncol.*, 1997, 4:221-230.

Hanzawa C, Kobayashi K,
Hirabayashi Y, Inoue T., Aizawa S,
Adachi K: Hair follicle dermal
papilla cell lines from p53-
knockout mice. *J Dermatol Sci*, 1997,
15, 59-63.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Matumura
T, Mitsui H, Sasaki H, Tukada T,
Aizawa S, Yoshida K and Inoue T.: The
p53-deficient hemopoietic stem
cells: their resistance to
radiation- apoptosis, but lasted
transiently. *Leukemia*, 1997, 11
Suppl 3, 489-492.

2. 学会発表

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto,
AtsuyTakagi, Jun Kanno, and Tohru
Inoue. Molecular mechanism of
endocrine disrupting chemicals

(EDCs) (Celebrating the 10th
Anniversary of the AACR Special
Conferences in Cancer Research) H11

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

研究課題名=ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析に関する研究

分担研究者 垣塚彰 大阪バイオサイエンス研究所 部長

研究要旨

我々は、ハンチントン舞踏病やMachado-Joseph病の原因遺伝子産物に共通に含まれる伸長したポリグルタミンが神経細胞を変性・死滅させることを見いだしてきた。本研究では、このポリグルタミンを発現させる神経培養細胞・トランスジェニックマウスを作成し、その実験系を用いて、内分泌系に関わる諸物質が神経変性の増悪因子として作用する可能性を検討し、その分子機構を解析した。培養神経細胞PC12にテトラサイクリンによる制御でポリグルタミンの発現を誘導させ、同調した細胞死を引き起こす神経細胞株を樹立する事に成功した。ポリグルタミンは、発現誘導後核内凝集体形成し、それに一致してSEK1というキナーゼが活性化されることが見出され、このものの細胞死シグナルの誘導が示唆された。

A. 研究目的

我々は、これまでに、ハンチントン舞踏病 (HD) やMachado-Joseph病 (MJD) の原因遺伝子産物に共通に含まれる伸長したポリグルタミンが神経細胞を変性・死滅させることを示してきた。本研究では、ポリグルタミンを発現させる培養細胞系・トランスジェニックマウスを作成し、それらの実験系を用いて、内分泌系に関わる諸物質が神経変性の増悪因子として作用する可能性を検討し、その分子機構を解析することを目的とする。

B. 研究方法

テトラサイクリン等の薬剤で遺伝子発現をコントロール出来るシステムを利用し、同調してポリグルタミンを発現させる神経細胞株の樹立を試みる。そして、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的解析を行った。

C. 研究結果

I. ポリグルタミンを同調的に発現させる PC12 神経細胞の樹立

ラット副腎褐色細胞腫由来の神経細胞

株 PC12 に、14(Q14)及び 79(Q79) リピートからなるポリグルタミンをコードする CAG リピートをテトラサイクリンを培地から除くことで発現誘導が可能なプロモーター支配下にトランスフェクションし、その遺伝子が染色体に組み込まれた細胞株を樹立した。Q14 と Q79 には発現蛋白を検出するために共通の flag エピトープを付けた。テトラサイクリン存在下において、これらの細胞 (PC12-Q14、PC12-Q79) は親株と同じく、NGF (Nerve Growth Factor) 非添加では指数増殖を、NGF 添加後は増殖の停止と神経様細胞への分化を示した。

テトラサイクリンを培地から除くのと同時にNGFを添加すると、PC12-Q14細胞は親株のPC12と同様に増殖の停止と分化を示した。一方、PC12-Q79細胞は神経様の分化を遂げながら徐々に死んでいき、Q79を誘導後96から120時間にかけて、ほとんど全ての細胞が死に絶えた。

II. 細胞内のポリグルタミンの凝集と神経細胞死

続いて、発現誘導されたポリグルタミンを flag エピトープに対する抗体で染色し、細胞内局在について解析を行った。

Q79 は、発現誘導から 24 時間後にはほぼ細胞質内に均一的に分布し、48 時間後には細胞質に、96 時間後には細胞質と核内に大きな凝集体として観察された。このような凝集体は、PC-12-Q14 細胞では観察されなかった。上述したように 4 から 5 日後にかけて、ほとんどすべての細胞が死滅したが、その時点で細胞をつぶさに観察すると、時折、ポリグルタミンに抵抗性を示す細胞のコロニーが見いだされた。驚いたことに、その細胞では、ポリグルタミンの凝集体は細胞質のみに存在しており、核内での凝集が見受けられなかった。さらに核外移行シグナルをつないでポリグルタミンを核外に発現させた PC12 細胞は細胞死を引き起こさなかった。以上の結果は、核内で凝集したポリグルタミンにより何らかの細胞死シグナルが活性化され神経細胞死が誘導されることを示しており、ハンチントン舞踏病や Machado-Joseph 病などのポリグルタミン病発症において、ポリグルタミンの核内凝集体が極めて重要な役割を果たしていると考えられた。

III. CPP32 キヤスペーゼの解析

ここで樹立した細胞では、ポリグルタミンの発現及び細胞死が同調的に引き起こされるため、生化学的な解析に適している。まず、いわゆるアポトーシスに極めて重要と考えられているキヤスペーゼ、とくに CPP32 (caspase 3) が、この細胞死の過程でどのように活性化されるかを検討した。コントロールとしてこの細胞を Ca イオノフォア A23187 で処理すると、処理後 18 時間後に於いて顕著な CPP32 の活性を検出することが出来た。予期に反して、PC12-Q79 細胞においては CPP32 の活性は A23187 で処理した時と比べてわずかに上昇するだけであった。さらに、細胞を CPP32 の阻害剤 DEVD 等で処理しても細胞死は抑制されなかった。この場合、核の凝集は抑制されたが細胞質の分断化は阻害されず、結果として細胞は死滅した。従って、CPP32 は、核の凝集や DNA のフラグメンテーションというよう

なアポトーシスの表現型を示すには重要であるが、細胞死のコミットメントには別の分子が関与していると考えられた。

IV. SEK1-JNK キナーゼの解析

この細胞を用い他のアポトーシス関連物質の活性化をいろいろ解析したところ、SEK1-JNK のキナーゼカスケードが活性化されていることが見いだされた。SEK1、JNK はそれぞれ MAPKK、MAPK に属するキナーゼで、種々のストレスにตอบสนองして上流のキナーゼによってリン酸化を受けて活性化される。これらの活性化型キナーゼは、リン酸化されたキナーゼを特異的に認識する抗体を用いて Western blot 及び免疫染色で同定することが出来る。Q79 の発現によって JNK、SEK1 とともにその蛋白量にはそれほど変化を認めなかったが、Q79 誘導 24 時間後から SEK1 のリン酸化が、48 時間後から JNK のリン酸化が検出された。この結果から、この系においても SEK1-JNK のキナーゼカスケードが順次活性化されていると考えられた。もちろん、このような SEK1-JNK の活性化は PC12-Q14 細胞では認められ無かった。

V. 核内ポリグルタミンの凝集部位での SEK1 の活性化

続いて、免疫組織染色法をもちいて SEK1 がどこで活性化を受けているかを検討した。先に述べたように、PC12-Q79 細胞では、Q79 発現 24 時間後では、ほとんどの細胞で Q79 は、細胞質にとどまっている。解析の結果、そのような細胞では、活性化された SEK1 は検出されなかった。ところが、頻度は低いがいくつかの細胞で Q79 が核内に凝集体を作りはじめている細胞が観察され、そのような細胞の核内で、活性化された SEK1 が検出された。さらに、Q79 発現 72 時間後では、ほとんど全ての細胞が細胞質と核内に大きなポリグルタミンの凝集体を有していたが、SEK1 は核内のポリグルタミンの凝集体と一致した場所でのみ活性化を受けていることが見いだされた。共焦点顕微鏡での解析では、観察した全ての細胞断面で核内のポリグルタミンの凝集部位に一致し

て活性型 SEK1 が同定された。また、同じ場所で JNK の標的蛋白質の一つである c-Jun が活性化を受けていることが見いだされた。

VI. ドミナント・ネガティブ SEK1 での細胞死の阻害

以上の結果は、核内でのポリグルタミンの凝集が、SEK1 を活性化して細胞死シグナルを作り出しているとの考えを導き出させる。したがって、続いての実験として、実際に SEK1 の活性化が細胞死に繋がっているかどうかを解析した。

この実験では、SEK1 の機能をブロックする変異体（ドミナントネガティブ変異体）を発現させ、その結果細胞死が抑制されるかどうかの検討をおこなった。ドミナントネガティブ SEK1 (DN-SEK1) を発現した細胞が判別出来るように、DN-SEK1 は GFP (green fluorescent protein) の C-末端部位に融合した形 (GFP-DN-SEK1) で PC12-Q79 細胞に発現させた。

コントロールの GFP の発現ベクターのトランスフェクションでは、Q79 誘導 96 時間後で GFP ポジティブな細胞のおおよそ 70% の細胞がアポトーシスに特徴的な形態をしめした。一方、GFP-DN-SEK1 発現ベクターのトランスフェクションでは、GFP ポジティブな細胞の 80% 以上の細胞が健康な形態をとっていた。また、これらの健康にみえる GFP-DN-SEK1 を発現した細胞では c-Jun の活性化は観察されず、実際に SEK1-JNK のカスケードがブロックされていると考えられた。さらに、核外移行シグナルをつないで核外に発現させた DN-SEK1 では、このような Q79 による細胞死の阻害効果が認められなかった。以上の結果を総合して、我々は、核内で凝集したポリグルタミンが SEK1 を活性化して、神経細胞の細胞死を引き起こすと結論した。

D. 考察

本年度の研究では、培養神経細胞を用いたポリグルタミン病のモデル系の構築に

成功し、ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死を分子レベルで解析する見通しがたってきた。平成 11 年度には、ポリグルタミンが引き起こす細胞死の分子機構をより詳細に解析し、SEK1 が活性化される分子機構やそれがどのように CPP32 の活性化に繋がって行くかというような点を明らかにしていく。加えて、内分泌かく乱物質がこのような神経の変性過程に関わるか否か、また、関わりとすればどのような物質が如何様に関わるかを解析していく。さらに、現在進行中のモデル動物を作り上げる計画を押し進め、将来 *in vivo* の実験を行う上で準備を進めていく。

E. 結論

培養神経細胞 PC12 にポリグルタミンの発現を誘導させ、同調した細胞死を引き起こす神経細胞株を樹立する事に成功した。ポリグルタミンは、発現誘導後核内凝集体形成し、それに一致して SEK1 というキナーゼが活性化されることが見出された。今後、内分泌かく乱化合物の神経毒性の作用点として、このキナーゼカスケードの重要性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sanchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* Mar;22(3):623-33 (1999)
2. Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, A., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Takeda, K., Ichijo, H., & Kakizuka, A. Nuclearly accumulated polyglutamine activates SEK1 and induces cell death in neuronal PC12 cells. *in revision* (1999).
3. Ogasawara, Y., Hanazono, Y., Kodaira, H., Urabe, M., Mano, H.,

- Kakizuka, A., Kume, A., & Ozawa, K. Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Gene Ther. Mol. Biol.* 3: in press (1998).
4. Kakizuka, A. Protein Precipitation: A common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends in Genetics* 14, 396-402 (1998).
5. Imaizumi, M., Suzuki, H., Yoshinari, M., Sato, A., Saito, T., Sugawara, A., Tsuchiya, S., Hatae, Y., Fujimoto, T., Kakizuka, A., Konno, T., Iinuma, K. Mutations in the E-domain of RAR alpha portion of the PML/RAR alpha chimeric gene may confer clinical resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *BLOOD* 92, 374-382 (1998).
6. Kokubun, M., Kume, A., Urabe, M., Mano, H., Okubo, M., Kasukawa, R., Kakizuka, A., & Ozawa, K. Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production by genetically engineered fibroblasts. *Gene Therapy* 5, 923-929 (1998).
7. Kodaira, H., Kume, A., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kitano, K., Kakizuka, A., & Ozawa, K. Fas and Mutant estrogen receptor chimeric gene: A novel suicide vector for tamoxifen-inducible apoptosis. *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 741-747 (1998).
8. Segawa, T., Takebayashi, H., Kakehi, Y., Yoshida, O., Narumiya, S. & Kakizuka, A. Prostate-specific amplification of expanded polyglutamine expression: A novel approach for cancer gene therapy. *Cancer Res.* 58, 2282-2287 (1998)
9. Yamaguchi, M., Nakamoto, M., Honda, H., Nakagawa, T., Fujita, H., Nakamura, T., Hirai, H., Narumiya, S., & Kakizuka, A. Retardation of skeletal development and cervical abnormalities in transgenic mice expressing a dominant-negative retinoic acid receptor in chondrogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7491-7496 (1998)
10. Nakamoto, M., Ikeda, H., & Kakizuka, A. Genetic and Molecular Studies of Machado-Joseph Disease. In *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases.* eds Wells, R.D. and Warren, S.T. (Academic Press, San Diego), pp283-297 (1998).
11. Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Margolis, R.L., Trifiro, M.A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G.S., Propp, S.S., Bromm, M., Rowland, K.J., Zhang, T., Rasper, D., Roy, S., Thornberry, L., Pinsky, L., Kakizuka, A., Ross, C.A., Nicholson, D.W., Bredesen, D.E., and Hayden, M.R. Caspase Cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 273, 9158-9167 (1998).

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部 室長

研究要旨

マウス初代神経幹細胞培養系を神経細胞分化のモデル系として確立するため、マウス神経幹細胞の取得法について検討し、神経幹細胞集団ニューラルボール法（友岡ら、1991年）を採用した。また、エストロゲンレセプターのスプライシングバリエントを検出する RT-PCR 法を確立した。この過程でマウスエストロゲンレセプターにヒトエストロゲンレセプターと同様のスプライシングバリエントが存在することを未報告のもの発見も含めて確認した。このものが、神経細胞の生理的分化、ひいては異常な分化の検出の指標となる可能性についてその足がかりを得た。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の生物影響として最も危惧されている問題は、その生殖及び胎児への影響である。しかし、内分泌かく乱化学物質のヒトに対するこのような影響は、科学的な作用メカニズムが解明されなければ、予想することも困難である。我々は、内分泌かく乱化学物質の影響のうちで、胎生期のある特定の時期にのみエストロゲンに対し高感受性を示す現象「estrogen window hypothesis」に着目した。神経幹細胞実験系における神経細胞の分化を指標とすることにより、これを「estrogen window hypothesis」のモデル実験系として、発生、分化におけるエストロゲン及び内分泌かく乱

化学物質の影響とその作用機構を明らかにしようとするのが本研究の目的である。

B. 研究方法

高次生命系としての神経系に対する内分泌かく乱化学物質の影響のうち、本研究では胎生期における神経発生と分化に、特に着目した。これは、胎生期の脳は、血液脳関門がまだ未発達の時期にあり、母体経由で容易に内分泌かく乱化学物質の影響を受けることが懸念されているためである。

神経分化のモデル系としては、マウス神経幹細胞培養系を用いた。現在、神経幹細胞取得技術は、徐々に確立されつつある状態であるが、複数の方法が報告さ

れている。そこで、マウス神経幹細胞の取得法について、どれが適当であるか検討した。この中から本研究では、神経管類似の球形の細胞塊いわゆる神経幹細胞集団としてのニューラルボール系について検討した。この系は、単細胞培養のみならず、神経管類似の構築の中での増殖分化が検討できる系として、分化指標に形態変化を用いることが出来る可能性を本研究では重視した。

また、神経発生、分化における内分泌かく乱化学物質の影響の検討として、エストロゲンレセプターの発現、特にそのスプライシングバリエーションに着目した。本研究では、まず、エストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションを検出する RT-PCR 法の確立を試みた。最初に、癌研究で知見の多いヒトエストロゲンレセプターバリエーションに対してプライマーの設計、PCR の条件検討を行った。それを基礎として、マウスエストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションを検出する RT-PCR 法を検討した。

C. 研究結果

1. 初代神経幹細胞培養系の樹立法の検討

胎生 10.5~11.5 日マウス胎仔の脳組織より得られた細胞は神経幹細胞集団いわゆるニューラルボールと呼ばれるもので、プラスチックシャーレで培養 7 日目には、ニューロン様に分化したものや、グリア細胞様に分化した細胞がみられた。

今回は実験法に関する予備的な実験であり、今後は、分化した細胞が、ニューロン細胞やグリア細胞であるか、特異的マーカーを使って確認する。また、今後神経幹細胞特異的マーカーを用いたセルソーティングにより、神経幹細胞を分離する方法も検討する予定である。

2. RT-PCR 法を用いたエストロゲンレセプター検出系の確立

ヒトエストロゲンレセプター α の exon2, exon3, exon4, exon5, exon6, exon7 の各エクソンを個別に検出できる RT-PCR 法を確立した。また、exon2 と exon3 など 2 つのエクソン間での PCR を行い、未知のスプライシングバリエーションが存在するかを検出するための PCR プライマーの設計、及び RT-PCR 条件を検討した。複数のバンドが見られた場合は、ノーザンブロッティングとダイレクトシーケンシングにより、新たなスプライシングバリエーションであることを確認する計画である。

同様な方法で、マウスエストロゲンレセプター α の各エクソンを検出できる RT-PCR 法を確立した。マウス子宮には、エストロゲンレセプターのスプライシングバリエーションが存在することを明らかにした。この結果は、マウスエストロゲンレセプターにヒトエストロゲンレセプターと同様のスプライシングバリエーションが存在することを示している。引き続いて、現在、1. マウス子宮、2. マウス脳、3. ニューラルボールについても、

その発現を検討している。手技の若干の改良を含め、今後これらについてさらに詳しく検討していく予定である。

D. 考察

内分泌かく乱化学物質に関する研究は、その社会的重要性から、緊急性を帯びた問題として扱われており、内分泌かく乱化学物質のリスク評価においては、現状で速やかに測定可能な標的臓器におけるホルモン受容体への結合、転写活性、増殖活性等の試験が国際的に取り組まれている。しかし、本研究のようなそのメカニズム解明を意図したプロジェクトは少ない。また、本研究でとりあげる、神経形成期における内分泌かく乱化学物質の発生、分化に対する影響への取り組みは、その重要性は認識されているものの、国際的にも国内的にもいくつかのグループがその問題に関する研究を着手しはじめた段階である。

引き続き平成 11 年度は、今年度確立した実験系と検出系を用い、胎生期のマウスに内分泌かく乱化学物質を暴露し、神経発生や分化過程におけるエストロジェンの影響、外来性エストロジェン様物質の影響を解析する。平成 12 年度はそれらのエストロジェン受容体の発現と分子構造に及ぼす影響について検討し、外来性エストロジェン様物質と内因性エストロジェン様物質で作用に相違がないかを明らかにすることを検討していく予定である。

E. 結論

マウス初代神経幹細胞培養系を神経細胞分化のモデル系として確立するため、マウス神経幹細胞の取得法について検討し、神経幹細胞集団ニューラルボール法が有効であることが示された。また、エストロジェンレセプターのスプライシングバリエントを検出する RT-PCR 法の確立し、マウスエストロジェンレセプターにヒトエストロジェンレセプターと同様のスプライシングバリエントが存在することを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験 - 内分泌障害性を中心に - 組織培養工学24 H10年7月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について - 生物学的立場から -

有機合成化学協会誌57(1) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響

ファルマシア35 H11年3月

2. 学会発表

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質 (endocrine disruptors) の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向。ポリオレフィン等衛生協議会安全性セミナー H10年3月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 第169回有機合成化学協会懇談会 H10年7月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年8月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 平成10年度化工誌ニュース委員会第1回研究会 H10年10月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から-学術情報センター軽井沢公開ワークショップ パネルディスカッション H10年10月

宮城恵理、松島裕子、平林容子、井上 達、菅野 純 内分泌かく乱化学物質 (Xenoestrogen) 高感度検出系としての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応性の経時変化 第15回日本疾患モデル学会 H10年11月

菅野 純 動物の生態と内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) について パネルディスカッション 第25回環境保全・公害防止研究発表会 H10年11月

菅野 純、Kyung-Sun Kang、武木田薫、宮城恵理、斉藤 実、松島裕子、山本雅也、平林容子、金子豊蔵、井上 達 内分泌かく乱化学物質におけるin vitro試験系のin vivo 試験に対する代替性 第12回日本動物実験代替法学会 H10年11月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について 第9回安科研学術講演会 H10年12月

菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon 内分泌かく乱物質の短期in vivo試験系について 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究会 H10年12月

小野 敦、山本雅也、高木敦也、菅野 純、井上 達 Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 第26回建築物環境衛生管理全国大会 H11年1月

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 広川勝彦 東京医科歯科大学大学院医学系研究科感染免疫病理 教授

研究要旨

免疫系は感染に対する生体防御機構として働くと共に内部環境のホメオスターシスを維持する上で重要な役割を果たしている。その免疫系の機能に内分泌攪乱化学物質がどのような影響を与えるかを知ることは、ヒトの健康の維持上必須なことである。そこで、内分泌攪乱化学物質の免疫系に及ぼす影響として、末梢リンパ組織内のT細胞、B細胞、NK細胞などの数、T細胞亜集団の比率、T細胞の増殖能、抗体産生能などの変化を検討した。特に今回の実験では、その予備的な検討として、エストロゲン作用を示す合成女性ホルモンの一つであるジエチルスチルベストロール（Diethylstilbestrol:DES）を内分泌かく乱物質として用い、マウスをモデルとしてその免疫系への影響を詳細に検討した。

A. 研究目的

免疫系は感染に対する生体防御機構として働くと共に内部環境のホメオスターシスを維持する上で重要な役割を果たしている。このホメオスターシスの維持においては、免疫系と神経系・内分泌系との相互作用が重要な役割を果たしている。内分泌系と免疫系との関係は内分泌系から免疫系に及ぼす影響とその逆の免疫系から内分泌系への影響の相互作用の上に成り立っている。ステロイドの免疫系細胞への影響で知られる如く、前者の（内分泌系→免疫系）の関係は古くから知られているが、後者の（免疫系→内分泌系）の関係はリンパ球がいろいろなペプチドホルモンを産生するという事実から、比較的最近になって分かって来たことである。

内分泌系が免疫系と相互作用するには3つのルートがある。第一はグルココルチコイドによる免疫系に対する抑制作用である。これにはグルココルチコイドのリンパ球に対する融解などの直接作用とメディエーターを介した間接作用がある。第二は性ホルモンによる免疫系への抑制作用である。免疫系の主役であるT細胞の分化に必須の胸腺は、思春期になって性ホルモンの分泌が盛んになると萎縮が促進される。実験的に見ても、エストロゲンやテストステロンはリンパ球の諸機能に対して抑制的に作用する。従って、実験的に精巣や卵巣を取ると免疫系の機能は全般的に亢進する。第三は視床下部？下垂体軸である。上述のグルココルチコイドや性ホルモンがこのコントロール下にあることはい

うまでもない。それに加えて下垂体ホルモンも免疫系と深く関係する。中でも成長ホルモン(GH)は胸腺の成長とT細胞分化に必須のホルモンである。従って、GHが低下する様な場合には免疫系の正常な発達が見られなくなる。さらに興味あることはリンパ球がGHを始めとしたいろいろな下垂体ホルモンを産生することである。

このような免疫系と内分泌系との密接な相互作用の上に、生体のホメオスタシスの維持が成り立っている。その生体内に、どんなものであれ内分泌かく乱物質が入れば重大な影響をもたらすことは想像に難くない。

本実験ではエストロゲン作用を示す合成女性ホルモンの一つであるジエチルstilbestrol (DES)を内分泌かく乱物質として用い、マウスをモデルとしてその免疫系への影響を詳細に検討した。DESの生体への影響はその催奇性効果などの報告に見られるように、胎児期から成長期における影響を見たものが多い。ここでは先ず若齢マウスへの影響を見ると共に、老化マウスへの影響を検索する計画とした。免疫系は幼若期をピークとして、思春期を過ぎると加齢と共に確実に機能低下し、老齢期にはピーク時の1/10以下に低下する機能もある。このように、老齢期に免疫機能が著しく低下することが老齢期におけるいろいろな疾病の発生の重大な背景となっている。この老化に伴う免疫機能の低下に内分泌かく乱剤がどの様な影響を及ぼすかを見ることは極めて重要と思われる。

B. 研究方法

動物：C57BL/6 マウス (♂/♀) 3ヶ月齢。

内分泌かく乱剤：Diethylstilbesterol (DES)。

投与量：高用量、15mg/Kg。低用量、3mg/Kg。

投与方法：腹腔内 (ip)

投与回数：実験1；1回。実験2；1回 x 5日 (5回)。

検索日：実験1では投与後2及び3日後、実験2では最終投与後2日目に屠殺し検索。

実験群

- A) Male Corn oil 0.2ml 5 x 5 mice
- B) Male DES 3mg/g (体重) 5 x 5 mice
- C) Male DES 15mg/g (体重) 5 x 5 mice
- D) Female Corn oil 0.2ml 5 x 5 mice
- E) Female DES 3mg/g (体重) 5 x 5 mice
- F) Female DES 15mg/g (体重) 5 x 5 mice

検索項目

- A) 体重と臓器重量 (胸腺、脾臓、肝、腎、精巣、卵巣、副腎)
- B) フローサイトメトリー
胸腺(CD4/CD8)、脾臓(Thy-1/B220, CD4/CD8, ナイフ/マリー-, NK/CD3)
- C) リンパ球の増殖能
T細胞増殖能 (anti-CD3MoAb, Con A), B細胞増殖能 (LPS)
- D) 抗SRBC抗体産生能 (PFC法)
- E) NK細胞活性

C. 研究結果

本年度は若齢マウスを用い、1回目は予備実験を行い、その結果を参考として2回目の本実験を行った。