

図 3

P2 ラット培養海馬ニューロンの
4-AP 刺激によるグルタミン酸放出

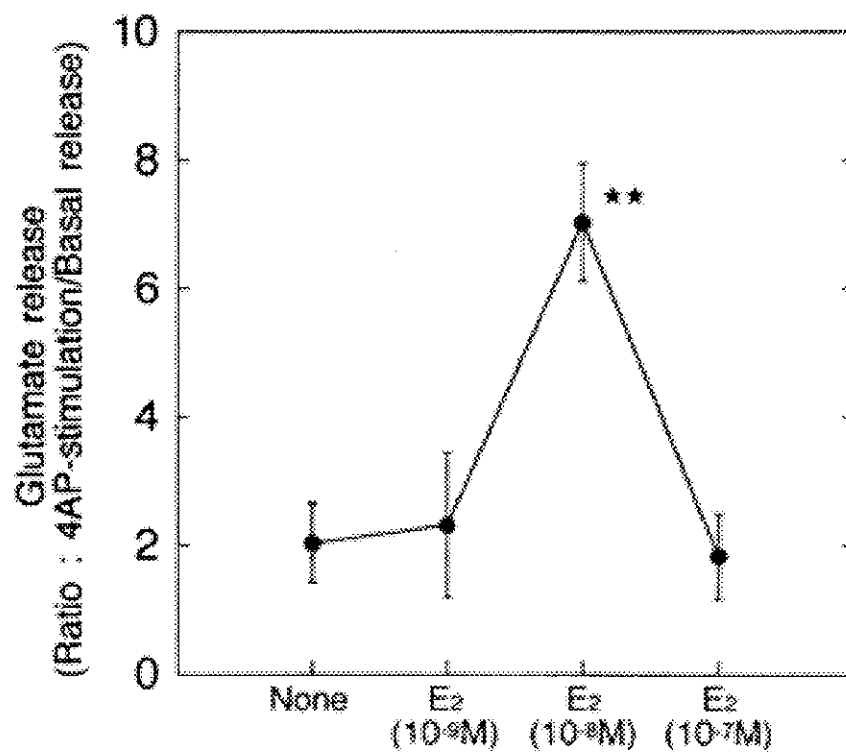
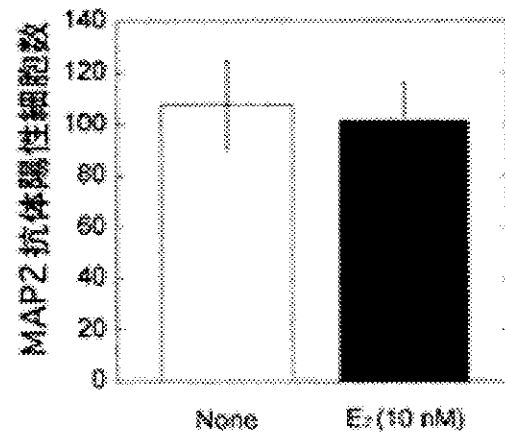
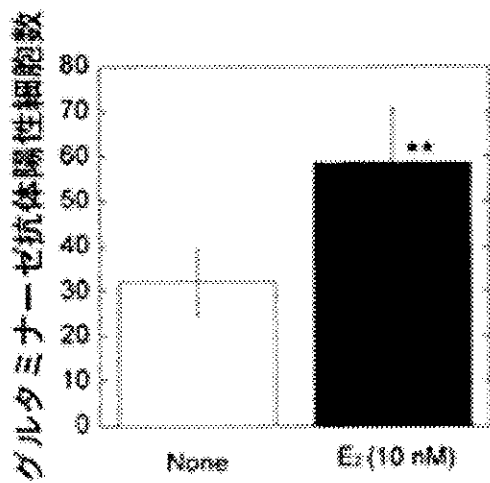
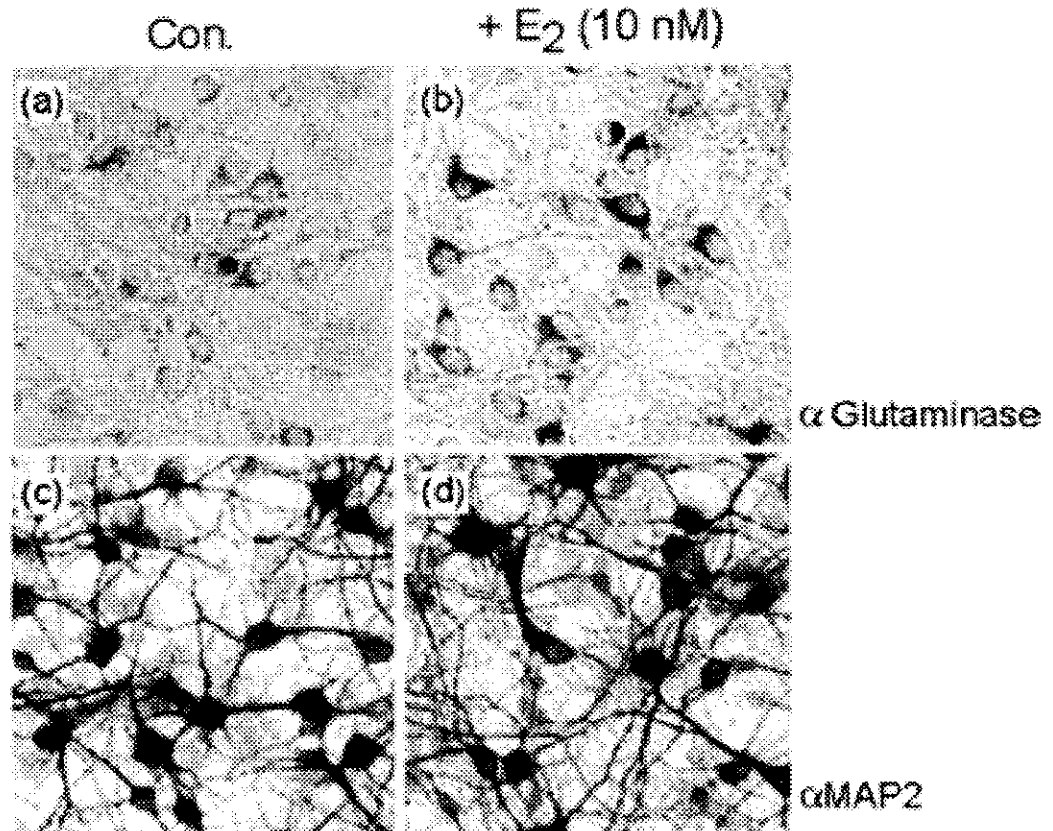


図 4

P2 ラット培養海馬ニューロンにおける
グルタミナーゼおよび MAP2 免疫染色



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（平成 12 年度）

血液脳関門及びグリア細胞への影響の in vitro 評価

分担研究者 浅井 清文 名古屋市立大学医学部助教授

研究要旨：内分泌かく乱物質（EDCs）の血液脳関門（blood-brain barrier: B-BB）への影響を検討するにあたり、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する目的で、ウシ脳毛細血管内皮細胞の不死化を行った。この不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞（t-BBEC-117）を用い in vitro B-BB model を作製し、EDCs が物質透過性にどのような影響を与えるか検討した。その結果、Estradiol 及び EDCs は、細胞間隙を透過する L-glucose の透過性を抑制することが判明した。但し、4-Nonylphenol だけは透過性を亢進させ、他の EDCs とは異なる作用を示した。また、B-BB 機能に影響を与えるグリア細胞の遺伝子発現が Estradiol によりどのような影響を受けるかについて DNA microarray を用いて解析した。その結果、myelin basic protein、myelin proteolipid protein、cationic amino acid transporter が強く誘導されることが判明した。

A. 研究目的

血液脳関門（blood-brain barrier: B-BB）は脳への物質の移行を制限し、中枢神経系の恒常性を維持する機構として知られている。内分泌かく乱物質（EDCs）の中枢神経系への影響を検討するにあたって、EDCs が B-BB をどの程度通過するか、そして、EDCs が B-BB そのものの特性を変化させるものか、把握しておく必要がある。分担研究者らは既に、ウシ脳毛細血管内皮細胞（BBEC）とラットアストロサイトを共培養することにより、培養系を利用した B-BB モデル（in vitro B-BB モデル）を確立しているが、脳毛細血管内皮細胞の採取は難しく、今後、実験を進めるにあたって、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する必要があった。そこで昨年度は、不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞（t-BBEC-117）の樹立を行い、in vitro

B-BB モデルに利用できるかどうか検討した。今年度は、この細胞を用いた in vitro B-BB モデルにおいて、EDCs が物質透過性を変化させるか検討した。また、B-BB 機能に影響を与えるグリア細胞の遺伝子発現が Estradiol によりどのような影響をうけるか、DNA microarray を用いて解析した。

B. 研究方法

1. 不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞(t-BBEC-117)の培養と in vitro B-BB モデルの作製：
不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞(t-BBEC-117)は、10%胎児ウシ血清を含むダルベッコ改変イーグル培地に G418 (200mg/ml) を添加したもので継代した。in vitro B-BB モデル用には、Snapwell (直径 12mm、Costar 社) に 5×10^5 細胞を播種

し、3日間培養したものを使用した。

2. In vitro B-BB モデルにおける物質透過性の測定：

1で t-BBEC-117 細胞を培養した Snapwell を拡散チャンバーに装着し、ついで、内皮細胞側（血管内腔側に相当）に細胞間隙のみを通過する [¹⁴C]-L-glucose を添加した。その後、反対側のチャンバー（脳実質側に相当）に透過してくる [¹⁴C]-L-glucose の量を、経時的に培地を少量採取し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定することにより定量した。EDCs の作用を検討するために、L-glucose を添加すると同時に Estradiol または各種 EDCs を添加し、L-glucose の透過量が変化するかどうか検討した。使用した試薬は、Estradiol、Testosterone、4-Nonylphenol、Diisononyl phthalate、Flutamide、Bis(2-ethylhexyl)ester、Vinclozolin、Methoxychlor、Tamoxifen、Bisphenol A、p-hydroxybenzoic acid n-butyl ester である。濃度は、すべて 10⁻⁹M にて検討した。

3. Clontech 社 Atlas Array によるグリア細胞遺伝子発現の解析：

ラット妊娠 17 日目の胎児より初代培養したグリア細胞に Estradiol 10⁻⁷M を 24 時間作用させ、作用させていないものとの遺伝子発現の違いを Clontech 社、Atlas Array を用いて解析した。

C. 研究結果

1. In vitro B-BB モデルにおける物質透過性に対する Estradiol の影響：

はじめに、Estradiol を in vitro B-BB モデルに作用させ、L-glucose の透過性が変化するか否か検討した。10⁻⁹M となるように Estradiol を添加

し、図 1 に示すように、経時的に L-glucose の透過量を測定したところ、Estradiol 添加直後から、細胞間隙を通過する L-glucose の透過性が低下した。

2. In vitro B-BB モデルにおける物質透過性に対する EDCs の影響：

次に、方法に述べた EDCs 及び Testosterone について、L-glucose の透過性を同様に検討した。図 2 に示すように、ほぼ全ての薬物で透過性の低下が観察された。但し、4-Nonylphenol を作用させたときのみ透過性が亢進し、他の薬物と異なる効果が観察された。

3. Clontech 社 Atlas Array によるグリア細胞遺伝子発現の解析：

グリア細胞の遺伝子発現を Estradiol の有無で比較したところ、2 倍以上の変化が検出された遺伝子を表 1 に示した。特に Estradiol により、myelin basic protein : 15 倍、myelin proteolipid protein : 7 倍、cationic amino acid transporter : 9 倍、と強く誘導されることが判明した。

D. 考察

1. ウシ脳毛細血管内皮細胞を不死化して得られた t-BBEC-117 は脳毛細血管内皮細胞としての特性を有しており、in vitro B-BB モデルに利用することができた。

2. In vitro B-BB モデルに対し、Estradiol 及び各種 EDCs を作用させた時、ほぼすべての化学物質で、即時的に L-glucose の透過性が低下した。これは、これらの化学物質が細胞内レセプターを介して作用しているだけでなく、細胞膜上にあるレセプター（ないし類似作用を持つ蛋白）を介して作用している可能性を示唆するものと考えられ、

どのようなメカニズムによるものか、今後の検討課題と考えられた。

3. 4-Nonylphenol のみ L-glucose の透過性を亢進させ、このアッセイ系では他の EDCs と異なる作用を持っていることが推測された。

4. 今回使用した *in vitro* B-BB モデルを利用し、EDCs そのものの中枢神経への透過性を検討することも可能であり、今後行う予定である。

5. Estradiol は、グリア細胞の一部の遺伝子発現を大きく変化させることが判明した。特に myelin basic protein, myelin proteolipid protein は、オリゴデンドロサイトに特異的な遺伝子である。今回実験に使用した初代培養グリア細胞はアストロサイトを主体とする混合細胞系であったが、オリゴデンドロサイト前駆細胞がより多く含まれる発生時期の細胞を用いれば、mRNA の回収率が上がりノーザンブロットなどの定量性の高い方法で発現変化が検討できる可能性がある。これらの遺伝子発現を指標として EDCs のスクリーニングに応用できるかどうかは更に検討を要する。

E. 結論

1. 不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞株を用い *in vitro* B-BB モデルを作製した。

2. Estradiol 及び各種 EDCs は、即時的に作用し、*in vitro* B-BB モデルにおける L-glucose の透過性が低下した。

3. EDCs がどのようなメカニズムにより透過性を変化させるのか、今後の検討課題である。

4. DNA microarray を使用し、グリア細胞において Estradiol により変化する遺伝子群が同定できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoneda, N., Yamamoto, M., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M., Mase, M., Yamada, K., Nakanishi, M., Tada, T., Miura, Y. and Kato, T.: Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. *Mol. Brain Res.*, (in press).

Yamamoto, M., Yoneda, N., Asai, K., Sobue, K., Tada, T., Fujita, Y., Katsuya, H., Fujita, M., Aihara, N., Mase, M., Yamada, K., Miura, Y. and T., K.: Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Mol. Brain Res.*, (in press).

Morikawa, M., Asai, K., Kokubo, M., Fujita, K., Yoneda, N., Yamamoto, N., Inoue, Y., Iida, J., Kishimoto, T. and Kato, T.: Isolation and characterization of a new immortal rat astrocyte with a high expression of NGF mRNA. *Neurosci. Res.*, 39: 205-212, 2001.

Miyachi, T., Asai, K., Tsuiki, H., Mizuno, H., Yamamoto, N., Yokoi, T., Aoyama, M., Togari, H., Wada, Y., Miura, Y. and Kato, T.: Interleukin-1 β induces the expression of lipocortin 1 mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci. Res.*, (in press).

Kataoka, H., Miura, Y., Joh, T., Seno, K., Tada, T., Tamaoki, T., Nakabayashi, H., Kawaguchi,

M., **Asai, K.**, Kato, T. and Ito, M.: Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATBF1. *Oncogene*, 20: 869-873, 2001.

Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., **Asai, K.** and Kato, T.: Cyclic ADP-ribose as a potential second messenger for neuronal Ca²⁺ signaling. *J. Neurochem*, 76: 321-331, 2001.

Fujita, M., Aihara, N., Yamamoto, M., Ueki, T., **Asai, K.**, Tada, T., Kato, T. and Yamada, K.: Regulation of rat hippocampal neural cadherin in the kainic acid induced seizures. *Neurosci Lett.*, 297: 13-16, 2001.

Aoyama, M., **Asai, K.**, Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T. and Nakagawara, A.: Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.*, 164: 51-60, 2001.

Tsuiki, H., **Asai, K.**, Yamamoto, M., Fujita, K., Inoue, Y., Kawai, Y., Tada, T., Moriyama, A., Wada, Y. and Kato, T.: Cloning of a rat glia maturation factor-gamma (rGMFG) cDNA and expression of its mRNA and protein in rat organs. *J. Biochem.* 127: 517-523, 2000.

Hotta, T., **Asai, K.**, Fujita, K., Kato, T. and

Higashida, H.: Membrane-bound form of ADP-ribosyl cyclase in rat cortical astrocytes in culture. *J. Neurochem.*, 74: 669-675, 2000.

2. 学会発表

加藤康二郎、間瀬光人、相原徳孝、真砂敦夫、山田和雄、山本直樹、**浅井清文**、加藤泰治：ラット脳凍結損傷モデルにおける、脳浮腫と水チャンネル Aquaporin-4 の発現について、第 3 回脳浮腫頭蓋内圧研究会 2000.6.24 東京

祖父江和哉、山本直樹、米田和広、藤田義人、稲垣雅昭、津田喬子、三浦 裕、**浅井清文**、勝屋弘忠、加藤泰治：血液脳関門における Aquaporin-4 の発現とウシ Aquaporin-4 cDNA のクローニング、第 43 回日本神経化学学会大会 2000.10.18-20 金沢

山本直樹、米田和広、祖父江和哉、藤田義人、稲垣雅昭、三浦 裕、**浅井清文**、加藤泰治：アストロサイトにおける Aquaporin-4 発現調節機構、第 43 回日本神経化学学会大会 2000.10.18-20 金沢

間瀬光人、山田和雄、相原徳孝、藤田政隆、加藤康二郎、祖父江和哉、藤田義人、山本直樹、**浅井清文**、加藤泰治：中枢神経系における水チャンネル (aquaporins) の機能：脳浮腫治療への新しいアプローチの可能性、第 59 回日本脳神経外科学会総会 2000.10.24-26 福岡

藤田政隆、相原徳孝、山本愛美、**浅井清文**、多田豊曠、加藤泰治、山田和雄：ラットカイニン酸誘

発てんかんモデルでの海馬内における N-カドヘ
リンの動向, 第 59 回日本脳神経外科学会総会
2000.10.24-26 福岡

Asai, K., Hotta, T., Fujita, K., Kato, T.,
Higashida, H.: Membrane-bound form of
ADP-ribosyl cyclase in cultured rat cortical
astrocytes. Society for Neuroscience 30th

Annual Meeting 2000.11.4-9. New Orleans,
Louisiana, U.S.A.

山本直樹、祖父江和哉、米田和広、三浦 裕、浅
井清文、加藤泰治: 血液脳関門 (B-BB) における
Aquaporin-4 発現調節機構, 第 23 回日本分子生
物学会年会 2000.12.13-16 神戸

表 1. 初代培養ダリア細胞の estradiol 作用下で発現が変動した遺伝子群
—DNA microarray による解析結果—

UP	DOWN	Gene
2.7	2.6	apolipoprotein D
2.4		fos-related antigen 1 (FOSL1; FRA1)
9.0		heat shock 70-KDa protein (HSP70)
		cationic amino acid transporter 3
	2.0	sodium/potassium-transporting ATPase beta 1 subunit (ATP1B1)
	2.0	multi drug resistance protein (MDR1); P-glycoprotein (PGY1)
	3.5	water channel integral protein chip 28k
7.0		myelin proteolipid protein (PLP); DM-20; lipophilin
15.0		MYELIN BASIC PROTEIN S (MBP S)
	6.0	fatty acid-binding protein (heart; H-FABP)
2.0		steryl-sulfatase precursor (EC 3.1.6.2); steroid sulfatase; steryl-sulfate suariginase 2
	2.0	eek proto-oncogene; protein tyrosine kinase; eph/ek-related
	2.5	transmembrane receptor UNC5H2.
	2.8	Non-processed neurexin II-beta major, NEUREXIN II-BETA-A PRECURSOR + Non-processed neurexin II-alpha.
2.5		NEUREXIN II-ALPHA-B PRECURSOR
	2.1	neuropeptide Y precursor (NPY)
	2.3	granulocyte colony stimulating factor
	2.0	macrophage inflammatory protein-2 precursor
	2.6	CXC chemokine LIX
	2.0	keratinocyte growth factor
	3.0	insulin-like growth factor-binding protein (rIGFBP-6)
	2.8	GTP-binding protein G(i)G(s)G(o) gamma-9 subunit; Ggamma8
	2.0	gelatinase A
	2.0	cathepsin K
	3.7	type I procollagen C proteinase enhancer protein
2.1		adenosine A1 receptor (ADORA1)
	3.0	calponin

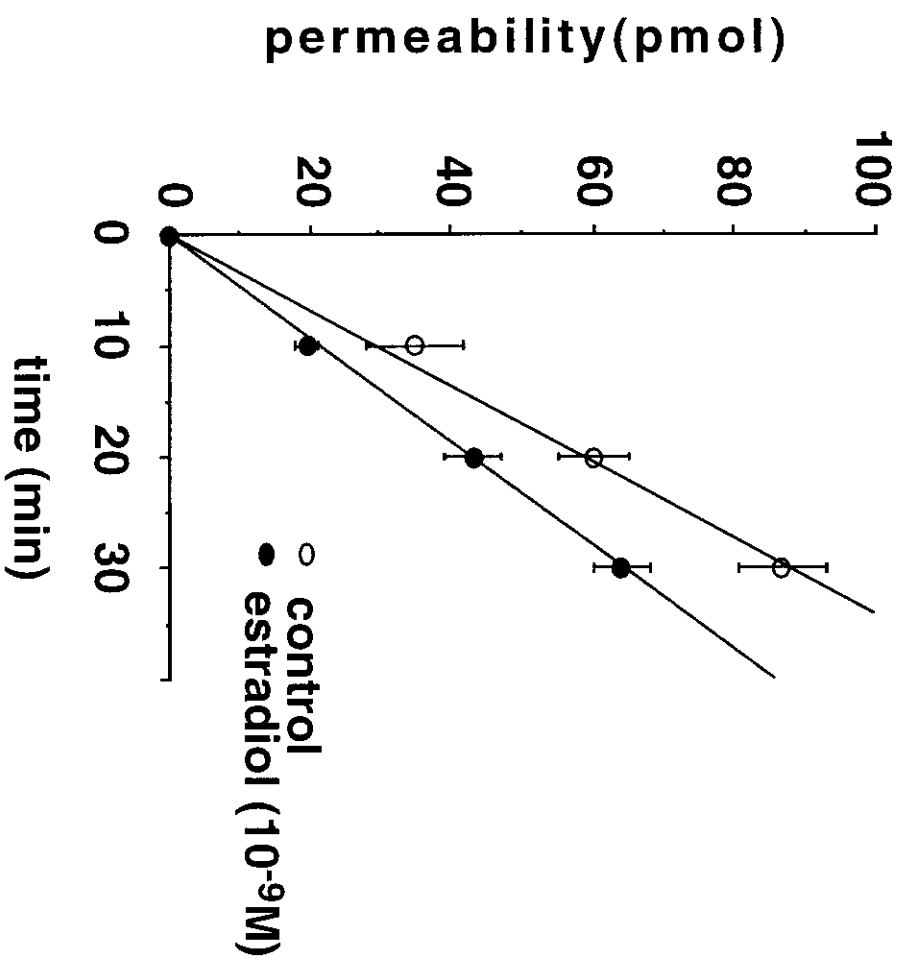


図 1. In vitro B-BBモデルにおけるEstradiolによる
L-glucoseの透過性の経時的変化

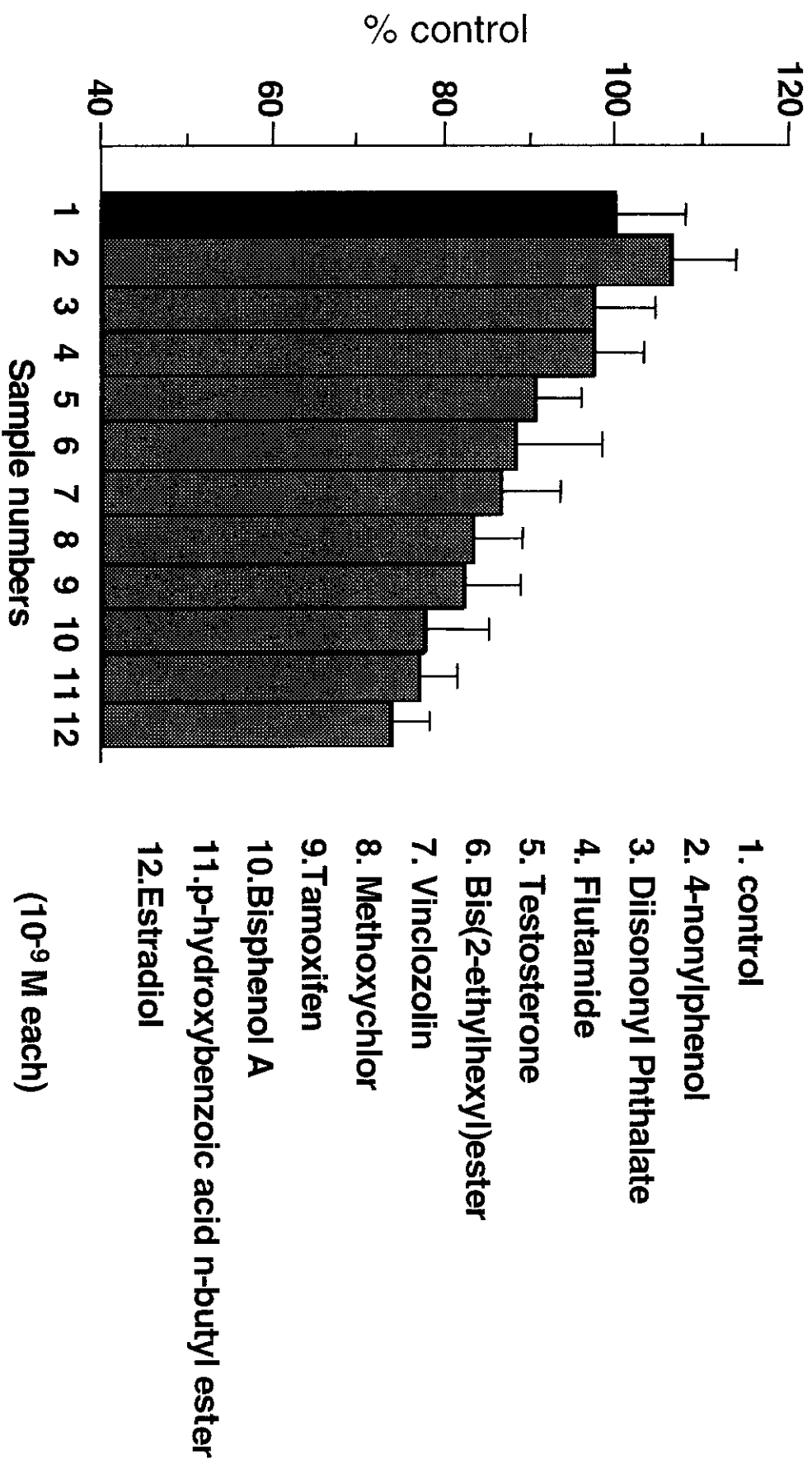


図 2. EDC候補物質のin vitro B-BBモデルにおける物質透過性

周産期曝露による影響の病理学的及び分子生物学的解析

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨：内分泌かく乱化学物質(EDCs)の発達期中枢神経系障害に関する研究課題について、周産期曝露による影響の病理形態学的及び分子生物学的解析手法を用いた in vivo 評価に関する研究を行った。

ほ乳類では胎生期から新生児期間の特定の時期に脳の性分化が完了するが、この時期にホルモン様作用を有する物質に曝露された場合、脳の性分化が障害され性成熟後に内分泌障害や生殖障害の発現する可能性が考えられる。そこで本研究では脳の性分化の臨界期に EDCs を母親ラットに摂取させることで経胎盤・経乳的に児動物に曝露し、脳の性分化の完了時期（新生児期）及び性成熟後に解析を行うことによって、EDCs の周産期曝露による影響の評価を行う。本年度はまずエストロゲン作用の陽性対照物質であるエチニルエストラジオール(EE)を用いて実験を行い、次に代表的な EDCs 候補物質である Genistein, Diisononylphthalate (DINP), Nonylphenol, Methoxychlor (MXC), Bisphenol A 及び Tamoxifen についての実験を進めた。EE の投与実験では、妊娠・授乳ラットに EE を 0.02, 0.1, 0.5 ppm の濃度で含む飼料を脳の性分化の臨界期である妊娠 15 日から出産後 9 日目まで摂取させた。生後 9 日に児動物の視床下部に存在する性的二型核 (SDN-POA) 領域におけるエストロゲン応答性遺伝子 (GABA transporter type-1, bcl-xL, glial fibrillary acidic protein) の発現量を定量して、EE による視床下部の性分化への影響を遺伝子発現量で評価した。それには前年度に確立したメタカーン固定・パラフィン包埋法、レーザー光を利用した microdissection 法及び plate hybridization による PCR 産物の定量法を用いた。また性成熟後（生後 11 週）には SDN-POA のサイズを計測するとともに内分泌関連器官への影響を病理形態学的に検索した。新生児期の遺伝子発現解析では、雄では 0.5 ppm で、雌では 0.02 ppm より遺伝子発現の変動が認められた。性成熟後の検査では、雄では 0.5 ppm で、雌では 0.1 ppm より内分泌関連器官に組織学的変化が認められ、雄では SDN-POA サイズの減少が 0.5 ppm で認められた。以上の結果から EE の周産期曝露により、脳の性分化の終了時期の SDN-POA 領域における遺伝子発現が変動し、性成熟後にも内分泌関連器官に不可逆的変化の生じることが示された。新生児期の視床下部の遺伝子発現変動は、性成熟後に検出される変化と同等以上の感度での EE の影響を示唆しており、EDCs の周産期曝露の影響を評価する有用な指標となる可能性が示された。

次に 6 種の EDCs 候補物質を用いた混餌投与による周産期曝露実験を、母動物への最大耐量を最高用量として行った。現在、動物実験を終了して各解析を実施中であるが、これまでのところ、MXC の最高用量群 (1200 ppm) で春期発動期の変動、性周期の不規則性及び生後 11 週時の子宮や卵巣における組織変化、DINP の最高用量群 (20000 ppm) の 11 週時で精巣の軽微な組織変化が認められている。一方、その他の候補物質については現在のところ明らかな影響は認められていない。今後各候補物質について新生児視床下部における分子生物学的解析及び生後 11 週の病理組織学的検索を進め、明らかに内分泌影響を示唆する変化の認められた MXC 曝露動物とそれ以外の化学物質曝露動物の変化を比較して行くことにより、EDCs の周産期曝露の影響を総合的に評価する予定である。

A. 研究目的

近年、我々の環境中に数多くの内分泌かく乱化学物質(EDCs)が見いだされ、生殖機能を含むそれらのヒトへの影響が世界的に懸念されるようになってきた。EDCsの生体への作用機構としてエストロゲン受容体(ER)を介した機序が考えられており、その極低用量曝露によっても生体に不可逆的影響を及ぼすことが指摘されている。中枢神経系においても、胎生期より視床下部・辺縁系を中心としてERを含む性ホルモン受容体が分布しており、当然、その一部を構成する生殖機能中枢も影響を受ける可能性が高い。特にホルモン依存的に脳の性分化を果たす周産期においてEDCの曝露を受けてそれが中枢神経系内に入り込んで作用した場合、脳の正常な性分化が障害され、生後の個体の内分泌機能を含む種々の機能が影響を受ける可能性がある。本研究は、個体レベルでの脳の性分化完了時期と性成熟後の時期での評価系を用いることにより、EDCsの神経中枢への影響の本態を明らかにすることを目標とする。また、用量依存性の生物学的な作用強度を求めることにより、EDCsの低用量域での生体影響を総合的に評価することが可能となる。

最近、脳の性分化を果たす時期に過剰のエストロゲン化合物を投与すると、視床下部ニューロンのアポトーシスと生殖器に障害を起こすことが報告されている。また、ビスフェノールAの胎生期曝露により、脳内アストロサイトの細胞骨格蛋白であるglial fibrillary acidic protein(GFAP)の遺伝子発現が、低用量から用量依存性に増加するとの報告もある。GFAP遺伝子はそのプロモーター領域にエストロゲンに反応するestrogen response element(ERE)を持ち、個体のエストロゲンレベルに呼応してその発現の増減することが知られている。従って、発達期でのEDCs曝露により、内分泌機能の神経中枢になんらかの障害を及ぼす可能性がある。

本年度は、エストロゲン作用の陽性対照であるエチニルエストラジオール(EE)を妊娠・授乳期ラットに投与し、新生児期(出生後9日)に視床下部の性的二型核(SDN-POA)領域における遺伝子発現解析、性成熟後にSDN-POAのサイズ計測及び内分泌関連器官の病理組織

学的検索を行って、児動物への影響を評価した。EEを用いた実験により新生児期の遺伝子発現解析の有用性が確認されたため、続いて代表的EDCs候補化合物であるGenistein(Gen)、Diisononylphthalate(DINP)、Nonylphenol(NP)、Methoxychlor(MXC)、Bisphenol A(BA)及びTamoxifen(Tam)について同様の検討を進めた。

B. 研究方法

まずEEを妊娠・授乳期ラットに投与し、児動物への影響の評価を行った。曝露形態は、想定されるEDCsのヒトへの曝露形態を考慮して、EEを混じた飼料を母動物に摂取させることにより経胎盤・経乳的に児動物に曝露した。SD(IGS)ラットに妊娠15日から生後9日までの間、EEを0.02, 0.1, 0.5 ppmの濃度で混じた標準飼料(CRF-1, オリエンタル酵母社製)を摂取させた。生後9日目に児動物の一部を屠殺し、視床下部の性的二型核(SDN-POA)領域での遺伝子発現を解析した。解析遺伝子は、プロモーター領域にEREを有し、予備的な検討によりこの時期のラット視床下部における発現が確認されたGABA transporter type-1(GAT-1), bcl-xL, GFAPとした。採取した脳をメタカーン固定・パラフィン包埋した後、レーザー光を用いたmicrodissection法によりSDN-POA領域を採取し、その部位のtotal RNAを調製し、competitive RT-PCRを行い、プレートハイブリダイゼーション法により標的遺伝子のmRNAコピー数を求めた。残りの児動物はその後無処置のまま飼育し、性成熟後の生後11週にSDN-POAのサイズ計測及び内分泌関連器官(下垂体、甲状腺、副腎、乳腺、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膣)の病理組織学的検索を行った。

SDN-POAのサイズ計測は、ホルマリン固定・パラフィン包埋した脳から27 µmおきに3 µm厚の連続切片を作製し、各個体ごとに3枚の代表切片におけるSDN-POAの面積を合計したものを求めた。

次に代表的な6種類のEDCs候補物質の投与実験を行った。曝露用量は予備試験の結果を基に、原則として母動物の摂餌量及び体重増加量、児動物の出生時体重及び体重増加量が減少す

る用量を最高用量とし、その 1/5 及び 1/50 の用量をそれぞれ中間用量、低用量とした。ただし Tam については母動物の妊娠維持及び哺育への著しい影響が認められたため、児動物を得ることが可能な最大量を最高用量とした。実際の用量は Gen を 20, 200, 1000 ppm, DINP を 400, 4000, 20000 ppm, NP を 60, 600, 3000 ppm, MXC を 24, 240, 1200 ppm, BA を 60, 600, 3000 ppm, Tam を 0.005, 0.05, 0.25 ppm と設定し、SD(IGS)ラットに妊娠 15 日から出生後 10 日までの間、各濃度の化合物を飼料に混じて摂取させた。標準飼料中に含まれる phytoestrogen の影響を除くため、飼料には大豆及びアルファルファ由来のタンパクを含まない特殊飼料（オリエンタル酵母社製）を用いた。生後 10 日目に新生児視床下部の SDN-POA 領域における遺伝子発現（GAT-1, bcl-xL, GFAP）を解析する目的で、一部の児動物を屠殺した。残りの児動物はその後無処置のまま飼育し、一部の児動物を性成熟前の生後 3 週に、残りの児動物については春期発動期（雌では膻開口、雄では包皮分離が確認される日）及び性周期を検索し、性成熟後の生後 11 週に解剖した。生後 11 週の雌の解剖は発情間期に行った。生後 3 週の児動物の内分泌関連器官については、器官重量測定を行い、必要に応じて病理組織学的検索を行った。生後 11 週時には、視床下部の SDN-POA のサイズ計測及び内分泌関連器官の病理組織学的検索を行った。

C. 研究結果

EE の経胎盤・経乳的曝露を受けた児動物の生後 9 日目の時点での SDN-POA 領域における遺伝子発現の解析結果を図 1 に示した。GAT-1 は、雄では 0.5 ppm で、雌では 0.02 ppm より用量依存的に発現量の低下を認めた。GFAP は、雄では 0.5 ppm で発現量の増加、雌では 0.1 ppm より発現量の減少を認めた。bcl-xL の発現量には明らかな変動を認めなかった。

生後 11 週時の検査では、雌の 0.5 ppm 群で卵巣重量の低下と下垂体重量の増加が認められた（表 1）。病理組織学的検索の結果を表 2 に示した。雄では 0.02 ppm 群より副腎皮質束状帯の石灰化、0.1 ppm 群より下垂体中間葉の石灰化、0.5 ppm 群で副腎皮質束状帯細胞過形成、前立腺（背側葉）の軽度な萎縮、乳腺の腺房増生が認められた。雌では 0.1 ppm 群より多

卵胞嚢胞、子宮内膜上皮の増生、0.5 ppm 群で子宮内膜上皮の増生及び扁平上皮化生、副腎皮質束状帯細胞の過形成、乳腺の腺房増生が認められた。なお雌では雄の投与群で認められた副腎皮質束状帯及び下垂体の石灰化が対照群を含む各群で認められた。SDN-POA のサイズを計測した結果、対照群では過去の文献報告の通り雄が雌に比べて大きな値を示した（図 2）。EE 曝露群では雄の 0.5 ppm で神経核のサイズの減少が認められた。雌では EE 曝露の影響は認められなかった。

各 EDCs 候補物質を用いた実験結果を表 3 にまとめた。これらの化合物については動物実験を終了し、現在遺伝子発現解析及び病理組織学的検索を進めている。Tam を除く各物質の高用量群では曝露期間中の母動物の体重増加量及び摂餌量、児動物の出生時体重の減少及び体重増加量の減少が認められた。Tam では高用量群で出生児数の減少が認められた。

出生時の性分化の指標とされる生殖器-肛門間距離(AGD)にはすべての化学物質で明らかな変動は認められず、曝露期間終了後（出生後 10 日以降）の児動物の体重増加量は、おおむね対照群と同程度であった。

MXC に関しては、1200 ppm 群において、児動物の内分泌・生殖系への強い影響が認められた。同群では、生後 3 週時に精巣及び卵巣重量の低下が認められ、春期発動期は、雌では体重は対照群に比べて低値を示したにも関わらず、対照群に比べて平均で 2 日早められた。一方雄では春期発動期は平均で 2 日遅延した。生後 8 週から 10 週にかけて行った性周期検査では、対照群は正常な 4-5 日の周期を示したのに対して、1200 ppm 群では発情期が 3 日持続する個体や発情間期が 4 日以上持続する個体が認められ、不規則な性周期を示した。生後 11 週時の剖検では、卵巣重量の低下と子宮重量の増加が認められた。病理組織学的検索では、多卵胞嚢胞、子宮内膜上皮の増生が認められた（表 4）。しかし、この時期での SDN-POA サイズは、雌雄とも対照群と投与群との間に明らかな差を認めなかった（図 3）。

その他の EDCs 候補物質については、DINP 及び BA の高用量群で曝露期間中の体重の低下を反映したと考えられる精巣重量の減少が生後 3 週時に認められたが、生後 11 週時には精巣重量は対照群と同程度の値を示した。病理検

査の終了した DINP については、最高用量群において精巣の stage XIV の精細管での分裂精子細胞の変性とセルトリ細胞の空胞化を認めている (表 5)。春期発動期において、DINP, NP, BA については体重は対照群と比べて低値を示したが、春期発動の認められた日は対照群との間に差は認められなかった。

生後 11 週の剖検では、Gen の 200 及び 1000 ppm 群の雄、NP の 3000 ppm の雌で副腎相対重量の高値が認められた。その他の臓器の重量には影響は認められなかった。

D. 考察

胎児期及び新生児期に EE を曝露された児動物では、脳の性分化がほぼ完了する生後 9 日に SDN-POA を含む領域でのエストロゲン応答遺伝子の発現に変動が認められた。神経細胞に特異的な GAT-1 の発現量は雄では 0.5 ppm で、雌では低用量の 0.01 ppm より減少した。GAT-1 は成熟雌ラットでは性周期とともに発現量が変動し、血中エストロゲン濃度の上昇とともに発現量の上昇することが報告されているが、本実験の結果はそれとは逆方向への変化であった。GAT-1 の減少は、その神経細胞特異的な発現を考慮すると、神経細胞数の減少あるいは神経細胞における ER の down-regulation など、EE の神経細胞への影響を反映した可能性であると考えられる。実際に生後 11 週時に行った SDN-POA のサイズ計測では雄の 0.5 ppm 群で神経核サイズの減少が認められ、神経細胞数の減少を裏付ける結果が得られている。しかしながら、より低用量から GAT-1 発現量の減少が認められた雌では神経核のサイズへの影響は検出されなかったことから、今後、脳の性分化時期における神経細胞死の検討あるいは ER 発現量の検討などを行うことにより、GAT-1 発現量の減少の原因を明らかにするとともに、EE の周産期曝露による神経細胞への影響を評価する必要があると考えられた。GFAP 発現量は雄では 0.5 ppm で増加、雌では 0.1 ppm より減少を示した。GFAP はアストロサイトに特異的に発現し、GAT-1 と同様に成熟雌ラットでは性周期に依存して発現量の変動することが知られている。本実験では雌雄で変化の方向性が異なるものの GFAP 発現量の変動が認められたことから、神経細胞に加えてアストロサイトの数、あるいは

機能にも EE 曝露による影響が示唆された。抗アポトーシス遺伝子である bcl-xL については雌雄ともに変動は認められなかった。

EE 投与例の生後 11 週の検査では雄では 0.5 ppm 群で前立腺、副腎、乳腺に軽微であるが明確な EE の影響が認められた。雌では 0.1 ppm 群より卵巣、子宮に、0.5 ppm では副腎、乳腺に組織変化が認められた。これらの変化は、エストロゲン作用を示す化合物により誘発されることが報告されているものであった。なお雄では低用量より副腎皮質束状帯及び下垂体に石灰化が認められたが、雌では同様の変化が対照群を含む各群で認められた。本実験で用いた系統のラットで自然発生性に石灰化が起こるといふ報告はないが、雌での発現状況を考慮すると、本変化が EE により誘発されたと断定することはできない。本変化については今後再現性の確認及び引き続き行われる実験の対照群における発現状況から、曝露との関連性を明らかにする必要がある。SDN-POA のサイズは雄では 0.5 ppm で減少し、雌では影響は認められなかった。エストロゲン作用による SDN-POA サイズへの影響については、雌のサイズが大きくなるという報告と、雄のサイズが小さくなるという報告がされている。SDN-POA サイズの雌雄差の原因として、一般的にはエストロゲン作用による神経細胞のアポトーシスの抑制が考えられているが、最近の文献ではエストロゲンは ER β を介してアポトーシスを促進する可能性があることが報告されている。本研究で認められた雄の SDN-POA サイズの減少は、EE のアポトーシス促進作用を反映している可能性が考えられるため、今後 SDN-POA の性分化時期におけるアポトーシスへの影響を評価することが重要であると考えられる。

EE 投与実験で、新生児期の視床下部における遺伝子発現の変動が認められた用量と性成熟後に内分泌関連器官に組織変化が認められた用量を比較すると、雄では副腎・下垂体の石灰化を除外した場合、0.5 ppm 群で明確な変化が認められた。雌では組織変化が 0.1 ppm より認められたのに対して遺伝子発現は 0.02 ppm でも変動しており、遺伝子発現解析により高感度に EE の影響を検出できる可能性が見いだされた。特に雌では遺伝子発現が低用量より変動したのに対して、神経核のサイズは高用量

でも変動しなかったことから、遺伝子発現解析は発達期脳への影響を鋭敏に検出できるパラメーターである可能性が考えられる。

各種 EDCs を用いた実験では MXC の 1200 ppm 群で内分泌・生殖系への明らかな影響が認められた。同群では出生時には AGD に変化は認められなかったが、生後 3 週時には精巣及び卵巣が低重量を示し、春期発動期は雌では早期化、雄では遅延を認めた。春期発動期は視床下部-下垂体軸の支配を強く受けることから、MXC の周産期曝露により視床下部あるいは下垂体が影響を受けている可能性が高いと考えられる。MXC の 1200 ppm 群では性成熟後にも性周期の不規則性及び卵巣、子宮に組織変化が認められ、周産期曝露により内分泌・生殖系に不可逆的な影響の生じることが示された。

MXC 以外の EDCs については、母動物に対する最大耐量と考えられる用量を高用量とし、その 1/50 までの用量範囲で曝露したが、EE や MXC でみられたような明らかな内分泌・生殖系への影響は認められていない。DINP 及び BA の最高用量群では生後 3 週時に精巣重量の低下が認められたが、春期発動期や生後 11 週時の器官重量に変化が認められていない。この変化は DINP や BA の高用量曝露による非特異的な発育遅延を反映したものである可能性が示唆された。また春期発動が観察される時期には、DINP, NP, BA では対照群と比べて体重は低値を示すにも関わらず、春期発動期には対照群との差が認められなかったことから、性的発育を支配する視床下部-下垂体軸は正常に機能しているものと考えられる。ただし、DINP の最高用量群で 11 週目に精巣に軽微な変化を認めたことは、精巣の発達遅延を示唆する変化なのか、あるいは内分泌障害として捉えるべきかについて更なる検索が必要と考えられる。

この他に生後 11 週時に Gen 及び DINP 曝露群で副腎重量の増加が認められた。副腎重量の増加は内分泌系への作用、あるいはストレスに対する反応を反映している可能性が考えられる。このような副腎、精巣の変化とともに、他の臓器についても現在組織学的検索を実施中であり、その結果をもって各化学物質の内分泌・生殖系への影響の有無を判断する予定である。それに加えて新生児期の視床下部における遺伝子発現解析及び生後 11 週時の SDN-POA のサイズ計測も実施中であり、それらの結果が

ら総合的に EDCs による周産期曝露の影響を評価する予定である。

E. 結論

陽性対照である EE を用いた実験結果から、エストロゲン作用を持つ化合物を周産期に曝露することにより、性成熟後に SDN-POA サイズ及び内分泌関連器官に不可逆的な組織変化の生じることが確認された。脳の性分化の終了時期の視床下部の SDN-POA 領域におけるエストロゲン応答性遺伝子の発現の変動は、性成熟後に検出される変化と同等以上の感度で EE の影響を反映しているものと考えられ、EDCs の周産期曝露の影響を評価する有用な指標となる可能性が示された。外因性のエストロゲンによる遺伝子発現低下は、アポトーシスの亢進ないしは ER subtype の発現変動のいずれかを示唆している可能性が高く、これらの検索はエストロゲン作用を示す EDCs による脳性分化障害の直接的な指標になりうると考えられた。本研究での部位特異的な定量的遺伝子発現解析にかかる多大な労力を考慮すると、アポトーシス関連遺伝子産物ないし ER subtype の免疫組織化学的な検出が実際的な方法として考慮すべきであると考えられた。各種 EDCs 候補物質を用いた実験では、MXC の高用量曝露群で内分泌・生殖系への影響が認められたが、その他の候補物質では明らかな内分泌影響は認められていない。今後、各候補物質についても新生児視床下部における遺伝子発現解析及び生後 11 週の病理組織学的検索を進めることにより、EDCs の周産期曝露の影響を総合的に評価できると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shibutani, M., Uneyama, C., Miyazaki, K., Toyoda, K., Hirose, M.: Methacarn fixation, a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab. Invest.* 80: 199-208 (2000)

Uneyama, C., Shibutani, M., Nakagawa, K., Masutomi, N., Hirose, M.: Methacarn, a fixation tool for multipurpose gene expression analysis from paraffin-embedded tissue materials. *Current Topics in Biochem Res* (in press)

Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Hirose, M.: Methacarn, a high-performance tool for genomic DNA analysis in paraffin-embedded specimens. Am J Pathol (submitted)

Toxicology (2001. 3)

Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Toyoda, K., Abe, N., Takahashi, N., Hirose, M.: Dose-response study of perinatally exposed ethinylestradiol on the expression of ERE-containing genes in the SDN-POA of neonatal rats. Endocrinol (submitted)

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

2. 学会発表

畝山智香子, 渋谷淳, 高橋則行, 豊田和弘, 仁保直子, 榊富直哉, 広瀬雅雄: メタカン固定パラフィン包埋組織切片からの遺伝子発現解析 (続報), 第59回日本癌学会総会, 横浜, 第59回日本癌学会総会記事: p508 (3427), 10月, 2000

榊富直哉, 渋谷淳, 畝山智香子, 中川恵子, 阿部直子, 仁保直子, 高橋則行, 小林恒雄, 広瀬雅雄: エストラジオール周産期曝露による新生仔視床下部における遺伝子発現の変化及び性成熟後の内分泌関連器官への影響について, 第17回日本毒性病理学会, 淡路, 第17回日本毒性病理学会講演要旨集: p23 (15), 1月, 2001

渋谷淳, 阿部直子, 畝山智香子, 中川恵子, 榊富直哉, 仁保直子, 高橋則行, 小林恒雄, 広瀬雅雄: メタカン固定材料を用いた遺伝子産物の定量的発現解析及び遺伝子配列解析について, 第17回日本毒性病理学会, 淡路, 第17回日本毒性病理学会講演要旨集: p23 (16), 1月, 2001

Shibutani, M., Uneyama, C., Masutomi, N., Abe, N., Takahashi, N., Nakagawa, K., Hirose, M.: Dose-response study of perinatally exposed ethinylestradiol on the expression of ERE-containing genes in the SDN-POA of neonatal rats. 40th Annual Meeting of Society of Toxicology (2001. 3)

Uneyama, C., Shibutani, M., Nakagawa, K., Masutomi, N., Takahashi, M., Hirose, M.: Methacarn, a fixation tool for multipurpose gene expression analysis from paraffin-embedded tissues. 40th Annual Meeting of Society of

表1. エチニルエストラジオールを周産期に曝露したラットの生後11週時の内分泌関連器官の臓器重量

	EE (ppm)			
	0	0.02	0.1	0.5
Number of animals	5	5	5	5
Male				
Final body weight	451.6 ± 15.0 ^{a)}	456.8 ± 15.6	421.2 ± 10.1	431.1 ± 39.9
Brain	2.048 ± 0.105	2.068 ± 0.066	2.085 ± 0.107	2.025 ± 0.096
Pituitary	0.013 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.011 ± 0.002
Adrenal(right)	0.026 ± 0.002	0.031 ± 0.005	0.023 ± 0.001	0.024 ± 0.003
Adrenal(left)	0.028 ± 0.003	0.031 ± 0.003	0.025 ± 0.001	0.026 ± 0.004
Testis(right)	1.545 ± 0.058	1.769 ± 0.064	1.683 ± 0.068	1.592 ± 0.212
Testis(left)	1.547 ± 0.083	1.766 ± 0.079	1.670 ± 0.042	1.566 ± 0.183
Epididymis(right)	0.536 ± 0.028	0.610 ± 0.038	0.562 ± 0.023	0.527 ± 0.049
Epididymis(left)	0.527 ± 0.024	0.562 ± 0.060	0.559 ± 0.025	0.506 ± 0.056
Prostate	0.538 ± 0.109	0.686 ± 0.162	0.539 ± 0.040	0.468 ± 0.110
Female				
Final body weight	253.7 ± 22.4	280.3 ± 26.0	259.0 ± 10.1	257.2 ± 28.6
Brain	1.918 ± 0.033	1.907 ± 0.033	2.013 ± 0.045	1.804 ± 0.140
Pituitary	0.015 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.021 ± 0.003 *
Adrenal(right)	0.028 ± 0.003	0.034 ± 0.004	0.031 ± 0.004	0.033 ± 0.002
Adrenal(left)	0.031 ± 0.003	0.034 ± 0.004	0.033 ± 0.003	0.037 ± 0.005
Ovary(right)	0.053 ± 0.012	0.046 ± 0.010	0.049 ± 0.010	0.027 ± 0.009**
Ovary(left)	0.048 ± 0.003	0.044 ± 0.006	0.046 ± 0.008	0.027 ± 0.008**
Uterus	0.564 ± 0.312	0.573 ± 0.078	0.572 ± 0.094	0.437 ± 0.098

a), mean ± SD

*, **, significantly different from control at p<0.05, or p<0.01, respectively

表2-1. エチニルエストラジオールを周産期に曝露したラットの生後11週時の内分泌関連器官の病理組織学的検索結果(雄)

	EE (ppm)			
	control	0.02	0.1	0.5
No. of animals examined	5	5	5	5
Pituitary				
Mineralization, intermediate lobe	0	0	2	3
Adrenal				
Diffuse hypertrophy	0	1	0	2
fascicular zone, cortex				
Mineralization	0	3	5	5
fascicular zone, cortex				
Mammary gland				
Lobular hyperplasia	0	0	0	3
Prostate				
Atrophy, dorso-lateral	0	0	0	2

表2-2. エチニルエストラジオールを周産期に曝露したラットの生後11週時の内分泌関連器官の病理組織学的検索結果(雌)

	EE (ppm)			
	control	0.02	0.1	0.5
No. of animals examined	5	5	5	5
Pituitary				
Mineralization				
Anterior lobe	0	0	0	1
Intermediate lobe	2	2	0	3
Posterior lobe	0	1	0	2
Adrenal				
Diffuse hypertrophy	0	1	1	4
fascicular zone, cortex				
Mineralization	5	5	5	5
fascicular zone, cortex				
Mammary gland				
Lobular hyperplasia	0	0	0	3
Ovary				
Multiple follicular cysts	0	0	4	5
Uterus				
Hyperplasia, endometrium	0	0	5	1
Squamous metaplasia, endometrium	0	0	0	4

表3-1. Genisteinの周産期曝露による影響評価実験の経過

Dose(ppm)	20	200	1000
Intake(mg/kg/day)	1.3-2.1	13.7-23.0	66.6-113.1
体重及び摂餌量			
母動物			
妊娠中			↓ (増体量, 80%)
授乳中			
児動物			
出生時体重			↓ (♂, 94%)
P2-P10 増体量			↓ (♂84%, ♀86%)
P10-P21 増体量			↓ (♂80%, ♀86%)
離乳後増体量			6W 以降♂♀とも低値傾向 (cont.の90%程度)
生殖関連パラメータ			
出生時			
AGD			
P10			
遺伝子発現			
解析中			
P21			
体重			↓ (♂86%, ♀88%)
臓器重量			
組織検査			
標準作製中			
春期発動			
性周期			
W11			
体重	↓ ** (♂84%)	↓ * (♂86%)	↓ ** (♂83%)
臓器重量		↑ 副腎* (相対, ♂126%)	↑ 副腎** (相対, ♂131%)
組織検査			
解析中			

網掛け: 変化なし, AGD: anogenital distance, ()内の数値は% of control, P: Postnatal day

↑: 上昇, ↓: 減少, *: p<0.05, **: p<0.01