

別添2

厚生科学研究費補助金

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究
—特に低用量効果・複合効果・作用機構について—
(H13—生活—013)

平成 13 年度 総括・分担報告書

主任研究者 井上 達

平成 14(2002)年 4 月

厚生科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究

—特に低用量効果・複合効果・作用機構について— 1

井上 達

II. 分担研究報告書

I. リスク調査研究..... 35

【総括】関沢 純

【情報】リスク評価情報に関する調査 長谷川 隆一

【情報】情報データベースの調査 中田 琴子

【情報】情報データベースの調査 井藤 悦朗

【生殖・発生】発生・生殖に関する調査 鈴木 勝士

【生殖・発生】生殖・発生に関する調査 江馬 眞

【発がん-一般】発がん-特に低用量影響に関する調査 福島 昭治

【発がん-一般】発癌一般 三森 国敏

【発がん-発生影響】周生期暴露に関する調査 渋谷 淳

【発がん-発生影響】発生・生殖に関する調査 今井 清

【発がん-生殖器】発がん-特に男性性器癌に関する調査 白井 智之

【発がん-生殖器】乳腺・女性器癌に関する調査 長村 義之

II. 基盤研究..... 73

【生殖】マウス生殖腺の分化および精子、卵形性への内分泌かく乱化学物質影響に関する研究..... 74

井口 泰泉

【生殖】初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用および低用量影響に関する研究..... 78

鈴木 勝士

【免疫】低容量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.....	84
広川 勝昱	
【免疫】内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究.....	90
山崎 聖美	
【神経】核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の 低用量影響に関する解析.....	97
垣塚 彰	
【神経】神経系初期発生におけるエストロジェンレセプターの機能および内分泌かく乱物質の低用量影響 に関する解析.....	102
菅野 純	
【核内レセプター】核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響.....	113
加藤 茂明	
【核内レセプター】ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する 研究.....	120
藤本 成明	
【ステロイド代謝】低用量影響を含む内分泌かく乱物質暴露とヒト性ステロイド代謝との関連性の解明.....	132
笹野 公伸	
【マイクロアレイ基盤整備】マイクロアレイ基盤整備遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの 確立.....	151
五十嵐勝秀	

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

平成 13 年度 総括研究報告書

研究課題名=内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究-特に低用量効果・複合効果・作用機構について-(H13-生活-013)

主任研究者 井上 達

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・センター長

研究要旨

環境中の化学物質の内、内分泌作用を示すホルモン様化学物質(HAC)と、その延長線上で内分泌障害性を示す内分泌かく乱化学物質(EDC)の問題は、それらの核内レセプター作用を中心とした受容体原性効果に端を発する諸機構が明らかになるに従って、いわゆる低用量問題と呼ばれる作用閾値の存在の如何、相乗相加作用の如何、及び反応オシレーション等の問題の解明・解決の課題へと収束しつつある。

本研究ではこのために、1)現在存在する低用量作用関連の情報(米・欧での低用量問題討議で用いられた未発表データを含む)を調査収集し検討するとともに、2)これまで進めてきた高次生命系を中心とした生体影響研究の側からの能動的な基盤研究による低用量影響の実態の把握を平行して推進することにより、その可能性の如何とあり得る背景機構を解析した。低用量効果が試験管内分子反応としてその実態が種々追認されているのに対して、ほとんどの個体レベル反応でそうした結果が見られない事実に鑑みて、これらの現象を引き起こす背景と実態的な障害の如何の追求についても検討を行った。あわせて、当班班員を含むこの領域で相次いで発見されているシグナル伝達修飾因子について、それらが持つシグナルの大幅なバイアスもしくはリブレスに関する影響の研究に格段の重点をそそぎ、低用量問題の科学的認識に齟齬を生ずることのないよう、認識基盤を整備するよう研究を推進した。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名(50音順)

五十嵐 勝秀	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官
井口 泰泉	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所生命環境科学研究センター 教授
井藤 悦朗	(社)日本化学物質安全情報センター(JETOC)調査部課長
今井 清	食品薬品安全センター秦野研究所 副所長
江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所・生物試験部 部長
長村 義之	東海大学医学部 教授

垣塚 彰	京都大学大学院生命科学研究所(高次生命科学専攻 高次生体統御学講座高次生体統御学分野) 教授
加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所分子生物部門 教授
菅野 純	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 室長
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座診断病理学分野 教授
渋谷 淳	国立医薬品食品衛生研究所、病理部 室長
白井 智之	名古屋市立大学医学部 教授
鈴木 勝士	日本獣医畜産大学獣医生理学教室 教授
関沢 純	国立医薬品食品衛生研究所化学情報部 室長
中田 琴子	国立医薬品食品衛生研究所化学情報部 室長
長谷川 隆一	国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室 室長
広川 勝昱	東京医科歯科大学医学部感染免疫病理学講座 教授
福島 昭治	大阪市立大学大学院医学研究科 教授
藤本 成明	広島大学原爆放射能医学研究所予防腫瘍研究分野 助教授
三森 国敏	東京農工大学 教授
山崎 聖美	国立公衆衛生院栄養生化学部 主任研究官

A. 研究目的

環境中のホルモン様作用を示す化学物質及びそれらの作用の延長線上で引き起こされる、いわゆる内分泌かく乱障害発生の可能性に関する研究の進展は、分子間相互作用の微視的レベルでの低用量効果や反応修飾(バイアスあるいはリプレスなど)の実態を実験的事実として明らかにし、この問題の論理的危惧を深める結果となった。他方、多世代試験を始めとする多くの巨視的検討結果は低用量作用が認められないことを示している。

本研究の目的は、こうした実験的事実関係の相互の乖離に対して、そうした現象を引き起こす背景と、実態的な障害性、の相互関係を探り、この問題の本質的解決を目指すものである。また、低用量問題を構成する作用閾値の存在の如何、相乗相加作用の如何、及び反応オシレーション等の問題は、①障害性の性質、②用量相関関係、③暴露実態、の3因子によって導き出されるリスクアセスメントの根幹を論理的に危ういものにしていく。これらの解明は必然的にこの問題に対して抜本的なリスクアセスメントの展望を初めて導き出す効果を持っており、そうした乖離を引き起こす背景の解明が、この問題の本質を明らかにする可能性を持つものと期待される。その結果、行政的に経済協力開発機構(OECD)や米国環境防護庁(EPA)との共同で進めてきた子宮肥大試験やハーシュバーガー試験等に代表されるホルモン様作用を基礎としたスクリーニング試験ならびに、その後に開発の求められている確定試験開発の方法論的基盤整備を整えることになるものと考えられる。具体的には、生理的作用と生体障害性の関連等低用量問題にかかる報告の文献的調査(関澤ら)を進める傍ら、性ホルモンおよび化学物質の作

用メカニズム、発生中の動物の組織特異的な臨界期ならびにその分子的な基盤(井口)、鶏胚を用いた発生全経過に対する影響の解析(鈴木)、感染に対する生体防御機構として働く免疫系の機能に対する影響(広川)、アレルギーや化学物質過敏症との関連(山崎)、これまでその分子機構が全く明らかになっていない孤児受容体と内分泌かく乱物質の低用量影響(垣塚)、神経系初期発生に対する低用量内分泌かく乱化学物質の影響(菅野)、核内レセプターを介した標的遺伝子群の転写制御(加藤)、ステロイド受容体の発現調節機構(藤本)、性ステロイドの代謝系に対して及ぼす影響(笹野)、ホルモン受容体に支配される遺伝子群の網羅的発現解析のためのcDNA マイクロアレイ技術の導入と班研究のサポート(五十嵐)等の諸領域にわたって研究を遂行した。

B. 研究方法

I. リスク調査研究

2000年10月に米国環境防護庁(US EPA)が行った低用量問題に関する文献査読会議で使用した文献および、独自の文献検索により見出された前記会議後に出版された文献のうち vom Saal らのグループによる5報告について、試験条件における問題点に分けて検討した。後者については、用量-作用曲線パターン、閾値の有無、反応オシレーション(逆U字現象など)の有無、反応における相加・相乗性の有無を中心に検討を加えた。前記査読会議報告を参考のため翻訳した。

II. 基盤研究

【生殖】

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響(井口泰泉)

1. DNA マイクロアレー法により、新生仔期および卵巣摘出マウスの子宮での遺伝子発現を解析し、エストラジオール、合成エストロゲン、ビスフェノール A、ノニルフェノール等によって発現が調節される遺伝子を明らかにする。
2. 発現が変化する遺伝子をリアルタイム PCR により確認する。
3. 低用量から高用量までの化学物質による遺伝子発現に対する影響を調べる。
4. ビスフェノール A の低用量影響を調べる。
5. マウスを用いて周生期のエストロゲンによる生殖器官の組織不可逆化に関連する遺伝子を Differential Display 等により検索する。
6. ラットミューラー管の発達過程におけるエストロゲン受容体発現および上皮成長因子の発現を解析する。

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用および低用量影響に関する研究(鈴木勝士)

EPAの投与は、発生ステージがステージ10近くで比較的良好そうSPF白色レグホン種の有精卵を日生研株式会社より購入した。有精卵を1回の実験で10個用い、孵卵器(ベビー孵卵器A型:昭和孵卵器製)内の所定の10カ所に置き、温度 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度80%以上、1時間に1回転卵の条件で48時間孵

卵した。孵卵開始48時間後に鶏胚を摘出し70%エタノールにて固定した。固定後、実体顕微鏡下で鶏胚の形態学的観察を行った。

0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, または 10.0 μ g/embryo のBPA(和光純薬、分析用標準品)を鶏受精卵に投与し、48 時間孵卵して鶏胚の発生状況について対照と比較した。成績には昨年までの高用量群の成績も加えることとした。卵殻の一部を円鋸を用いて切開し、直視下で胚直下の卵黄内に 1 μ l /10g 卵重の割合でBPA 溶液または溶媒溶液(DMSOを含むPBS)を投与した。投与後切開部位をサララップで閉鎖、シリコンゴム(KE3475T:信越化学製)でシールし、上述の条件で孵卵した。胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常などの有無および胚発生の遅延(体節数低下)を指標として形態学的に検討し、用量相関性の有無について検討した。

【免疫】

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する影響(広川勝彦)

1. 動物:2週齢および胎生 15 日齢 C57BL/6 マウスを用いた。
2. 内分泌かく乱化学物質:Diethylstilbestrol (DES, Sigma: D4628)、Bisphenol A (BPA, Wako: 025-13541)、17 β -Estradiol (E2 Nakarai: 14541-61)、p-n-Octylphenol (OP, Wako: 159-0261)、Benzyl n-butyl phthalate (BBP, Wako:023-06371) を DMSO に溶解して用いた。
3. 胸腺リンパ球の in vitro における増殖能への影響:C57BL/6 マウスより調整した胸腺リンパ球浮遊液 (5×10^5 /well)にConcanavalin A: 2.5 μ g/wellとDMSO(最終濃度:0.1%)に溶解した各種内分泌かく乱物質(最終濃度:1nM~250nM)を添加し培養、培養 18 時間で 3 H-Thymidine (9.25Bq/well)を加え、更に 6 時間後細胞を回収して 3 H-Thymidine の取込み量をシンチレーションカウンターで測定し胸腺リンパ球の増殖能を測定した。
4. 胸腺微小環境内における未熟胸腺リンパ球の増殖・分化への影響:胎生 15 日齢 C57BL/6 マウス胎仔胸腺を 2-deoxyguanosine (dGuo) 添加培養液上に浮かせたフィルター上にのせ 7.5% CO₂ 存在下で7日間培養し、胸腺内リンパ球を除き、ストローマのみの胸腺を調整した。この dGuo 処理胸腺ストローマと新に調整した胎生 15 日齢 C57BL/6 マウス胎仔未熟胸腺リンパ球を混合培養した。その際に DMSO に溶解した各種内分泌かく乱物質(最終濃度:1nM~250nM)を添加し、70%O₂ 条件下における高酸素下胎仔胸腺組織培養(HOS-FTOC)を行い、7日後に未熟胸腺細胞を回収し FITC-抗 CD4 抗体と PE-抗 CD8 抗体を用いた2重染色を施しフローサイトメリーにて未熟胸腺リンパ球の増殖・分化への影響を検討した。

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(山崎聖美)

1. DTH:マウスは、BALB / c メス(5w, 7w)を用いた。マウスにニルフェノール(NP)、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジブチル(DBP)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)を 50mg / kg / day になるよう一定期間強制経口投与した。コントロール群はコーンオイルを同期間投与した。また、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)は 50mg / kg / day にな

るよう一定期間混餌投与した。ヒツジ赤血球をマウス腹腔に投与し、感作の成立する1週間後に、マウス足蹠にヒツジ赤血球 50 μ l を惹起抗原として皮内注射し、24 時間後にマウスの足の厚さをダイヤルシックスゲージを用いて測定した。この値から、注射前に測定した値を差し引き、足の腫れを求めて DTH を検出した。

2. 細胞内カルシウムイオン濃度の測定: Jurkat 細胞に Fura-2 を取り込ませ、蛍光光度計を用いて、NP、BPA、DEHP、DEP、DBP、BBP、DCHP を添加した時の細胞内カルシウムイオン濃度の変化について調べた。

【神経】

核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析(垣塚 彰)

ステロイドやレチノイドのようなはっきりとしたリガンドを持たない核内受容体類似蛋白質は、孤儿受容体と呼ばれ、ゲノム解析から、数多く存在することが知られているが、その活性化メカニズムは、ほとんど判明していない。そこでその活性化に必須な役割を果たすコファクターの解析を行った。特に、組織特異的かつ細胞の分化や刺激によって発現が高まる新規核内受容体コファクター群の同定を目指した。さらに、この新規コファクター群の孤儿受容体を活性化する能力を生体内で再現するため、トランスジェニックマウスを作製・解析した。

神経系初期発生におけるエストロゲンレセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析(菅野 純)

1. マウス胎児神経幹細胞培養(ニューロスフェア培養): マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後に培養系に移す。培養培地(N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、progesterone、putrescine、apoptosis factor、亜セレン酸 Na を添加したもの))には bFGF (10ng/ml) および、EGF (25 ng/ml) を添加し、 10^6 個/6ml の密度で細胞を 10cm シャーレ(ヌンク社)に移す。7 日間培養し、形成される凝集塊(ニューロスフェア)の数と直径を測定したを、その直径毎に区別してカウントした。

2. マウス胎児神経上皮細胞培養(接着培養): マウス C57BL/6 妊娠 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し、ピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。ピペットを用い細胞にばらす。培地(N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、progesterone、putrescine、apoptosis factor、亜セレン酸 Na を添加したもの))に bFGF (10ng/ml) を添加し、あらかじめポリ-L-オルニチン、フィブロネクチンでコーティングした 10cm シャーレ(ヌンク社)に 1 胎児分の細胞/6ml の密度で細胞をまいた播種。4 日間培養し、ピペッティングにて細胞をはがし、生細胞数をカウント後、 1.2×10^5 /500 μ l の細胞密度で 4well チャンバースライドにまく。神経幹細胞の増殖検討には bFGF を、ニューロンへの分化検討には因子を添加せず、アストロサイトへの分化検討には LIF と BMP2 を添加し、2 日間培養した。その際、各濃度の DES を共存させ未分化状態の維持および、分化に対する影響を、各細胞種に対す

るマーカー蛋白質に対する免疫染色を用いて検討した。

3. 免疫染色: チャンバースライドから培地を除き、4%ホルマリン/PBS(-)にて15分間固定し、一次抗体にマウス抗(マウス抗 nestin, マウス抗 MAP2, ラット抗 GFAP)、を用い、二次抗体に(FITCラベル抗マウス IgG、Texas Redラベル抗ラット IgG)を用い、蛍光免疫染色した。同時に核をHoechst染色し、全細胞数計数に用いた。

4. DES in utero 暴露: DESはコーンオイルに溶解し、妊娠11日目から14日目まで2 µg/kg連日皮下投与した。

5. 定量 RT-PCR 解析: 形成されたニューロスフェアを回収し、ISOGEN(日本ジーン社)を用い、全RNAを抽出した。得た全RNAをキアゲン社のRNeasyキットを用いて精製した。アプライドバイオシステムズ社(ABI社)のRNA PCR kitを使用し、添付のプロトコールに従ってoligo dTをプライマーに用いて逆転写反応を行いcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型にABI社のTaqMan universal PCR Master Mixを用い、ABI PRISM7700にて定量PCRを実施した。プライマー、TaqManプローブはABI社のPrimerExpressを用いて設計した。

6. GeneChip 解析: 形成されたニューロスフェアを回収し、ISOGEN(日本ジーン社)を用い、全RNAを抽出した。得た全RNAをキアゲン社のRNeasyキットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全RNA 5 µgをT7プロモーターの付加したオリゴ dTプライマーを用い逆転写しcDNAを調製し、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(アフィメトリクス社キット)を用い、ビオチン化CTPを共存させつつcRNAを合成した。cRNAはキアゲン社のRNeasyキットにて精製後、300-500bpになるよう断片化し、GeneChipターゲット液とした。GeneChipにはマウスMGU74Av2を用いた。ハイブリダイゼーションは45°Cにて16時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルstreptavidinにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社のGenespringを用いて解析した。

【核内レセプター】

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究(加藤茂明)1. ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

ショウジョウバエにヒトARを組織特異的に発現する系を構築した。下流のリポーター遺伝子はGFPを用いた。ARのリガンド依存的な転写機能はGFPの発現、すなわち蛍光として観察できる。このハエのラインに、CBP欠損変異体(Nejire)のハエラインまたは、転写共役因子遺伝子を欠損したハエライン群を掛け合わせることで、当該転写共役因子のヒトARに対する生体内機能を検討した。

2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

昨年までの本研究課題において、ER特異的な転写共役因子(p68、p72)の同定及び機能解析を行ってきた。更に既知転写共役因子複合体との相互作用を検索した結果、CBP-p300、p160ファミリーを含む複合体と相互作用することを明らかにした(Watanabe et al., 2001)。さらに新たな転写共役因子複合体を同定するために、HeLa細胞核抽出液より当該因子の精製を試みた。具体的な方法としては、ヒト

ER α のリガンド結合領域(AF-2)をエストロゲン存在下プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。これらの複合体のヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性の有無も検討し、いくつかの構成成分の同定も行った。

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究(藤本成明)

B-1. ラット前立腺での ER mRNA 発現調節

B-1-1.Hormones

17 β -estradiol and diethylstilbestrol (DES) were purchased from Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A.; and testosterone (T) was from Wako Junyaku KK, Osaka, Japan. They were dissolved in ethanol to give stock solutions.

B-1-2. Animal experiment

Male F344 rats were purchased from Charles River Co., Kanagawa, Japan. They were maintained with free access to basal diet and tap water. All experiments were conducted under the guidelines of the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" of Hiroshima University. Animals were sacrificed under anesthesia and the ventral and dorsolateral prostate tissues were dissected and separately frozen. Blood samples were collected from the abdominal artery and separated sera were stored at -20°C until assayed

Experiment 1. One, 2, 4 and 9 week-old rats were maintained for a week and sacrificed to examine the prostate gland.

Experiment 2. Four and 9 week-old animals were castrated and treated with 5 mg of T in a silicone tube for a week. For 2 week-old rats, 0.5 mg of DES in a silicone tube was given instead of castration. They were treated with 0.5 mg of T in silicone tube for a week.

Experiment 3. Four week-old male rats were castrated. One week later, 10 mg of T was administered i.p. They were sacrificed at hours 0, 3, 9, 24 and 48 after an injection.

B-1-3. Cell culture

Two androgen independent rat prostate carcinoma cell lines, AT3 and PLS10, were maintained in DMEM (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo., USA) containing penicillin and streptomycin with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco/In vitrogen, CA, U.S.A.). For hormone treatments, the medium was changed to phenol red free DME (Sigma Chemicals) containing the same antibiotics along with dextran-charcoal treated FBS for a week.

C. B-1-4. PCR PRIMERS

RER-*alu* and RER-*ald* with the sequences 5'-AATTCTGACA ATCGACGCCA G (473-493) and 5'-GTGCTTCAAC ATTCTCCCTC CTC (794-816) were employed for rER α detection (344bp), and RER-*blu* and RER-*bld* with the sequences 5'-TTCTTGGCAG CACCAGTAAC C (38-58) and 5'-TCCCTCTTTG CGTTTGGACT A (279-299) were employed for rER β detection (262bp). For

construction of an ER \square competitor, RER-a2u, RER-a2d, RER-a12u (RER-a1u linking to RER-a2u) and RER-a12d (RER-a1d linking to RER-a2d) with the sequences 5'-GAGACTCTCC AGCAGCAGCG AG (515-536), 5'-AAAGCCTTGC AGCCTTCACA GG (605-626), 5'-AATTCTGACA ATCGACGCCA GGAGACTCTC CAGCAGCAGC GAG and 5'-GTGCTTCAAC ATTCTCCCTC CTCAAAGCCT TGCAGCCTTC ACAGG were used. For the ER \square competitor, RER-b2d and RER-b12d with the sequences 5'-GAGGTTCTGC ATAGAGGAGC G (152-172) and 5'-TCCCTCTTTG CGTTTGGACT AGAGGTTCTG CATAGAGGAG CG were applied.

B-1-5. Construction of competitive cDNA

A rER \square plasmid was mixed with 20 pmol each of primers RER-a2u and RER-a2d in a total volume of 50 μ l containing 1.25 U of Ex-Taq Dnase polymerase (Takara Shuzo Co., Otsu, Japan), 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 2 mM MgCl₂ and 50 mM KCl. and a 112-bp DNA fragment was isolated with a GFX Gel Band Purification Kit (Amersham pharmacia biotech, Uppsala, Sweden). Using this fragment as a template, a further PCR amplification with primers RER-a12u and RER-a12d and gel purification were performed to obtain a 126-bp competitor DNA for ER \square . The same procedures with RER-b1u and RER-b2d followed by amplification of RER-b1u and RER-b12d was performed to obtain the ER \square competitor (156 bp). The sequences of the resulting DNA fragment were confirmed with a capillary sequencer, ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

B-1-6. Reverse transcription (RT) and Competitive PCR

Briefly, total RNAs from cells were prepared by a modified acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method and treated with RQ1 DNase (Promega). 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed with 100 U of MMLV-RT (Life Technologies) and 1.25 pmol of oligo-dT primers.

Sample cDNA (equivalent of 0.2 μ g of total RNA) and competitor DNA at various concentrations (0-20 fg) were co-amplified by PCR with Ex-Taq using the RER-a1u and RER-a1d primer set. The amplification condition was as described above in the final volume of 20 μ l. Each PCR product was electrophoretically separated on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide at 0.2 μ g/ml. The image was digitized with a video capturing device, PrintGraph (Atto Co., Tokyo, Japan) and intensities of the blots were quantified using a software, Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD, U.S.A.). The log ratio of the blot intensities of sample cDNA over the competitor in each lane was plotted against amounts of the competitor. Quantity of rER mRNAs was determined where the ratio was equal to 1.

B-1-7. ER assay by the competitive binding method

The cytosol fraction of prostate tissues were prepared in TEDMG buffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM disodium EDTA, 1mM dithiothritol (DTT), 10 mM sodium molybdate and 10% (v/v) glycerol, pH 7.4) and incubated in 0.05-50 nM of [¹⁷ β -2,4,6,7-³H]- estradiol (NEN Life Science Products, Boston, MA, U.S.A.), with or without a 100-fold molar excess of unlabelled estradiol (10 nM), at 30°C for 40 min.

The bound [³H]-estradiol was separated by the hydroxyl apatite method. Binding data were analyzed by Scatchard plotting.

B-1-8. Serum T levels

Serum T was measured by a RIA kit for rat serum 17 β -estradiol, purchased from Immunotech Inc. (Marseille Cedex, France).

B-1-9. Statistical analysis

Statistical comparisons were made using the Student's t-test.

B-2. 5'-RACE(5'-Rapid Amplification of cDNA Ends)法による cDNA5'端の検索

10週齢の F344 ラットから抽出した前立腺、卵巣、子宮および前立腺癌培養細胞 AT3、DT3、PLS10 よりグアニジン酸チオシアネート-フェノール-クロロホルム変法にて全 RNA を抽出した後、OligotexTM-dT30[Super] (Takara)を用いて poly(A)⁺mRNA を精製し、これを鋳型に 5'-Full RACE kit (Takara)を用いて 5'-RACE 反応を行った。すなわち 5'端をリン酸化した rER β の gene specific primers (GSP-ER β , Table 2)を用いて、AMV reverse transcriptase により 30 $^{\circ}$ C、10 min、50 $^{\circ}$ C、60 min、80 $^{\circ}$ C、2 min インキュベートして得られた1本鎖 cDNA を、T4 DNA ligase により環状構造とした。さらに、これを鋳型に2組のアダプタープライマーを用いて nested-PCR 反応し、未知の 5'端を増幅した。得られた cDNA クローンの塩基配列を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems, CO, USA)により決定した。

【ステロイド代謝】

ヒト成人及び胎児組織における steroid sulfatase 及び estrogen sulfotransferase の分布に関する研究
(笹野公伸)

対象:本研究に用いた成人組織は、死後3時間以内に施行された剖検例より採取した(男性3例:24、84及び87歳、女性2例:15及び38歳)。また胎児組織についてはelective terminationにより得られた胎児(17-21週齢の男女)より採取した。なお、採取した組織ではいずれも病理組織学的な異常は認められなかった。

定量的PCR (Real-Time PCR):得られた組織の一部は、ただちに5mm角に細切り、液体窒素にて凍結した。凍結組織はTRIzol reagent (GIBCO BRL / Life Technologies, Gaithersburg, ND)を用いてホモジナイズし、phenol-chloroform 法にてtotal RNAを抽出してOligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, ND)を用いてcDNAを作成した。STS及びESTのPrimer を用いてPCRを行った。PCR反応は、Light Cycler System (Roch Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を使用し、二本鎖DNAに特異的に結合する蛍光色素 (SYBER Green I, Roch Diagnostics)を取り込ませ、PCR産物量に応じた蛍光強度を計測し、産物量の定量を行った。PCR反応終了後は、2%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにてUV下で発色し、PCRバンドを確認した。陽性対照としてSTSは胎盤組織を、ESTは肝癌細胞(HuH7)を用いた。なお、同一サンプルのglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を同様に定量して、STS及びESTのmRNAの発現量をGAPDH mRNA の発現量に対しての比率として算出した。それらの値について、それぞれの陽性対照での発現を100%とした時の割合を求めて評価した。

免疫組織化学:得られた組織は定法に従ってパラフィンに包埋し、3µmに薄切した。STS はEnvision (DAKO Co. Ltd., Carpinteria, CA, USA)を ESTはHistofine SAB-PO (R) kit (Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用い、biotin-streptavidin法により染色を施行した。免疫組織化学に用いた抗体はanti STS mouse monoclonal antibody (KM1049、協和発酵工業株式会社、東京)及びanti estrogen sulfotransferase polyclonal antibody (SULT1E、BML、群馬)を使用した。これらの1次抗体の希釈倍率はSTS: 1:3,000、EST: 1:750である。ESTの免疫染色では抗原賦活処理としてマイクロウェーブによる熱処理(500W、15分)を加えた。反応後の抗原抗体複合体は3,3'-diaminobenzidine (DAB)にて発色し、ヘマトキシリンにて核染して鏡検した。陽性対象として、STSは胎盤組織をESTでは肝組織を用いた。

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立(五十嵐勝秀)

1. マウス組織からの RNA の分離精製:マウス組織を分離後すみやかにRNAlater (Ambion 社)に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが5mm以下となるように細切した。その後、RNA抽出操作まで-80°Cにて保存し、RNAlater を除いた後、ISOGEN(日本ジーン社)を用いて全 RNA を抽出した。得た全 RNA は、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製し、1µg を電気泳動し分解の有無を検討した。

2. スライドガラス型マイクロアレイ解析:スライドガラス型マイクロアレイとしては、主にクロンテック社から市販されている Glassarray (Mouse Glassarray 1.0:1081 遺伝子/アレイ、全長 cDNA)を用いた。他にヘリックス研究所より供与されたスライドガラス型マイクロアレイ(2241 遺伝子/アレイ、全長 cDNA)も検討した。ターゲット液の調製は、(1)蛍光物質(Cy3, Cy5)を直接 cDNA 合成時に取り込ませる方法および、

(2)cDNA にはビオチンもしくは Fluorescein を取り込ませ、ハイブリダイゼーション後に抗体を用いて Cy3, Cy5 を付加して検出する方法 (Tyramide signal amplification 法) の 2 種類を検討した。(1)の方法にはクオンテック社の Glassarray fluorescein labeling kit を用い、添付のプロトコールに従った。(2)の方法には NEN 社の TSA kit を用い、添付のプロトコールに従った。

3. Spike RNA: マウス遺伝子と相同性の無い Lamda phage DNA (Bacteriophage lamda B (capsid component) を spike RNA に用いることとした。Plasmid vector pBluescriptII を鋳型に PCR にて増幅して RNA を得た。増幅断片に poly A 配列 (16ヶの A) および T7 promoter 配列を 3' 側に付加し、同 plasmid vector に組み込んだ。Ambion 社の T7 in vitro transcription kit を用い、添付のプロトコールに従い、RNA を合成後、RNA 量を測定し、spike RNA として用いた。また、Spike RNA の検出・定量のための定量 RT-PCR 用のプライマーは ABI 社の PrimerExpress を用いて設計した。

4. GeneChip 解析: マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存した。RNAlater を除いた後、ISOGEN (日本ジーン社) を用い、全 RNA を抽出し、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 µg を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、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 (アフィメトリクス社キット) を用い、ビオチン化 CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy 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 にはマウス MGU74Av2 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16 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、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

5. マウス視床下部材料の分離: マウス C57BL/6 妊娠 16 日目、17 日目、18 日目、出生後 1 日目の胎児より、視床下部領域を分離し、すみやかに RNA later に浸漬した。4°C で 1 晩置いた後、-20°C で RNA 抽出まで保存した。同時に胎児組織 (尾部) を分離し、ProteinaseK 処理した後、Y 染色体特異遺伝子を PCR 検出することにより性別を判定した。性別決定後、視床下部組織を性別にプールし全 RNA を分離精製した。

6. DES in vivo 暴露: DES はコーンオイルに溶解し、妊娠 16 日目から 18 日目まで母体体重あたり 0.2 あるいは 2 µg/kg を連日皮下投与した。溶媒対象にはコーンオイルを用いた。

C. 研究結果

I. リスク調査研究

以下文献を分担し、精査した報告をまとめて列記する。

(1) 低用量作用について、a 試験条件 (動物を含む) の違い、b 観察条件の違い、c 未解明のメカニズムによる影響の関与など、最新の約 70 の文献を精査し、データベースを作成した。また、陽性対照であるジエチルスチルベステロール (DES) について再現性を得られる試験条件の検討を行った。さらに BPA の低用量での内分泌かく乱影響が指摘されているため、BPA 原料樹脂が医療器具分野で利用される

際、溶出による影響に関するリスクベネフィットについて検討した。

(2) 調査依頼のあった 5 編の文献について査読を行った。そのうち、Weishons W.V.らの総説では、estradiol(E2)、bisphenolA(BPA)、octylphenol(OP)、diethylstilbesterol(DES)、methoxychlor(MC)が、いずれも妊娠動物に投与すると低用量で F1 動物の前立腺重量が増加すると報告しているが、総説であることから内容の妥当性を評価するためには、詳細な記述が不足していた。他の 3 論文は、いずれもエストロゲン様作用物質に対する F344 ラットと SD ラットの反応性を比較した論文で、SD ラットに比較すると F344 ラットの方がより低用量で反応することを明らかにした論文であるが、いずれも卵巣摘出という特異的な条件下で行われた実験であり、使用した動物数が少ないことなど低用量問題を評価するためには不十分な実験と判断された。他の 1 つの論文は、新生児期に BPA、OP、DES を投与して血中プロラクチン濃度、視床下部、下垂体前葉、子宮、前立腺のエストロゲン受容体の発現を比較して、各エストロゲン様作用物質の作用機序が異なるのではないかと推論しているが、1 群の動物数が少ないこと、測定値の変動幅が大きいことなどから、結論を導くためには更なる実験の追加が必要であると思われる。

(3) 内分泌かく乱物質の濃度とそのホルモン活性作用は、S 字曲線で示されると考えられていたが、感受性限界濃度以下においても生体に対する影響が観察され、U 字曲線を描くという報告も存在し、未だ意見の一致を見ない。これらの問題を解決すべく様々な *in vivo* 試験法の開発が試みられているが、飼料に含まれる植物由来のエストロゲン様物質や実験動物の遺伝的背景などが試験に影響を与える因子を考慮し、実験系をデザインする必要がある。

(4) 文献検索などの結果により、低用量問題は、内分泌かく乱化学物質の関わりの可能性が問われている精子の質的・量的変化、免疫系への影響、子宮内膜症などの諸問題のそれぞれに関わっていると考えられた。その際に、前立腺肥大または子宮の発育加速が前立腺、または子宮/卵巣がんのような臨床上の病的状態と関連しているか否かを確定する実験的モデルをデザインする必要がある。

(5) 内分泌かく乱物質による低用量暴露問題について、文献による発がん・一般毒性についての低用量影響に関する調査を行った。担当分の実験報告から、調査問題に関して肯定的な知見を得ることは出来なかった。一方、低用量影響に関しては、同一種においても系統による遺伝的背景の差が大きく関与しうる点が特筆すべき知見を思われた。本件は今後の検討試験に利用される動物種、系統の選択にあたり事前検討の重要性をさらに示すものを考えられた。

(6) Newbold らの 1995-2000 年に実施された CDI マウスを用いた DES ないしタモキシフェンの経胎盤投与あるいは新生児投与実験についての文献について検討した。DES の胎生期暴露においては、雌雄の生殖器に腫瘍を含めた種々の異常が誘発されるが、それらの誘発には閾値がないことが示された。一方、タモキシフェンの胎生期暴露では、高用量群で子宮発癌の頻度が高いことから、高用量暴露では estrogen agonist として作用するものを推察された。

(7) 内分泌かく乱物質の周生期暴露に関する 35 文献 (1 つの学会発表抄録を含む) について、用量-作用曲線パターン、閾値の有無、反応オシレーションの如何、相加・相乗性の如何、にポイントをおいて調査を実施した。

まず、Wolf(2000): *Biology of Reproduction*, 62(Supplement), p247(学会抄録)では、妊娠ラットに

Testosterone propionate を投与し、出生時期、一腹の児の数、産児の体重/肛門生殖器間距離(AGD)/乳うん(areola)の数/膣開口の有無を検索している。用量-作用曲線パターンについて、著者の主張としては低用量でホルモン作用、高用量で毒性出現であり、厳密には判定はできない。閾値については、出産時期の遅延・産児数の減少が高用量で、産児の体重減少/AGD の短縮(雄)/areola の数の減少(雌)/膣開口の遅延が低用量から認められている。

Lee(1998): *Endocrine* 9(1): 105-111 では、4-Nonylphenol を雄ラットの産児に3用量で投与しているが、用量-作用曲線パターンは、体重・生殖器/副生殖器の重量(絶対)/AGD で用量反応性を認め、閾値については体重低下と生殖器/副生殖器の絶対重量低下が中間用量から、AGD の短縮が高用量で認められている。著者はエストロゲン受容体を介した機序と解釈しているが、投与に起因した体重増加抑制による二次的な変化と判断した方が妥当と考えられる。

Tylら(1999): *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30: 81-95 は、Octylphenol のラットを用いた二世世代投与試験を行い、親の生殖器、妊娠・授乳、産児(二世世代目)の春期発動を観察し、用量反応性と閾値に関しては、いずれも高用量のみでの反応を認めている。著者らは、Octylphenol に低用量での反応性無しと判定しており、妥当と考えられる。

Tylら(2000): RTI Study No 65C-07036-000(Draft Final Report)は、ラットを用いた bisphenol A の三世世代投与試験の報告であるが、親及び産児の生殖能、妊娠・授乳、産児(二世世代)の春期発動を観察している。用量反応性に関しては、高用量域での体重低下とそれに関連した変化を認めている。また F2 で低用量域から包皮分離のごく軽度の遅延を確認している。著者らは bisphenol A に低用量での反応性無しを判定しており、妥当と考えられる。閾値の有無に関しては、体重低下には閾値が存在し、F2 産児での中・低用量域で有意差のつくパラメータ変動を認めるが、反応自体はごく軽微で影響とは捉えられない。

最後に、Cagenら(1999): *Toxicol. Sci.* 50: 36-44 は、マウスを用いた bisphenol A の妊娠期間暴露の実験であるが、高用量域で雄産児の体重の増加(用量依存性無し)を認めるものの、生殖腺・副生殖腺、精子産生に影響は認められていない。著者らは bisphenol A に低用量での反応性無しと判定しているが、妥当と考えられる。

(8) von Saal らのグループによる報告について、試験条件における問題点と、結果の解析における問題点に分けて検討した結果、その試験条件においては、使用した動物種の系統的背景や飼育方法において他のグループの実験とは異なる特徴的な点が認められる。また、結果の解析において、bisphenol A による低用量影響は設定投与用量の少なさから十分な容量依存的な検討ができないものがあったが、estradiol や diethylstilbestrol を使用した実験は、高用量とは異なる低用量効果の存在を示唆しているものであると考えられた。

(9) ノニルフェノール、ゲニスタイン、エチニルエストラジオール等エストロゲン様効果が疑われる化合物を用いた実験の文献を調査して低用量で見られる影響について検討した。腹腔内注入実験については不明な点もあるが、食餌中にこれらの化合物を加えた影響を調べる実験では顕著な反応が見られ、ヒトへの影響も示唆されている。

(10) methoxychlor(MXC)をラットの母児に投与したところ、全投与群の児に膣開口促進、子宮、卵巣および精嚢の重量低下、雌児FSHレベルの低下が見られた。Vinclozolin投与後のラット雄児に最低投与量から肛門生殖突起間距離短縮および乳頭・乳輪保持が見られた。これらの実験では従来のNOEL以下の投与量で影響が観察された。ラット2世代繁殖試験では、nonylphenolの最低投与量の毒性影響、bisphenol Aの最低投与量では観察されていない。

(11) von Saalのグループの1997-1999年公表の、DESをエストロゲン作用物質の陽性対照として、低用量のBPA、MXC、pp'-DDTを妊娠マウスに投与して得られた児動物での、性成熟、(副)生殖器重量、攻撃行動、エストロゲン感受性に関する論文を検討した。DES0.18~0.1 μ g/kgを母マウスに妊娠11日から分娩直前まで投与すると、雄児動物の副生殖器重量の増加、子宮のエストロゲン感受性の上昇、性成熟早期化、攻撃行動の増加などを引き起こすことが、いずれの報告でも認められた。BPAについては低用量(2.4 μ g/kg/日)でDESと類似した影響が見られている。MXC、pp'-DDTではエストロゲン活性はあるものの、経胎盤暴露での上述のエンドポイントでは必ずしもDESと類似した変化が得られておらず、メカニズムが異なっている可能性がある。

II. 基盤研究

【生殖】

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響(井口泰泉)

DNA マイクロアレー法により、卵巣摘出マウス子宮におけるエストロゲン投与6時間後の遺伝子発現の変動について解析した。約一万遺伝子についての発現を調べたところ、およそ5%の遺伝子がエストロジオールにより発現が誘導されることが明らかになった。同様に合成エストロゲン、ビスフェノール A、ノニルフェノール等の投与により発現が変動する遺伝子について解析を行い、エストラジオールとは共通でないことが明らかになった。エストロゲンの濃度に依存して、子宮で発現誘導あるいは発現抑制される遺伝子数が増加した。誘導される遺伝子の約50個について、リアルタイムPCRを用いて発現誘導を確認した。発現が誘導される遺伝子を選択して、新たなアレーを組みつつある。また、新生仔の子宮では、無処理の場合でも多くの遺伝子が発現していた。エストロゲン投与では、子宮で発現が誘導される遺伝子は約30個程度であり、エストロゲンに対する反応性は生体の子宮と大きな差が認められた。

ビスフェノール A の低用量影響を調べた結果、雌の膣開口は対照群よりも有意に早い事が確認された。しかし、その雌を無処理雄と交配した結果、産仔数、性比ともに影響はみとめられなかった。

マウスを用いての周生期のエストロゲンによる生殖器官の組織不可逆化に関連する遺伝子をDifferential Displayにより探索した。出生直後のマウスに3 μ gのDESを5日間連続投与した。7週目に卵巣を除去し10日後に膣を摘出しRNAを抽出した。対照のオイル処理マウスからのRNAと比較した結果、セリンプロテアーゼは膣上皮ひ特異的に発現していることを見出した。さらに、新しいタイプのレクチンがDES処理マウスの膣で高い発現を示すことも分かった。

ラットのミューラー管の発達過程におけるエストロゲン受容体発現および上皮成長因子の発現を解析した結果、上皮成長因子の発現と細胞分裂の相関が認められた。エストロゲン受容体発現を経時的に調べ、

ミューラー管の部域特異的に受容体発現が起こることを明らかにした。

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用および低用量影響に関する研究(鈴木勝士)

BPAの鶏胚に対する作用:いずれのBPA投与群でも体節数には対照群と差はなかった。別紙図2に示すように奇形胚の発生率には明瞭な用量相関関係が認められ、0.313 μ gBPA/embryo 群でも約20%の胚において神経管の閉鎖不全などの異常が観察された。2.5 および 5.0 μ gBPA/embryo 群で認められた頭部と神経管の形成異常、および体軸の分裂による重複奇形も示されている。いずれの投与群にも胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造を呈する異常は観察されなかった。また、重複奇形は 5.0 μ gBPA/embryo 以上の用量でしか観察されず、かつ発生率も低かった。ほとんどの奇形は神経管の閉鎖不全、尾部の蛇行などであった。

【免疫】

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する影響(広川勝昱)

1. 胸腺細胞の *in vitro* における増殖能への影響:24時間の培養における³H-Thymidine 取込量で比較すると、DES、E2、OP については濃度依存性に胸腺細胞のレクチン刺激による増殖を抑制し、その培養液中の濃度は 1nM の低用量においてもコントロールの EDCs 無添加群と比較し低値を示した。なお、DES では 25nM、E2 では 75nM、OP では 100nM 以上の添加により胸腺細胞自身の生存をも不可能にした。BPA では 30nM をピークとして逆U字現象をしめした、250nM の添加でも細胞増殖は抑制されるが細胞増殖はみられた。BBP では無添加より低値を示すが濃度依存性はみられなかった。

2. 未熟胸腺細胞の胸腺内における分化・増殖への影響:フローサイトメトリー解析では胎生 15 日齢未熟胸腺細胞は CD4⁺CD8⁻のサブセットのみで構成され、前方散乱光(FSC)強度が高い大きなサイズの細胞であるが、成熟胸腺細胞になると細胞のサイズが小さくなりFSC強度が低下するとともにCD4⁺CD8⁻、CD4⁺CD8⁺、CD4⁻CD8⁻、CD4⁻CD8⁺のサブセットに分化する。このような生体内での動態が *in vitro* でも観察することが出来るのが High Oxygen Supplied-Fetal Thymus Organ Culture (HOS-FTOC)の特徴である。HOS-FTOC 7日間培養によりコントロールでは胸腺細胞の小さな細胞が増加し、CD4⁺CD8⁻ から CD4⁺CD8⁺が主をなす4つのサブセットに分化・増殖する。一方、DES、E2、OP、BPA が添加されたHOS-FTOC では対照群に較べ生存する細胞数が少なく、未熟胸腺細胞および未熟な CD4⁺CD8⁻サブセットの割合が高く胸腺細胞の分化過程が濃度依存性に抑制された。特に 50nM、250nM の添加では分化・増殖の抑制の程度が激しく細胞の生存をも危ぶまれ、7日間の培養で生存している胸腺細胞の数が激減した。BBP 添加により細胞数の減少は認められるが CD4⁺CD8⁻サブセットでの停滞はあまり認められなかった。

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究(山崎聖美)

1. DTHに及ぼす内分泌攪乱物質の影響:7週メスBALB / cマウスにNP、DEHPを5週間強制経口投与した場合のDTH、体重、肝臓重量、胸腺重量、脾臓重量、胸腺と脾臓における細胞のサブポピュ

レーションについて調べた。NP 投与群では、DTH がコントロール群に比べ減少した。さらに、体重、肝臓重量、脾臓重量が減少したが、肝臓、脾臓ともに体重に対する割合はコントロール群と変わりなかった。脾臓においては、CD3 陽性細胞が増加し、CD19 陽性細胞が減少していた。胸腺では、CD4⁺シングルポジティブ(CD4SP)細胞が増加し、CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ(DP)細胞が減少した。DEHP 投与群では、DTH がコントロール群に比べ減少した。さらに、体重、肝臓重量が減少したが、脾臓ならびに胸腺における細胞のサブポピュレーションには変化がなかった。

7週メス BALB / c マウスに BPA、DCHP を5週間混餌投与した場合についても同様に調べた。BPA 投与群では、胸腺において CD8⁺シングルポジティブ(CD8SP)細胞が減少していた。DCHP 投与群では、DTH がコントロール群に比べ増加した。脾臓においては CD4 陽性細胞が増加し、胸腺では、DP 細胞が増加し、CD4⁺CD8⁺ダブルネガティブ(DN)細胞が減少していた。

次に、5週メス BALB / c マウスに DEP、DBP、BBP を5週間強制経口投与した場合についても同様に調べた。DEP 投与群では、脾臓重量が増加し、脾臓の CD4 陽性細胞が増加していた。DBP 投与群では、DTH が減少し、胸腺においては、CD4SP、CD8SP 細胞が減少し、DP 細胞が増加した。BBP 投与群では、DTH が減少し、胸腺重量が減少した。

2. 細胞内カルシウムイオン濃度に及ぼす内分泌攪乱物質の影響: Jurkat 細胞の細胞内カルシウムイオン濃度に及ぼす NP、BPA、DEHP、DEP、DBP、BBP、DCHP の影響について調べた。Jurkat 細胞の反応性に影響を及ぼすことが明らかになっている NP、BPA、DEHP、DBP、BBP、DCHP は細胞内カルシウムイオン濃度を一過性に上昇させた。

【神経】

核内受容体・コアファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析(垣塚 彰)

1. PGC-1 (PPAR γ coactivator-1) 類似蛋白質 PGC-2 の同定と解析

これまで同定されてきたほとんどの核内受容体のコファクターは、すべての組織に発現するユビキタな因子であるが、唯一、PGC-1 (PPAR γ coactivator-1) のみが、褐色脂肪細胞に特異的なコファクターであることが明らかになっている。さらに、この PGC-1 は、寒冷刺激によって発現誘導がかかるという性格をもち、この点も他のコファクターの性質と際だった対照をなす。

我々は、白色脂肪細胞に誘導が可能な 3T3 L1 細胞の脂肪細胞への分化の過程で PGC-1 の発現がほとんど認められないことを見いだした。このことは、PGC-1 が PPAR γ の重要なコファクターであるとする考えに反するものであるが、おそらく、PGC-1 類似分子がその任を果たすと考えた。実際、EST サーチで複数の PGC-1 類似シーケンスを見つけ、そのうちの一つ(PGC-2 と命名)の全長 cDNA をクローニングした。予測どおり、PGC-2 は、3T3 L1 細胞のみならず Ob1771 細胞や 10T1/2 細胞の脂肪分化の過程で発現誘導がかかることが判明した。

次に、PGC-2 が PPAR γ のコファクターとして働くかどうかを解析した。予測に反して、培養細胞をつかった転写アッセイでは、PGC-2 が PPAR γ のコファクターとして働くとする考えを支持する結果は得られ

なかった。また、このときのコントロール実験で、PGC-1 は単独で PPAR γ の転写を活性化する能力があることを見いだした。上述したように、PGC-1 は寒冷刺激で発現誘導を受けるという性質をもつ。このことを考えあわせ、PGC-1 ファミリー蛋白質は、コファクターというよりもそのもの自身が発現調節を受け、核内受容体の蛋白質のリガンドとして働くのではないかを考えるに至った。そこで、ER などのリガンドが知られている受容体や PPAR をはじめとする種々の孤児受容体に対して PGC-1 及び PGC-2 が蛋白質リガンドとして、転写活性化を示すかどうかを解析した。

予想通り、両者は核内受容体の蛋白質リガンドとして機能し得ることが判明した。PGC-1 は、PPAR α 、PPAR γ のみならず ER や HNF4 などの複数の受容体を活性化し、一方、PGC-2 は一つのサブファミリー受容体群のみに対して蛋白質リガンドとして働くことを明らかにした。

II. PGC-1、PGC-2 のトランスジェニックマウスでの強制発現

PGC-1 ファミリー蛋白質が核内受容体の蛋白質リガンドであると想定し、これら蛋白質を過剰に発現させるトランスジェニックマウスを作製・解析した。発現を制御するプロモーターには阪大の宮崎らが作製したユビキタスに強力な発現をもたらす CAG プロモーターをもちいた。両者のマウスとも従来のトランスジェニックマウスと同じぐらいの頻度で生まれてきた。

1) PGC-1 トランスジェニックマウスの解析

PGC-1 マウスのうち数匹が生後しばらくして死亡した。これらの死亡したマウスは痩せており、PGC-1 が褐色脂肪細胞に発現して、エネルギーの消費と熱産生に関わる uncoupling protein の発現を亢進させるというこれまでの報告とよく符合する結果である。実際、同腹の野生型マウスと基礎エネルギーの消費量を比較したところ、その亢進が観察された。さらに、褐色脂肪や筋肉においてミトコンドリア数の顕著な増加が観察され、形態的にもシステルナの著明な増加が認められ、そのために、エネルギー消費が高進したものと推測された。

ミトコンドリアは、活性酸素の主たる産制場所であり、また、近年細胞死においても重要な役割を果たすことが示されている。PGC-1 マウスは種々の臓器でミトコンドリアの数の著しい増加を認めており、今後、ミトコンドリアの生体内での役割を解析する上で、重要なモデルマウスとなることが期待される。

2) PGC-2 トランスジェニックマウスの解析

PGC-2 マウスは PGC-1 マウスに比して、さらに、痩せが顕著であった。しかしながら、ミトコンドリア数の増加は認められず、別の要因が想定された。高脂肪食をあたえても PGC-2 マウスは、肥満を示さず、また、このときレプチンやインスリンの増加も軽度であり、また、血中グルコースの上昇も弱く、抗糖尿病作用を示した。さらに、遺伝性の肥満マウス KKAY との掛け合わせでも肥満を示さなかった。以上の結果は、PGC-2 がリガンドとなる核内受容体を活性化させることが、抗糖尿病作用につながることを強く示唆しており、今後の肥満・糖尿病研究に新たな視点を提供するものである。

神経系初期発生におけるエストロジェンレセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析(菅野 純)

(1) 神経幹細胞におけるエストロジェンレセプターの発現