

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 分担研究報告書

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

分担研究者 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学・獣医生理学・教授

研究要旨

これまでに、エストロン(E1)およびビスフェノール A (BPA)を、SPF 白色レグホンステージ 10 の鶏胚直下の卵黄内に投与し、エストロゲン様作用物質の初期胚への発育分化のかく乱を観察してきた。主な異常は(1) 胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造の形成、(2) 体軸の分裂ないし重複奇形、(3) 神経管閉鎖不全および屈曲など、および(4) 体節形成遅延であり、投与時期の胚発生のステージに依存してこれらの4タイプが生じることを解明してきた。E1 では4タイプ全てが生じるが、これまでの用量域でのBPA では生じなかった。また(2)~(4)には用量相関が認められた。このE1とBPAの発生攪乱に及ぼす影響の微妙な差を明らかにし、BPAの作用に域用量があるか否かを確認するために、0.313 μ g/embryo から 10.0 μ g/embryo の間を公比 2 で分割して投与し、48 時間後の発生の様子を観察した。その結果、(1)BPA には胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造を形成する作用がないこと、(2)体軸分裂が試験した用量の内高用量で低頻度に認められること、(3)神経管への影響には用量反応関係が認められ、0.313 μ g/embryo 群でも約 20%の胚に異常が出現すること、(4)体節形成には大きな影響が見られないことが判明した。ERとBPAの相互作用はE1の場合より、より作用時期が限られている可能性が示唆された。この現象を利用すれば、経時的な遺伝子発現について把握できる可能性があると考えられた。また、この作用には用量反応性があるので域用量がある可能性が高いが、この点については今後実証する必要があると考えられた。

A. 研究目的

初期発育鶏卵(ステージ 10)で ER を介して、発生ステージの微妙な変動に対応して 4 タイプの発生異常があることをこれまで E1 と BPA を用いて確認してきた。E1 では4タイプ全てが生じるが、BPA では必ずしもそうではないとの予備的な所見が得られていた。今年、BPA のERを介すると考えられる発生攪乱作用についてより詳細に、例数を増やすとともに用量域をさらに低用量の側に設定して調べるとともに、

いずれのタイプにより明瞭な用量反応相関が見られるか、およびその反応に域用量があるのかを解明することを試みた。

B. 研究方法

BPAの投与に関しては昨年までと同様に、発生ステージがステージ10近くで比較的良好にそろう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 ± 0.5°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ンラップで閉鎖、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。

(倫理面への配慮) 材料が鶏胚であるため、特に配慮しなかった。

C. 研究結果

BPA の鶏胚に対する作用

別紙図1に示すように、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。図3と4には 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が示されている。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。

D. 考察

鶏胚のステージ 10 でも早期に ER 受容体との相互作用があると胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造の形成が起こると考えられるが、BPA についてはこのような作用は調べられた最も高用量の 10.0 μ gBPA/embryo 群でも認められなかった。その次に早い時期の胚で起こると考えられる体軸の分裂に関しては、5.0 μ gBPA/embryo 以上の投与群でしか観察されなかった。神経管の閉鎖不全等の影響については調べた用量域で用量反応相関が認められた。体節数の減少などの影響についてはいずれの用量群でも影響は認められなかった。体軸の分裂については、明らかにその発生に閾値があると考えられる結果が得られた。このことは、胚盤葉下層の脱落については、より高用量の BPA を投与すれば発現する可能性があることを示唆している。しかし、BPA のより高濃度の水溶液を作成するのが物理的に困難であるので、確実には実証されていない。一方で、神経管の発生に対する影響は、0.313 μ gBPA/embryo でも約 20%の胚に発生した。また発生には明瞭な用量相関があるので、さらに低用量での実験をすることにより域用量が存在することが実証できる可能性がある。これらのことは、ER の活性化における時期特異的な影響がそれぞれ異なった表現型を生じること示唆している。今回の実験により、少なくと

も神経管の形成が冒される経路での遺伝子発現について発生時期を変えて採材することにより、関与する遺伝子がとらえられる可能性が生じたと考えられる。

今年度、ER 以外のレセプターを介しての発生攪乱が期待されるレチノイン酸(RA)についても実験する予定であったが、BPA の用量を逐次下げていっても奇形が発生し、総合的な閾値が得られなかったため、RA については実施できなかった。RA とうよによる表現型の変化がERを介する物と一致する部分があれば、ER とRAR の共通する経路が見つかる可能性があるため、さらに実験する予定である。

E. 結論

BPA の初期発育鶏卵に対する ER を介しての発生攪乱について、(1)胚盤葉下層の脱落などステージ 10 でも早期の影響については BPA は $10 \mu\text{gBPA}/\text{embryo}$ の投与によっても認められなかった、(2)その次に早期の影響としての体軸の分離は $5 \mu\text{gBPA}/\text{embryo}$ 以上の用量で、低頻度で観察され、この影響には明瞭な閾値がある、(3)神経管の発生異常には明瞭な用量相関があり、 $0.313 \mu\text{gBPA}/\text{embryo}$ でも約 20%に発現し、この作用に対する閾値はさらに低いと考えられる、との結論が得られた。今後、他のシグナル伝達系路による発生攪乱との比較により、初期のボディプランに関わる遺伝子に対する化学物質の影響が理解されると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takanosu M., Amasaki, H., Iwama, Y., Ogawa, M., Hibi, S. and Suzuki, K. (2001) Epithelial cell proliferation and apoptosis in

the developing murine palatal rugae. *Anat. Histol. Embryol.* 30, 1-6.

2. 鈴木勝士、他 25 名(2001) 内分泌学、長谷川篤彦監修、獣医5分間コンサルタント、犬と猫の診療のために、(Larry P. Tilley, Francis W.K. Smith 編 The 5 minute veterinary consult. William & Wilkins, 1997.)、学窓舎、東京、pp1286.

2. 学会発表

1. 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士(2001) ヘアレスラット(WBN/Jla-Ht rat)の病態解析と原因遺伝子のマッピング、ラット研究者会議

2. 鈴木勝士(2001)牛の遺伝性疾患「畜産現場における遺伝病の重要性」日本産業動物獣医学会平成 12 年度年次大会(奈良)、シンポジウムIV

3. 斉藤賢一、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2001)直流磁場照射がマウス胎子におよぼす奇形作用、第20回宇宙エネルギーシンポジウム

4. 鈴木勝士(2001)生殖発達毒性に関する研究、平成12年度内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムの解明等基礎的研究発表会

5. 斉藤賢一、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2001)直流磁場がマウス胎子におよぼす催奇形作用、第41回日本先天異常学会 p.96

6. 鈴木勝士、斉藤賢一、岡田美香、竹中基郎、八木美央、鈴木浩悦(2001)ビスフェノールA投

与による鶏胚での発生攪乱、第41回日本先天異常学会 p.115

7. 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士(2001)ヘアレスラット(WBN/lia-Ht)の原因遺伝子Htとヌードラットの原因遺伝子rnuとの位置関係について、

第132回日本獣医学会、p.122

8. 鈴木勝士、斉藤賢一、岡田美香、竹中基郎、八木美央、鈴木浩悦(2001)ビスフェノールA 投与による初期鶏胚での発生攪乱、第 132回日本獣医学会、p128

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

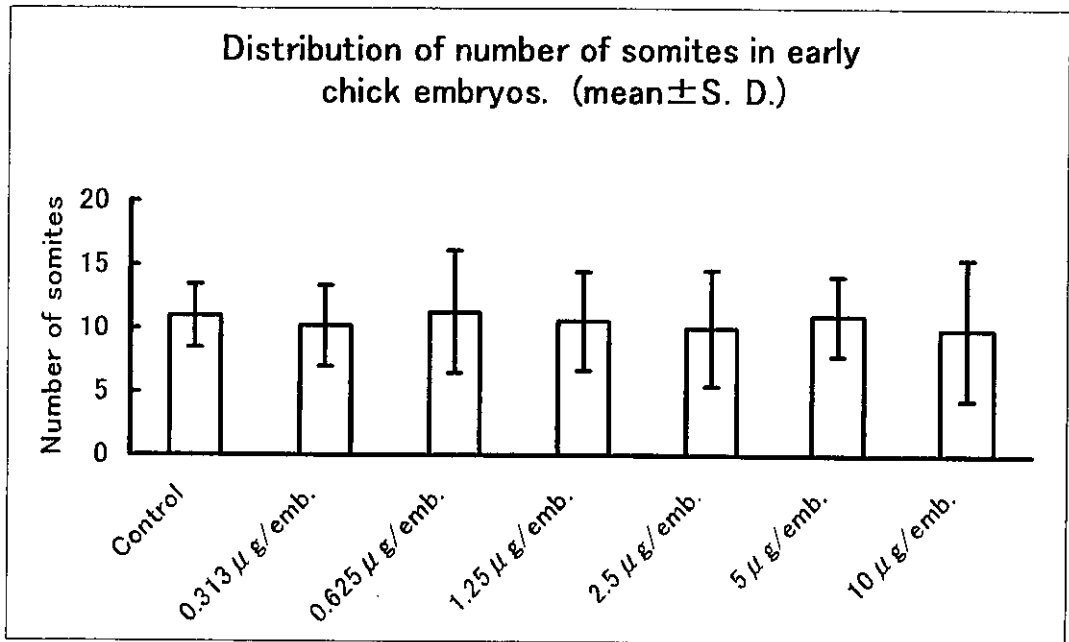


図1 体節数の分布

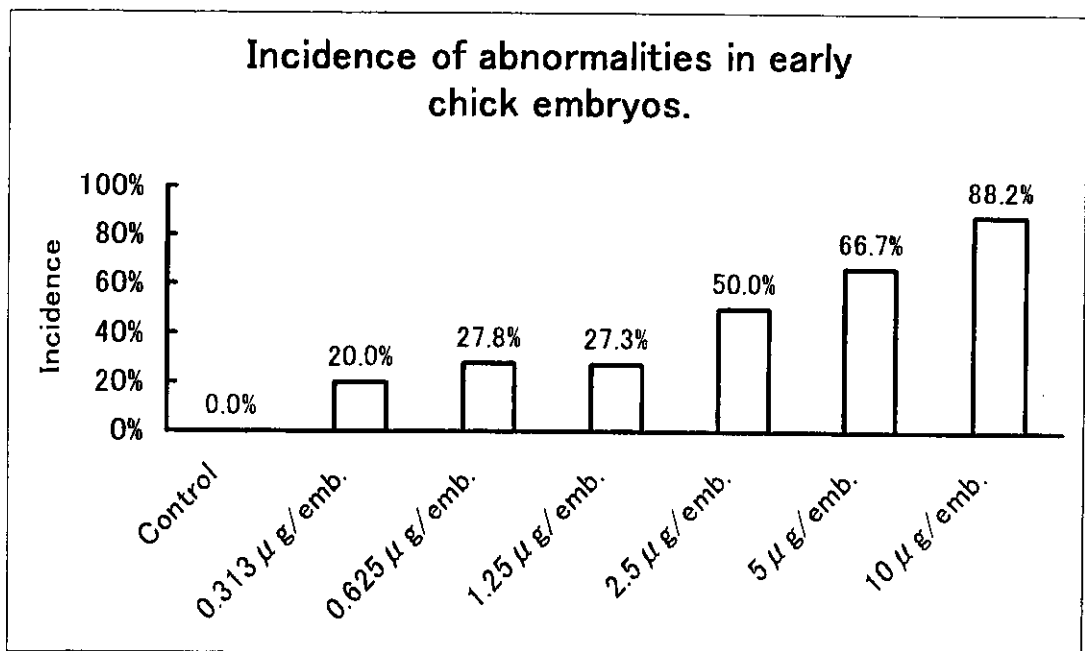


図2 奇形発生率

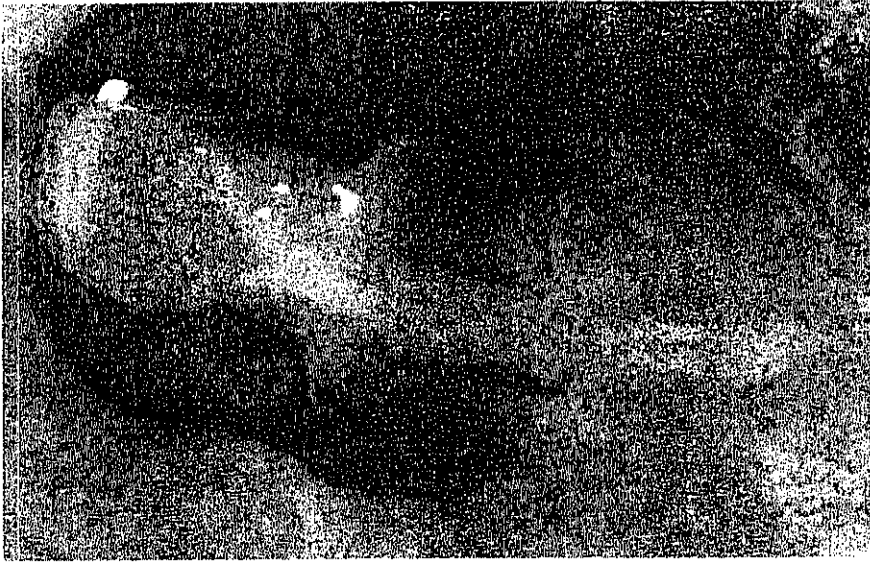


図3 2.5 μ gBPA/embryo で認められた頭部と
神経管の発生異常



図4 5.0 μ gBPA/embryo で見られた重複奇形
(体軸の分裂)

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

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研究

廣川 勝 昱
東京医科歯科大学

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDCs、5種類)の胸腺リンパ球の増殖・分化に与える影響を *in vitro* の実験系で検討した。マウス胸腺リンパ球のレクチン刺激による増殖は EDCs の低用量添加により抑制された。更に、胎仔胸腺器官培養システムにおいても、低用量の EDCs 添加により胸腺リンパ球の増殖・分化が抑制された。これらの結果により、低用量の EDC が生体内に取り込まれた場合、免疫系に影響を及ぼす可能性が十分ある事が示唆された。

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シスを維持する上で重要な役割を果たしている。ホメオスタシスの維持においては、免疫系は神経系と内分泌系との緊密な総合作用をしながらその役割を果たしている。免疫系の主要構成細胞であるリンパ球は抗体やサイトカインを作るだけでなく、エンドルフィンなどの神経伝達物質や各種下垂体ホルモンを産生し、それらに対する受容体も持つ。リンパ球はステロイドを作らないが、副腎皮質ホルモンや性ホルモンに対する受容体を持ち、ステロイドの影響を受け易いようになっている。従って、環境にある EDCs が免疫系に影響を及ぼすことは必至である。

本実験では内分泌かく乱化学物質(EDCs)として、合成ホルモン(Diethylstilbestrol: DES)、天然エストロゲン(17 β -Estradiol)、ビスフェノール(Bisphenol A)、アルキルフェノール類(p-n-Octylphenol)およびフタル酸類(Benzyl n-butyl phthalate)を用い、これら EDCs のマウス胸腺リンパ球への影響について、*in vitro* の実験系で検討した。

B. 研究方法

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へのせ 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

サイトメト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。

(倫理面への配慮)

所属施設である東京医科歯科大学実験動物委員会発行の「東京医科歯科大学における動物実験の手引きに」に従い動物実験を実施した。

C. 研究結果

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 取込量が比較すると、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(図-1)。

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 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 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 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 、 $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ 、 $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ 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できるのが 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、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ から $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 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 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 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 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ サブセットでの停滞はあまり認められなかった。(図-2、3)。

D. 考察

成熟胸腺リンパ球では低用量の EDCs の存在下ではレクチン刺激による増殖能が抑制され、用量の増加により死細胞が増加した。この事は EDCs による胸腺リンパ球の細胞死へのシグナルがレクチン刺激による増殖へのシグナルより勝っていることが低用量でも生じているものと思われる。さらに、胎仔胸腺ストローマ細胞と未熟胸腺リンパ球を用いた HOS-FTOC の実験においても、未熟胸腺リンパ球の分化・増殖が低用量の EDCs により抑制されていることが確認された。

E. 結論

低用量の EDCs が *in vitro* における胸腺リンパ球のレクチンによる増殖、及び胸腺内における胸腺リンパ球の増殖・分化を抑制することが分かった。この事から、環境にある低用量の EDCs が生体内に取り込まれれば、胸腺を始めとする T 細胞系免疫系に影響を及ぼす可能性が十分にあることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Utsuyama M, Kanno J, Seidler H, Inoue T, Hirokawa K.: Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of Diethylstilbestrol (DES) on the immune functions in mice. Submitted to Toxicology Letters

Utsuyama M, Hirokawa K.: Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice. *Exp Gerontol.* 37: 411-420 (2002).

Hirokawa K, Goto S: Research on biomedical gerontology in Japan. *Exp Gerontol.* 36: 1581-1597 (2001).

Hirokawa K, Utsuyama M, Kobayashi S.:Hypothalamic control of thymic function. *Cell. Mol. Bio.* 47: 97-102 (2001)

Pawelec G, Hirokawa K, Fulop T.: Altered T cell signalling in ageing. *Mech Ageing Dev.* 122: 1613-1637 (2001).

Utsuyama M, Seidler H, Kitagawa M, Hirokawa K.: Immunological restoration and anti-tumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice. *Mech Ageing Dev.* 122: 341-352 (2001).

Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K.: Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 142: 1419-1426 (2001).

Kitagawa M, Aizawa S, Sado T, Yamaguchi S, Suzuki T, Hirokawa K, Ikeda H: A gene therapy model for retrovirus-induced disease with a viral env gene: expression-dependent resistance in immunosuppressed hosts. *Leukemia.* 15: 1779-1784 (2001).

Nakai D, Yuasa S, Takahashi M, Shimizu T, Asami S, Isono K, Takao T, Suzuki Y, Kuroyanagi H, Hirokawa K, Koseki H, Shirasawa T.: Mouse homologue of coq7/clk-1, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:463-471 (2001).

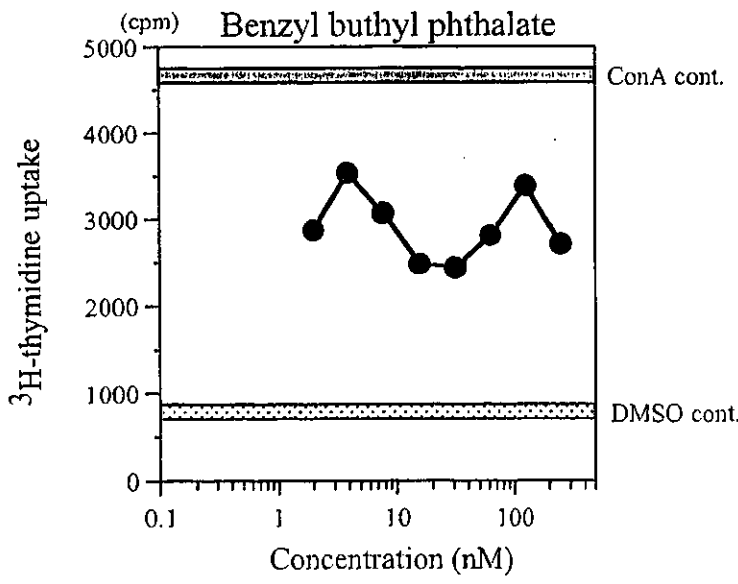
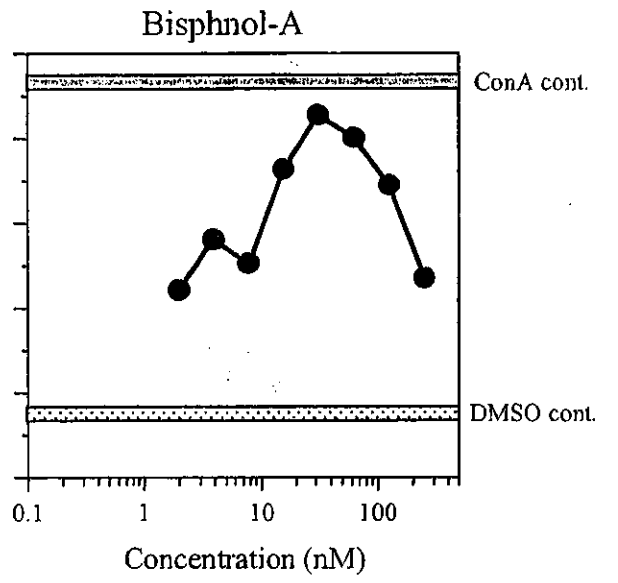
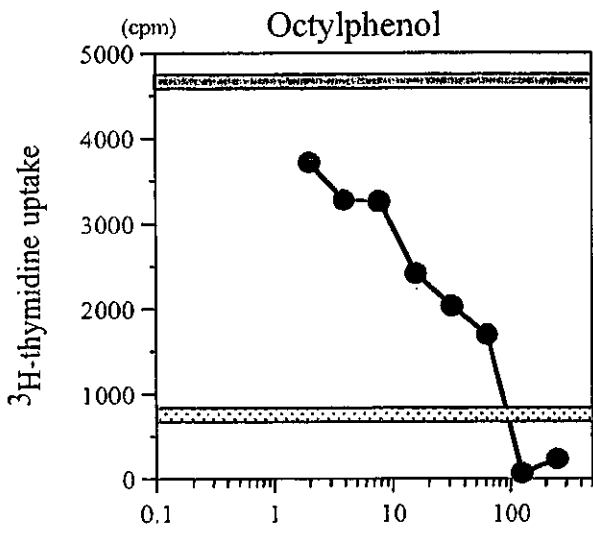
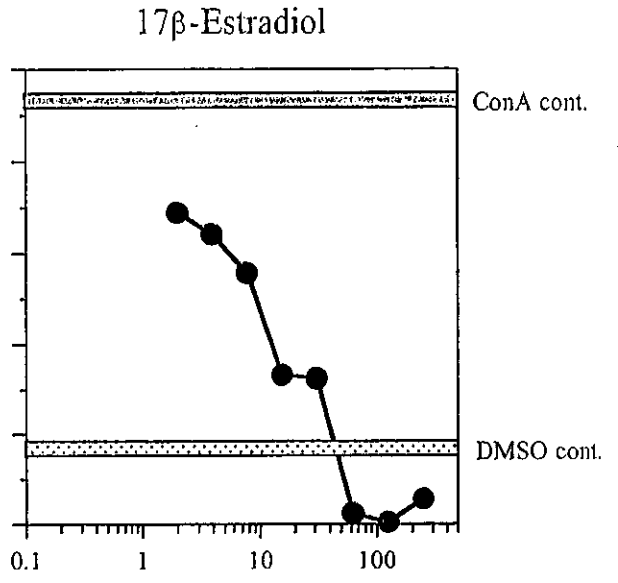
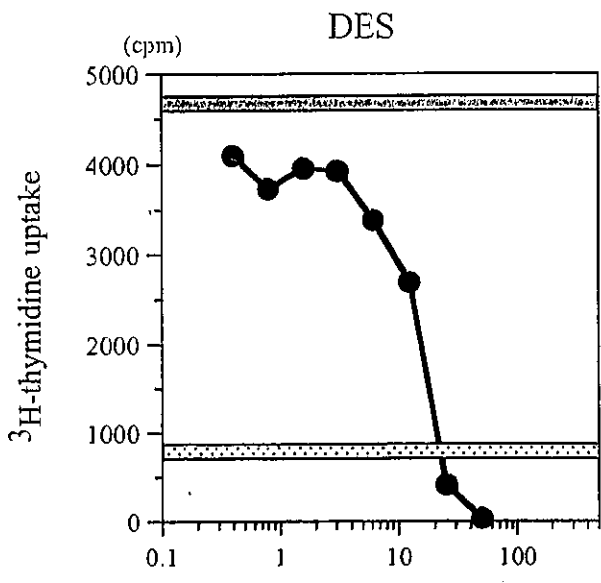
Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K.: Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res.* 16: 1416-1425 (2001).

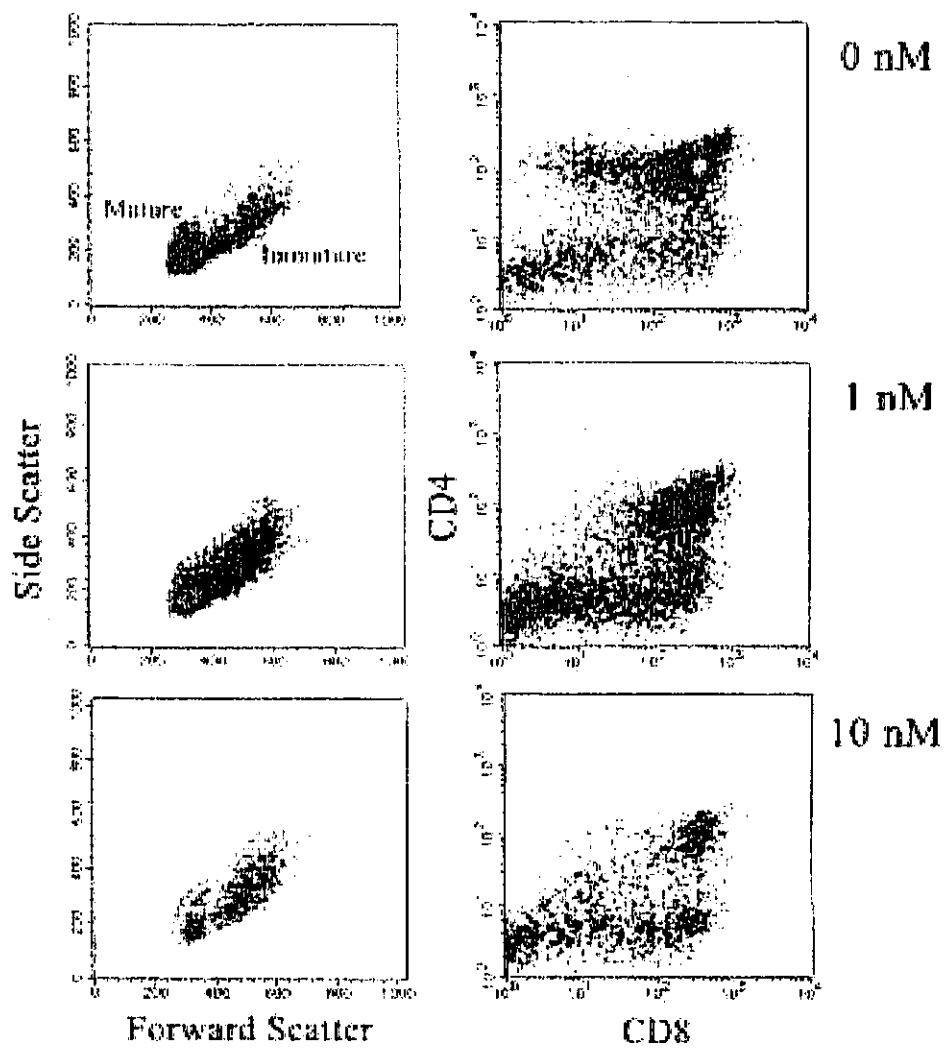
Fujino T, Yamazaki Y, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Hirokawa K, Nakamura T: Inhibition of myeloid differentiation by *Hoxa9*, *Hoxb8*, and *Meis* homeobox genes. *Exp Hematol.* 29: 856-863 (2001).

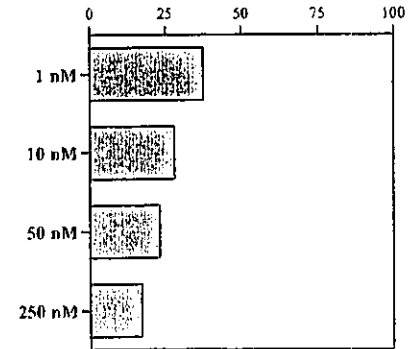
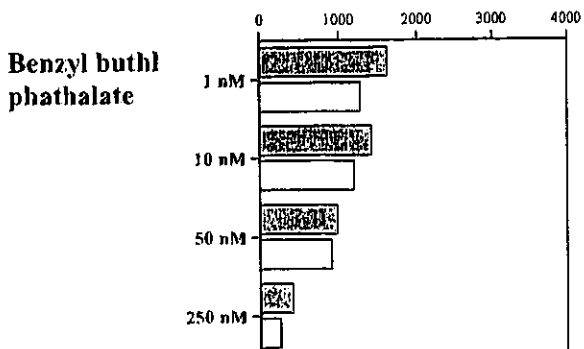
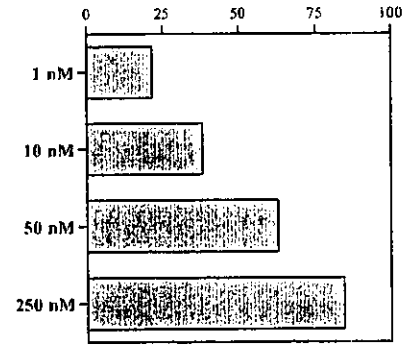
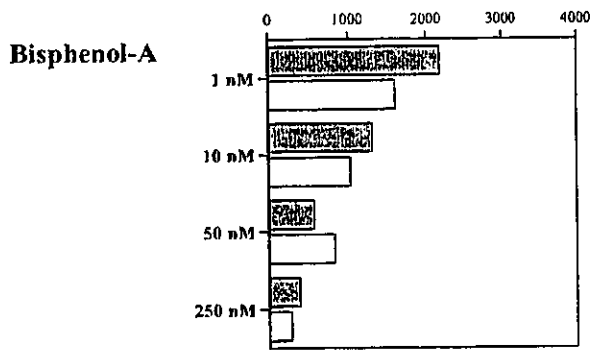
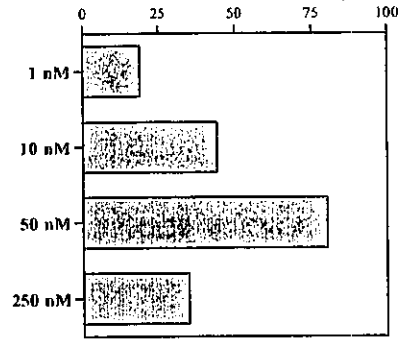
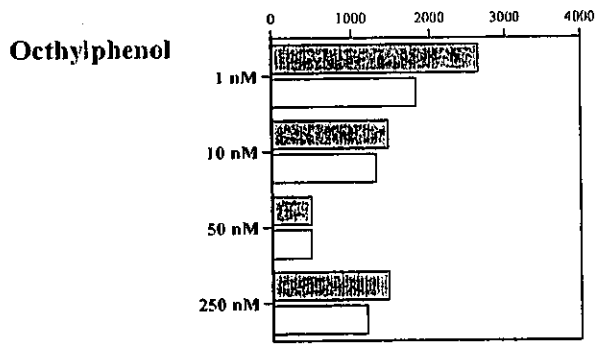
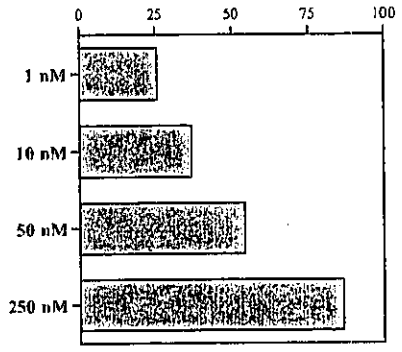
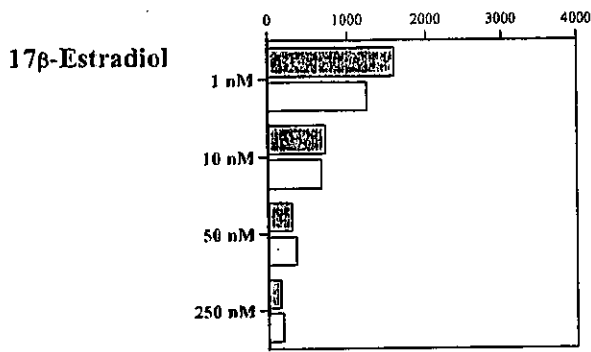
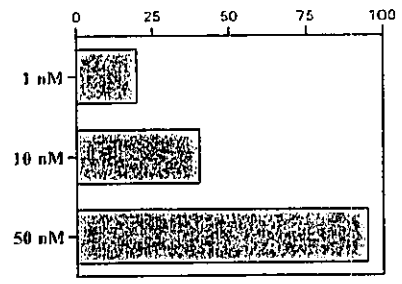
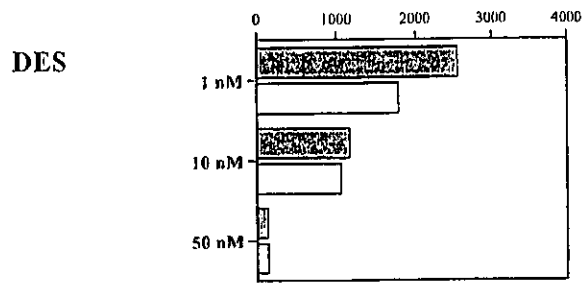
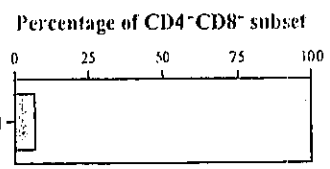
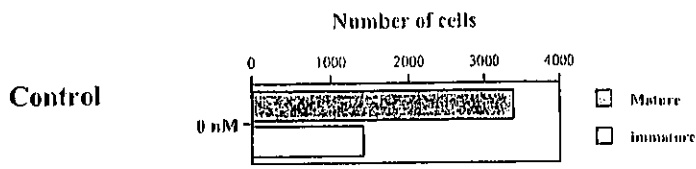
Asanuma H, Hirokawa K, Utsuyama M, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Sata T, Tamura S.: Immune responses and protection in different strains of aged mice immunized intranasally with an adjuvant-combined influenza vaccine. *Vaccine.* 19: 3981-3989 (2001).

Shiraishi J, Utsuyama M, Akashi T, Nemoto T, Ohashi K, Akamatsu H, Sunamori M, Kitagawa M, Hirokawa K.: Immunohistological analysis of thymoma by molecules differentially expressed in the thymic cortex and medulla, and its application in the differential diagnosis of thymoma from esophageal and lung cancer. *Pathol Res Pract.* 197: 611-619 (2001).

Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y.: Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer.* 94: 208-211 (2001).







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

分担研究者 山崎聖美 国立公衆衛生院 栄養生化学部 主任研究官

研究要旨 内分泌攪乱物質の細胞性免疫への影響について調べるため、遅延型過敏症反応(DTH)に対する内分泌攪乱物質の影響について調べた。その結果、DEP は DTH に変化を起こさず、DCHP は DTH を増加させ、NP、BPA、DEHP、DBP、BBP は減少させるか、その傾向にあった。また、作用メカニズムを解明するために、T リンパ球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について調べた。その結果、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が、DEP は変化させなかった。

A. 研究目的

内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質のアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関して、低用量影響も考慮に入れ、メカニズムの解明を含めて研究することを目的とする。

本年度は、内分泌攪乱物質の細胞性免疫への影響について調べる目的で、遅延型過敏症反応(DTH)に対する内分泌攪乱物質の影響について調べた。また、作用メカニズムの解明について調べる目的で、T リンパ球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について調べた。

B. 研究方法

1. DTH

マウスは、BALB / c メス(5w、7w)を用いた。マウスにノニルフェノール(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)、フタル酸ブチルペンジル(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クネスゲージ

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。

C. 研究結果

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 (表 1)。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 (表 2)。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 (表 3)。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 (表 4)。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。

D. 考察

DTH は、細胞性免疫反応であり、抗原に暴露された T ヘルパー 1(Th1)より産生された IFN- γ やケモカインがマクロファージを活性化する事によって引き起こされる炎症反応である。今回調べた NP、BPA、DEHP、DEP、DBP、BBP、DCHP のうち、DEP は DTH に変化がなく、DCHP は DTH を増加させ、その他の物質は減少させる、あるいはその傾向にあった。ヒト末梢血リンパ球を Con A 刺激した際に放出される IFN- γ 量に、これら化学物質がどのような影響を及ぼすかについて昨年度報告したが、その結果では、DCHP と DEP は低濃度では IFN- γ 産生量がコントロールと変わらず、高濃度では産生量が減少したのに対し、その他の化学物質では低濃度で IFN- γ 産生量が上昇し、高濃度で産生量が減少した。マウスの血液中の化学物質濃度、及び局所の IFN- γ は測定していないが、Th1 から放出される IFN- γ 産生量に変化が起きたために、DTH に影響があらわれたものと考えられる。

今後は、内分泌攪乱物質投与量を減らして低用量での影響をみるとともに、投与期間を短縮して影響について検討したい。

また、NP、BPA、DEHP、DBP、BBP、DCHP は瞬時に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させたことから、これらの物質は、少なくとも一部はノンジェノミクな反応により細胞に影響を及ぼしてい

るものと考えられる。今後は細胞内の他の分子についても影響について検討したい。

E. 結論

今回調べた NP、BPA、DEHP、DEP、DBP、BBP、DCHP のうち、DEP は DTH に変化を起こさず、DCHP は DTH を増加させ、その他の物質は減少させる、あるいはその傾向にあった。

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が、DEP は変化させなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

マクロファージ系培養細胞における内分泌攪乱化学物質の影響

加藤未歩、山崎聖美

第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば、2001.12.14-15、研究発表会要旨集、326、2001.

アジピン酸ジエチルヘキシル(DEHA)の生体影響

川口研、山崎聖美、中澤裕之

第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば、2001.12.14-15、研究発表会要旨集、355、2001.

G. 知的所有権の取得状況

表1 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（7週メス、5週間投与）

	control	NP	DEHP
n	4	9	7
DTH(mm)	0.41 ± 0.13	0.19 ± 0.11**	0.27 ± 0.05*
Body Weight(g)	24.2 ± 0.9	22.9 ± 1.2*	22.7 ± 1.1*
Liver(g)	1.23 ± 0.08	1.13 ± 0.07*	1.04 ± 0.05**
Liver(%)	5.07 ± 0.14	4.93 ± 0.21	4.58 ± 0.19**
Thymus(g)	0.0529 ± 0.0116	0.0621 ± 0.0158	0.0594 ± 0.0041
Thymus(%)	0.217 ± 0.040	0.271 ± 0.062	0.262 ± 0.020*
Spleen(g)	0.166 ± 0.015	0.139 ± 0.024*	0.164 ± 0.014
Spleen(%)	0.686 ± 0.060	0.607 ± 0.078	0.725 ± 0.069
Spleen CD3*(%)	41.8 ± 6.9	52.6 ± 6.6*	42.6 ± 3.2
Spleen CD19*(%)	46.8 ± 7.0	35.9 ± 8.9*	48.1 ± 3.0
Spleen CD3/CD19	0.922 ± 0.255	1.614 ± 0.693*	0.892 ± 0.118
Spleen CD4*(%)	26.7 ± 8.2	30.8 ± 7.3	24.2 ± 1.5
Spleen CD8*(%)	9.5 ± 2.4	9.5 ± 1.3	9.8 ± 1.0
Spleen CD4/CD8	2.79 ± 0.35	3.30 ± 0.91	2.49 ± 0.37
Thymus CD4*CD8*(%)	16.5 ± 4.2	20.5 ± 1.7*	17.7 ± 1.6
Thymus CD4'CD8*(%)	7.9 ± 2.1	8.3 ± 1.8	10.2 ± 2.6
Thymus CD4*CD8'(%)	68.1 ± 6.5	62.2 ± 4.2*	63.4 ± 5.2
Thymus CD4'CD8'(%)	7.5 ± 2.3	9.0 ± 1.8	8.7 ± 1.8
Thymus CD4/CD8	2.09 ± 0.14	2.54 ± 0.45*	1.83 ± 0.47

* , $p < 0.05$, significantly different from control value

** , $p < 0.01$, significantly different from control value

表2 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（7週メス、5週間投与）

	control	BPA	DCHP
n	5	9	7
DTH(mm)	0.35 ± 0.16	0.30 ± 0.07	0.47 ± 0.06*
Body Weight(g)	24.2 ± 0.6	23.7 ± 0.9	24.2 ± 0.9
Liver(g)	1.14 ± 0.04	1.15 ± 0.08	1.17 ± 0.08
Liver(%)	4.72 ± 0.22	4.86 ± 0.27	4.83 ± 0.24
Thymus(g)	0.0724 ± 0.0079	0.0728 ± 0.0151	0.0712 ± 0.0160
Thymus(%)	0.299 ± 0.032	0.307 ± 0.061	0.296 ± 0.073
Spleen(g)	0.167 ± 0.020	0.158 ± 0.013	0.172 ± 0.017
Spleen(%)	0.692 ± 0.091	0.666 ± 0.051	0.714 ± 0.075
Spleen CD3 ⁺ (%)	49.3 ± 10.4	53.9 ± 4.7	40.6 ± 3.3
Spleen CD19 ⁺ (%)	39.9 ± 10.0	33.9 ± 5.0	44.0 ± 3.0
Spleen CD3/CD19	1.365 ± 0.653	1.637 ± 0.378	0.931 ± 0.143
Spleen CD4 ⁺ (%)	27.6 ± 7.7	26.6 ± 3.5	18.2 ± 1.7**
Spleen CD8 ⁺ (%)	11.6 ± 3.8	12.1 ± 2.3	10.2 ± 0.9
Spleen CD4/CD8	2.41 ± 0.29	2.28 ± 0.56	1.80 ± 0.26**
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	17.8 ± 3.1	17.7 ± 1.9	15.3 ± 2.1
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	9.5 ± 2.2	6.8 ± 1.1**	7.2 ± 1.3
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	61.0 ± 2.3	66.3 ± 4.2	70.7 ± 5.3**
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	11.6 ± 2.1	9.2 ± 2.1	6.9 ± 2.6**
Thymus CD4/CD8	2.02 ± 0.76	2.63 ± 0.36*	2.15 ± 0.28

* , $p < 0.05$, significantly different from control value

** , $p < 0.01$, significantly different from control value

表3 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 (5週メス、5週間投与)

	control	DEP	DBP	BBP
n	9	5	5	5
DTH(mm)	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.10	0.17 ± 0.07*	0.14 ± 0.12*
Body Weight(g)	22.1 ± 1.2	23.2 ± 0.7	22.4 ± 1.6	21.9 ± 1.1
Liver(g)	1.03 ± 0.15	1.16 ± 0.04	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.06
Liver(%)	4.62 ± 0.45	4.99 ± 0.24	4.48 ± 0.42	4.59 ± 0.12
Thymus(g)	0.0706 ± 0.0080	0.0716 ± 0.0074	0.0684 ± 0.0075	0.0622 ± 0.0075*
Thymus(%)	0.319 ± 0.037	0.309 ± 0.035	0.306 ± 0.034	0.284 ± 0.030*
Spleen(g)	0.172 ± 0.020	0.210 ± 0.022**	0.168 ± 0.018	0.156 ± 0.021
Spleen(%)	0.776 ± 0.076	0.905 ± 0.085**	0.748 ± 0.050	0.708 ± 0.072
Spleen CD3 ⁺ (%)	50.8 ± 5.6		52.5 ± 6.1	47.0 ± 2.4
Spleen CD19 ⁺ (%)	39.3 ± 6.0		39.7 ± 5.9	44.2 ± 2.1
Spleen CD3/CD19	1.340 ± 0.353		1.370 ± 0.408	1.068 ± 0.104
Spleen CD4 ⁺ (%)	26.7 ± 6.6	14.6 ± 3.7**	29.3 ± 5.8	27.2 ± 6.4
Spleen CD8 ⁺ (%)	10.1 ± 1.4	9.0 ± 1.0	11.2 ± 2.4	11.3 ± 1.8
Spleen CD4/CD8	2.7 ± 0.6	1.6 ± 0.4**	2.7 ± 0.7	2.5 ± 0.4
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	18.7 ± 3.7	20.6 ± 9.1	13.1 ± 4.6*	16.4 ± 1.0
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	7.4 ± 3.2	10.1 ± 7.7	4.0 ± 1.8*	5.8 ± 2.2
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	62.7 ± 7.5	53.5 ± 17.8	77.6 ± 8.5**	68.8 ± 3.9
Thymus CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	11.2 ± 5.2	15.8 ± 8.7	5.3 ± 3.1	9.0 ± 4.1
Thymus CD4/CD8	2.77 ± 0.79	2.54 ± 0.94	3.37 ± 0.52	3.08 ± 1.02

* , $p < 0.05$, significantly different from control value

** , $p < 0.01$, significantly different from control value

表4 内分泌攪乱物質による細胞内カルシウムイオン濃度の変化

	Log M	濃度変化
NP	-4	↑
	-5	↑
	-6	↑
	-7	⇒
BPA	-3	↑
	-4	↑
	-5	⇒
DEHP	-3	↑
	-4	↑
	-5	⇒
DEP	-3	⇒
	-4	⇒
	-5	⇒
DBP	-3	↑
	-4	↑
	-5	⇒
BBP	-3	↑
	-4	↑
	-5	⇒
DCHP	-3	↑
	-4	↑
	-5	↑
	-6	⇒

↑ 一過性に上昇

↑ 一過性にわずかに上昇

⇒ 変化無し

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

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
内分泌攪乱物質の低用量影響に関する解析

分担研究者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科 教授

研究要旨 これまでPPAR γ のコファクターとして同定されていたPGC-1 (PPAR γ coactivator-1) の類似蛋白質(PGC-2)を同定した。PGC-1/PGC-2は、寒冷等の環境の変化で誘導される蛋白質で、それ自身が（孤児）核内受容体の活性化を引き起こす蛋白性のリガンド（プロテインリガンド）として働くことを見いだした。このプロテインリガンド作用を確認するために、PGC-1とPGC-2のトランスジェニックマウスを作製・解析し、PGC-1/PGC-2は生体内でもプロテインリガンドとして働くことを明らかにした。

A. 研究目的

本研究は、核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構を検索するとともにその作用機構に対する内分泌攪乱物質の低用量影響を解析することを目的とする。本研究により、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がどのように活性化を受けるかという点に視点が開け、さらに、内分泌攪乱物質の新規作用点として、孤児受容体・コファクター複合体の同定につながる可能性がある。

B. 研究方法

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、孤児受容体と呼ばれ、ゲノム解析から、数多く存在することが知られていた。しかし、そのような孤児受容体が活性化される分子メカニズムは、ほとんど判明していな

い。リガンドをもつ核内受容体の生物学的な重要性から、孤児受容体も非常に重要な生物機能を担うことが容易に推測されるが、この点は未知の研究領域として、国内外を問わずほとんど手つかずである。

一方、核内受容体は共通のコファクターを利用し、標的遺伝子の転写の活性化を促すことが示されてきた。このようなコファクターはほとんどの場合、あらゆる組織に普遍的に存在するが、我々は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を同定することに成功した。さらに、この新規コファクター群は、いくつかの孤児受容体を活性化する能力を有していることを見だし、その状態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成・解析した。