

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する

実験的研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成14（2002）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書

- 内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究 ----- 1
渋谷 淳

II. 分担研究報告書

1. 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 ----- 15
渋谷 淳
(資料) 図 1-12、表 1-24
2. 視床下部機能の神経内分泌学的解析 ----- 23
西原真杉
(資料) 図 1-3、表 1, 2
3. 血液脳関門及びグリア細胞への影響の *in vitro* 評価 ----- 27
浅井清文
(資料) 図 1-3
4. 培養中枢ニューロンに対する評価 ----- 34
榎戸 靖
(資料) 図 1-6

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 39

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（平成13年度）

内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究

主任研究者 渋谷 淳
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：内分泌かく乱化学物質(EDCs)の胎生期ないし乳幼児期曝露による内分泌機能中枢影響のリスク評価を目的として、ラットを用いた個体レベルでの in vivo 評価研究と、神経中枢の個々の細胞機能単位を対象とした in vitro 評価研究を継続・終了した。

In vivo 評価研究は、まず、昨年度までに SD:IGS ラットを用いて実施した methoxychlor (MXC; 24, 240 1200 ppm), genistein (Gen; 20, 200, 1000 ppm), diisononylphthalate (DINP; 400, 4000, 20000 ppm), nonylphenol (NP; 60, 600, 3000 ppm), bisphenol A (BA; 60, 600, 3000 ppm) 及び tamoxifen (Tam; 0.005, 0.05, 0.25 ppm)の混餌投与による周産期曝露例について性成熟後の病理組織学的評価を確定した。その結果、MXC と DINP の最高用量のみで各々雌ないしは雌雄の生殖器に病理変化を誘発した。下垂体ゴナドトロピン産生細胞数の定量解析の結果、MXC 曝露例のみで離乳時と性成熟後に細胞数の変動を認め、成熟後の雌では 240 ppm から prolactin 陽性細胞率の増加が検出された。MXC, Gen, ないし DINP 曝露例の脳の性分化臨界期で視床下部内側視索前野領域のエストロゲン応答性遺伝子の発現解析により、DINP と MXC の最高用量群で雄での GAT-1 の発現が各々減少ないし減少傾向を示し、脳の性分化影響が示唆された。この他、被検物質の混餌投与に用いる飼料として、phytoestrogen を含む通常の基礎飼料の方が含まない飼料に較べて ethinylestradiol (EE)の周産期曝露による雌での生殖器影響が強く現れることを見出した。

Wistar:Imamichi ラットを用いた MXC, DINP, Gen の同様の曝露実験で、雌動物の性周期の回帰異常、発情前期午後に誘起される LH サージの低下やロードーシス反射の減少が観察された。MXC と DINP では、これらのパラメータの多くは用量に関連した変動を示さないものの、明らかに最低用量から変動を示した。また、雄性行動には明らかな影響はなかったが、検索した全ての投与群で血中 FSH 濃度が顕著に減少していた。以上より、Wistar:Imamichi ラットは SD:IGS ラットより周産期曝露影響に対する感受性が高いと考えられ、MXC, DINP, Gen は明らかな性成熟後影響を示した。また、SD:IGS ラットのみで解析した NP, BA, Tam は今回の実験条件では影響がないものと判断された。個々の化合物についての出生児影響に関する母体曝露の無毒性量を SD:IGS ラットでの摂餌量を基に求めたところ、MXC で 1.9 mg (妊娠時) ~3.8 mg (授乳時) /kg/day (24 ppm)以下、DINP で 30.7 mg (妊娠時) ~66.2 mg (授乳時) /kg/day (400 ppm)以下、Gen で 13.7 mg (妊娠時) ~23.0 mg (授乳時) /kg/day (200 ppm), NP で 270.4 mg (妊娠時) ~455.3 mg (授乳時) /kg/day (3000 ppm)以上、BA で 231.8 mg (妊娠時) ~384.4 mg (授乳時) /kg/day (3000 ppm)以上、Tam で 20.5 μ g (妊娠時) ~34.8 μ g (授乳時) /kg/day (0.25 ppm) 以上であった。

In vitro 評価研究は、13 年度は血液・脳関門 (B-BB)と中枢ニューロンに与える影響について評価を継続した。B-BB 評価系では、既に確立した in vitro B-BB model で昨年度までに L-glucose の透過性に対する estradiol や各種 EDC 候補物質による抑制効果を見出している。今年度は estradiol によるその抑制効果が PI3 kinase 阻害剤と NO synthase 阻害剤の添加により消失することを見出し、エストロゲンによる脳毛細血管内皮細胞の物質透過性制御に PI3 kinase を介した NO シグナルが直接関与し、NO 産生量の測定系が B-BB 評価系として利用できる可能性が示唆された。しかし各種化合物で NO 産生に対する用量反応性を検索したところ、DINP で抑制効果が検出されたのみであった。

ニューロン評価系では、既にラット培養海馬ニューロンの血清除去による細胞死の estradiol による抑制効果を見出しているため、今回はその系で BA, NP, MXC, Gen, Tam, 4-hydroxytamoxifen (4-HTam), atrazine を解析し、BA や NP, Tam, 4-HTam で抑制効果を確認した。また、estradiol やこれらの化合物が、神経栄養因子であるインシュリンや IGF-1 との共存下でニューロンの生存を著しく増強することを見出し、このニューロン評価系は神経栄養因子の作用に対する EDCs の修飾作用を検索する上で優れた評価系になると考えられ、これら神経栄養因子と EDC のクロストークは、EDCs による発達期中枢神経障害のこれまで知られていなかった発症機構として注目すべきものと考えられた。

分担研究者

渋谷 淳

国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

西原真杉

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

浅井清文

名古屋市立大学医学部分子医学研究所 教授

榎戸 靖

大阪大学蛋白質研究所 助手

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ジェン受容体(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懸念されている。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。最近、ラットを用いた実験で、脳の性分化を果たす時期に過剰のエストロジェ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、bisphenol A (BA)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ジェンに反応する配列(ERE)を持ち、個体のエストロジェ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。

本班研究においては、個体レベルでのin vivo評価系と神経中枢の各構成要素に対する細胞レベルでのin vitro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、検索化学物質を統一していくつかの代表的な物質

について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。このことにより、EDCsに対する社会的不安を緩和することができ、また新たなEDCsのスクリーニングにも迅速に対応できる。

一方、通常用いられる実験動物用飼料には植物に由来するphytoestrogenが含まれているが、ラットを胎児期から新生児期にかけて異なる飼料で飼育することにより、春期発動期などの性発育パラメータの変動することが報告されている。しかし飼料の違いが外因性ホルモンにより誘発される変化に与える修飾作用については、ほとんど報告例がない。

この班研究のin vivo評価系では、従来の内分泌機能及び病理形態の検索のみならず、脳の性分化の臨界時期の視床下部において、分担研究者らにより見いだされた脳の性分化誘導因子であるgranulin (gm)遺伝子の発現解析の他、視床下部の性的に分化することが知られている性的二型核でのEREを持つ遺伝子の発現レベルの定量的解析を行う。この部位特異的な遺伝子発現解析はパラフィン包埋切片を利用した検出系と、顕微鏡下で特定の細胞をレーザー光を利用して採取する方法を組み合わせで行う。そして、遺伝子発現の解析結果と性成熟後の生殖器障害の程度との関連性を比較・評価する。また、成熟動物の生殖機能は視床下部のGnRHパルスジェネレーターにより制御されているので、発情前期のLHの分泌パターン解析を用いて、性成熟後の生殖機能の評価に充てる。In vitro評価系においては、血液・脳関門(B-BB)及びニューロン、グリア細胞の各々に与える影響を検索する。B-BBの評価系として、微量のEDCsの脳内移行を迅速に測定するための独自のin vitroモデルを開発した。また、グリア細胞への直接作用の評価系として、ラット胎児脳アストロサイトや不死化した培養アストロサイトを樹立し、GFAPなどのアストロサイトの機能遺伝子の解析系を確立している。ニューロンの検索系として、ERの発現している脳領域を培養し、ニューロンの生存維持、機能分化あるいは可塑性へのEDCsの直接的な効果を検索する実験系を確立している。このような一種のスクリーニング系を応用したEDCsのニューロンないしはアストロサイトへの直接作用はまだ調べられていない。

最終年度である本年度は、まずin vivo評価研究では、昨年度までにSD:IGSラットを用いて動物実験を実施したmethoxychlor (MXC), genistein (Gen), diisononylphthalate (DINP), nonylphenol (NP), BA及びtamoxifen (Tam)の周産期曝露例について病理組織学的

評価を確定し、脳の性分化完了後での視床下部性的二型核(SDN-POA)のサイズ測定を行った。次にこれらの児動物について、下垂体ゴナドトロピン産生細胞の免疫組織学的な定量解析や、SDN-POA を含む内側視索前野(mPOA)領域でのエストロゲン応答性遺伝子の発現変動を MXC, Gen, ないし DINP 曝露例で検討した。この発現解析と平行して、この神経核領域でのアポトーシスの定量解析を検討してみた。その他、基礎飼料中に含まれる phytoestrogen が EDCs の周産期曝露によるリスク評価に及ぼす影響についても、エストロゲン作用の陽性対照物質である ethinylestradiol (EE)を用いて検討した。

また、Wistar:Imamichi ラットを用いた EDC 候補物質による生殖機能に与える影響の検索として、MXC, DINP, Gen の同様の曝露実験を行い、雄動物では性行動観察と血中 FSH レベルの検索、雌動物では性周期の回帰パターン、発情前期午後に誘起される LH サージ、ロードーシス反射を検索した。

In vitro 評価系においては、独自に確立した in vitro B-BB モデルで、既に estradiol 及び多くの EDC 候補物質が L-glucose の B-BB 透過性を即時的に抑制することを見い出している。今年度は、その抑制メカニズムについて、シグナル伝達阻害剤による薬理学的手法を用いて検索し、脳毛細血管内皮細胞の物質透過性制御にかかわるシグナル伝達系の解明をめざした。

中枢ニューロンの評価系では、ラット胎仔海馬培養ニューロンを用いた血清除去による細胞死に対して、estradiol が部分的な抑制効果を示すことを既に明らかにしている。本年度は、この培養ニューロンを用いてエストロゲンならびに EDC 候補物質 (BA, NP, Tam, 4-hydroxytamoxifen (4-HTam), atrazine 等) による生存維持作用を指標とした評価系を確立し、その生存維持作用に関与する神経成長因子、及び細胞内シグナリングについて細胞ならびに分子レベルで検索した。

B. 研究方法

In vivo 評価研究においては、EDCs 候補物質を妊娠・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、上記化合物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 ラットを用いた実験では、MXC, Gen, DINP, NP, BA 及び Tam を各々、妊娠 15 日から生後 10 日までの間投与し、児動物への影響の評価を行った。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 MXC を 24, 240, 1200 ppm, Gen を 20, 200, 1000 ppm, DINP を 400, 4000, 20000 ppm, NP を 60, 600, 3000 ppm, BA を 60, 600, 3000 ppm, Tam を 0.005, 0.05, 0.25 ppm と設定した。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蛋白質を含まない特殊飼料 (SF-NIH07, 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 mPOA (SDN-POA を含む) 領域における遺伝子発現を解析する目的で、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 (雌では膣開口、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 (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。生後 3 週目及び 11 週目の児動物において、下垂体におけるゴナドトロピン (LH, FSH, PRL) の免疫染色を行い、前葉での単位細胞数当たりの陽性細胞数を求めた。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 μ m おきに 3 μ m 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。

新生児視床下部の mPOA 領域における遺伝子発現解析法として、メタカーン固定・パラフィン包埋切片について、レーザー光を用いた microdissection 法により目的部位を採取し、その部位の total RNA を用いて competitive RT-PCR を行い、plate hybridization 法により標的遺伝子の mRNA のコピー数を測定する方法を既に確立している。昨年度までに、EE を周産期曝露した雌雄の児動物視床下部領域において、GABA transporter type-1 (GAT-1) の発現量の低下、GFAP 発現量の雄での増加、雌での減少を確認している。しかし、その後の検討で plate hybridization に用いる capture plate のロット差の大きいことが判明したため、PCR 産物の定量法を real-time RT-PCR 法に変更し、定量条件等の

検討を行った。そして MXC, DINP 及び Gen 周産期曝露児動物について、生後 10 日目での遺伝子発現解析として、SDN-POA を含む mPOA 領域での estrogen receptor α , estrogen receptor β , GAT-1 及び GAPDH 発現量の定量解析を行った。

また、脳の性分化を果たす時期での EDC による視床下部ニューロンのアポトーシスを定量化する目的で、EE 0.4 ppm をラットに妊娠 15 日から生後 6 日までの間混餌投与し、生後 3 及び 6 日に児動物の脳を採取し、ホルマリンアルコール（ユフィックス）固定後、連続切片を作製し、TUNNEL 染色、Nissle 染色、active caspase 3 免疫染色を施して、SDN-POA 領域でのアポトーシス・インデックスを求めた。

また、基礎飼料中に含まれる phytoestrogen が EDC の周産期曝露によるリスク評価に及ぼす影響を検討するために、phytoestrogen を含む通常の基礎飼料（CRF-1:オリエンタル酵母社製）あるいは phytoestrogen (-) の SF-NIH07 飼料を用いて、ラットに 0.5 ppm の EE を周産期（妊娠 15～生後 10 日）曝露し、母動物及び児動物に及ぼす影響を比較・検討した。

Wistar: Imamichi ラットを用いた生殖機能に与える影響の検索として、処置群として DINP (400, 4000, 20000 ppm), Gen (200, 1000 ppm), MXC (24, 240, 1200 ppm) または EE (0.00025, 0.0025, 0.025 ppm) を SF-NIH07 粉末飼料に混じて妊娠ラットに経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎子あるいは新生子に移行させた群と、出生 2 日齢のラットに estradiol benzoate (EB) を 25 μ g 皮下投与したものおよび対照群を設けた。これら処置群の雌雄ラットの成熟後、生殖内分泌系や性行動にどのような影響を与えるかを検討した。すなわち、雄ラットについてはまず雄性行動の観察を行った。発情雌ラット（去勢雌ラットにエストロジェン・プロジェステロン処置したもの）と雄ラットをアクリルケージに入れ、暗視野ビデオカメラにて 30 分間の雄性行動を観察した。マウント、挿入、射精の頻度と各パラメータの初回行動までの時間、初回の射精後から再びマウントの発現する時間（射精後マウント潜時）を計測した。さらに尾静脈より採血を行い、血清中の黄体形成ホルモン(LH)、テストステロン、卵胞刺激ホルモン(FSH)、インヒビンの濃度をラジオイムノアッセイ(RIA)および ELISA 法により同定した。雌ラットの生殖機能の検討としては、まず、8 週齢の雌ラットの性周期の回帰を陰スメアー法により観察した。その後、発情前期の 12 時と 16 時において尾静脈より採血し、血清中の LH の濃度を RIA 法により同定した。さらに発情前期夕刻において、用手法により臀部に刺激を与

えロードーシス反射の発現の比率（ロードーシス商）を同定した。

In vitro 評価研究の B-BB 評価系では、樹立に成功した不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞(t-BBEC-117)を、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 存在下で継代し、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 in vitro B-BB モデルに用いた。このモデルにおける物質透過性の測定は、Snapwell を拡散チャンバーに装着し、次いで内皮細胞側（血管内腔側に相当）に細胞間隙のみを通過する [14 C]-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 [14 C]-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。次いで、estradiol を作用させた上で phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 阻害剤である Wortmannin を 30 nM 加えた場合および、NOS (NO synthase) 阻害剤である L-nitroarginine methylester (L-NAME) を 100 nM 加えた場合を比較した。また、脳毛細血管内皮細胞からの NO 産生量を定量化するため、t-BBEC-117 細胞を 24 well dish のそれぞれの well に 5×10^5 細胞を播種後 3 日間培養し、培養液を除去した後 Hanks' balanced salt solution (HBSS) で洗浄し 500 μ l の HBSS に DINP, flutamide, Bis(2-ethylhexyl)ester, vinclozolin, MXC, Tam, BA, p-hydroxybenzoic acid n-butyl ester, 17 β -estradiol をそれぞれ 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM 10 nM の濃度で加えた。NO 産生量の測定には蛍光色素 diaminofluorescein (DAF-2)100 nM の HBSS 溶液を呈色反応液として培養細胞へ加えて 2 時間処理した上で、その上清 200 μ l に 1N NaOH を 10 μ l を加えて pH 11 以上とした溶液を試料として黒色 96 穴マイクロプレートに移し、Microplate fluorescence reader FL600 (Bio-Tek Instruments, Inc.)で蛍光強度を数値化して比較検討した。

ニューロンの評価系に関して、胎仔期あるいは生後 2 日ないしは 11 日齢ラット海馬脳を摘出しパパイソ法により分散培養を行った。培養後、各種抗体による染色、RT-PCR 法による mRNA 量の定量、MTT 法による生存率の測定、HPLC によりグルタミン酸放出量の測定を行った。胎仔 19 日齢ラット海馬ニューロンを実体顕微鏡下で摘出し、パパイソ法により分散培養を行った。被検物質および神経栄養因子存在下で培養した後、各種抗体による免疫組織染色、MTT 法による生存率の測定を行った。さらに、Western blotting による MAP kinase ならびに PI3 kinase を介した細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は混餌投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はすべてネンプタールないしエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺するため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。ニューロンの初代培養に用いる実験動物は利用規程に従って用い、In vitro B-BBモデル培養系は不死化した細胞を用いたため、倫理面についての問題はない。

C. 研究結果

まず in vivo 評価研究のうち、SD:IGS ラットを用いた各 EDC 候補物質の検索結果として、まず、Gen, 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・摂餌量の低値、児動物の出生時体重・体重増加量の低値等の毒性影響が認められた。Gen の 1000 ppm 群においても有意差はないが、児動物の出生時体重・体重増加量の低値が認められた。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 週時に雄で下垂体の FSH, LH, PRL 陽性細胞の減少、雌で LH 陽性細胞数の減少が認められた。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、同群で卵巣重量の低下が認められ、病理組織学的検索では、多卵胞性卵巣、子宮内膜上皮の増生、腔内膜上皮の増生・単細胞角化を伴う粘液変性が認められた。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が、雌の下垂体において PRL 陽性細胞率の増加が 240 ppm から、FSH 陽性細胞率の増加が 1200 ppm 群で認められた。しかし、陽性対照である 0.5 ppm EE では、生後 3 週目の雌の PRL 陽性細胞の増加が認められたのみで、生後 11 週目には変動が認められていない。

DINP の 20000 ppm 群では、精巣重量の低値及び雌の副腎重量の低値が生後 3 週時に認められたが、生後 11 週時には精巣及び副腎重量は対照群と同程度の値を

示した。春期発動期の認められた時の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。病理組織学的検索では、20000 ppm 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、卵巣における黄体数の減少が認められたが、他のパラメータには明らかな変動を認めなかった。

Gen においては、1000 ppm 群の雄で春期発動の認められた時の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 週時には雄で 200 ppm から副腎重量（相対）の高値が認められたが、病理組織学的検索や他の検索による結果では変化は認められなかった。

NP においては、生後 11 週時に高用量群の雌で副腎重量（相対）の高値が認められたが、病理組織学的検索では変化は認められなかった。

BA と Tam においては、全ての検索パラメータにおいて被検物質の曝露に直接起因すると考えられる変化は認められなかった。

新生児視床下部の SDN-POA 領域における遺伝子発現解析として、本年度は real-time RT-PCR 法を導入し、定量条件等を確立した。そして MXC, DINP 及び Gen 周産期曝露児動物について estrogen receptor α , estrogen receptor β , GAT-1 及び GAPDH 発現量の定量解析を行ったところ、EE と同様に雄における GAT-1 の発現が MXC の 1200 ppm 群で減少傾向を、DINP の 40000 ppm 群で有意な減少を示した。

EE 0.4 ppm を母ラットに妊娠 15 日から生後 6 日までの間投与し、生後 6 日における児動物の SDN-POA を含む mPOA 領域におけるアポトーシスを TUNNEL 染色、Nissle 染色、active caspase 3 免疫染色により検討したが、生後 11 週の卵巣・子宮に明らかな病理組織学的変化を誘発する本用量においても、SDN-POA 領域の神経細胞のアポトーシスに EE 曝露による影響は認められなかった。

EE の混餌投与による周産期曝露影響について、用いる基礎飼料の違いによる反応性を比較した結果、異なる基礎飼料を用いることにより、性発育パラメータに変動が認められ、EE の混餌投与により誘発される変化の強度にも変化が認められた。飼料自体の影響としては、SF-NIH07 において出生時体重の低値及び春期発動期の早期化が認められた。EE により誘発される変化の強度に関しては、春期発動期は CRF-1 群では雌で早期化、SF-NIH07 では雄で遅延が認められ、両飼料群で変化の発現様式が異なっていた。一方、性成熟後には CRF-1 群で EE により誘発される変化がより

顕著であった。すなわち、CRF-1 群では全例が異常な性周期を示し、病理組織学的検索においてもエストロゲン作用に特異的な変化が SF-NIH07 群よりも顕著に認められた。

Wistar: Imamichi ラットを用いた生殖機能影響に関する検索では、EB, EE のエストロゲン作用陽性対照と MXC, DINP, Gen 曝露を受けた雄ラットにおける射精に至った個体数とそのパーセントを検索した結果、EB 群は射精まで至る個体が全体の 12.5%と減少した。しかし EE, MXC, DINP, Gen 曝露群については、60%以上の個体が射精に至った。なおマウント、挿入および射精の頻度については、EB 群のみにおいて挿入、射精の頻度の顕著な減少が観察されたものの、MXC, DINP, Gen 曝露群については、挿入、射精などの雄性行動については有意な異常は観察されなかった。さらに初回までのマウント、挿入までの時間については、すべての曝露群において差がなかった。雄ラットにおける各種血清ホルモンについては、特に FSH について、EB 群を含むすべての曝露群が対照群に比べ減少していた。LH とテストステロンについては、MXC の最高用量で LH の低下が認められたが、それ以外の全ての群で影響は見られなかった。

雌ラットにおける成熟後の性周期回帰に対する影響については、MXC, DINP, Gen 曝露群のすべてについて、発情期の日が 2 日連続するという、性周期回帰パターンの異常を示す個体が観察された。異常周期の発現した用量は MXC で 24 ppm, Gen で 1000 ppm であり、DINP では最低用量と中間用量 (4000, 20000 ppm) のみで認められた。発情前期夕刻のロードーシス反射の出現については、EB を含むすべての曝露群において 50% 以下のロードーシス商を示したが、用量依存性は明らかではなかった。更に、対照群では発情前期夕刻 16 時において血中 LH 濃度の上昇 (LH サージ) が観察されるが、DINP (4000ppm) 群と MXC (1200, 240, 24ppm) 群、EB 群において、発情前期 16 時における血中 LH 濃度は有意に減少していた。また、MXC 群での LH 濃度減少には用量依存性が明らかではなかった。

In vitro 評価系においては、まず、in vitro B-BB モデルにおける t-BBEC-117 細胞の物質透過性に関与する 17β -estradiol の作用機構を解明するために、 17β -estradiol と同時に Wortmannin 30 nM を作用させたところ 17β -estradiol による L-glucose の透過性の抑制効果が消失した。Wortmannin の単独投与では、透過性に変化が見られていない。 17β -estradiol と同時に L-NAME 100 μ M を作用させたところ Wortmannin の効果と同様に 17β -estradiol による透過性抑制効果が消失した。

また、各 EDC 候補物質を作用させた場合の t-BBEC-117 細胞における NO 産生について検索した結果、DINP を 1 pM から 10 nM の範囲で処理した場合に用量依存的に NO 産生の抑制される傾向が認められた。ただし 17β -estradiol を含めて他の化学物質投与による t-BBEC-117 からの NO 産生量には明らかな傾向は検出できなかった。

ニューロンの評価系においては、胎生 19 日齢ラット海馬ニューロンを分散培養し、血清存在下で 1 日培養後、無血清培地に交換した。血清除去刺激 24 時間後、約 70% の細胞は細胞死を起こした。この条件下で estradiol を 0, 3, 10, 30 μ M 添加したところ、濃度依存的に血清除去による細胞死抑制効果が観察された。同様の生存維持作用を各 EDC 候補物質についても検討した。その結果、estrogenic な生理活性を持つといわれる BA および NP は、1 μ M で生存維持効果が認められた。また、Anti-estrogenic な生理活性を示す Tam, 4-HTam は 3 μ M で認められた。次にこの生存維持効果への培地添加物 (TIP) の関与を調べた。トランスフェリン (T) 5 μ g/ml, インシュリン (I) 5 μ g/ml, プロゲステロン (P) 20 nM の添加実験を行った結果、estradiol のみでは生存維持効果は僅かであったが、インシュリンによりその効果が著しく増強された。この時、インシュリンのみでは生存維持効果は全く見られなかった。同様の増強効果は IGF-I などの神経栄養因子に対しても見られた。また、BA, NP, Tam および 4-HTam でも神経栄養因子に対する増強効果が認められた。このことは、エストロゲンやこれらの化合物が何らかの細胞内シグナル伝達経路を介して神経栄養因子の生理機能を変化させていることを予想させた。

そこで最後に estradiol ならびに EDC 候補物質のインシュリンとの相乗効果がどのような細胞内シグナル伝達経路を介しているかについて解析を行った。その結果、それぞれ MAP kinase と PI3 kinase 経路の特異的阻害剤である U0126 および LY294002 により、エストロゲンとインシュリンによる生存維持効果が顕著に阻害された。この効果は estradiol や EDC 候補物質による神経栄養因子効果の増強効果が細胞内 MEK 及び PI-3 kinase の系を活性化することによって行われていることを示唆している。

D. 考察

11 年度は in vivo 及び in vitro の両評価研究ともエストロゲン化合物を陽性対照として評価系の確立に努め、12 年度は個々の評価パラメーターの細部の検討と共に、確立できた評価系においては EDCs 候補物質

の評価を開始し、13年度は評価を継続・終了した。

In vivo 評価研究は脳の性分化過程及び性成熟後の生殖機能に与える影響を主眼として、視床下部・下垂体軸、生殖器系の機能とそれらの形態学的な評価を遂行した。まず、SD:IGS ラットを用いて各種 EDC 候補物質について周産期曝露影響を検索した結果、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。EE の 0.5 ppm 曝露例と同様に、1200 ppm MXC 曝露により雄の児動物の mPOA 領域にみられた GAT-1 の発現低下傾向は、MXC が脳の性分化に対して影響を与えた可能性が示唆される。1200 ppm の MXC 曝露を受けた雌では、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 曝露例での下垂体のゴナドトロピン産生細胞率の検索により、生後 3 週時に 1200 ppm 群の雄で LH、FSH、PRL 陽性細胞率の低下が認められた。雄では生後から春期発動期（生後約 6 週）の間、下垂体ホルモン産生細胞数の増加することが知られていることから、これらの陽性細胞率の低下は下垂体の成熟障害ないし遅延を示唆し、同群での春期発動期遅延に対応する所見である可能性が考えられた。一方、雌ではホルモン産生細胞数は生後 3 週間後にピークを示した後に減少することが知られている。本実験での 1200 ppm MXC 群の雌で認められた LH 産生細胞率の減少は、これらの動物に見られた春期発動期の早期化を考慮すると、下垂体成熟の早期化を示唆するものと考えられた。生後 11 週時では、雌で FSH、PRL 産生細胞率が増加しており、性成熟後にも下垂体への影響が持続して、発情期あるいは休止期の延長や多卵胞性卵巣といった所見に反映されているものと考えられた。また PRL 産生細胞率の増加はこれまでの内分泌・生殖器系の評価で変化の認められていなかった 240 ppm MXC 群においても認められ、その反応は用量に依存していた。この所見の毒性学的な意義は血中ホルモン濃度測定などにより評価されるべきであるが、下垂体の PRL 産生細胞率の評価が EDCs の曝露影響の高感度検出パラメータとなる可能性が示唆された。

一方、EE の 0.5 ppm 曝露例での検索では、生後 3 週目の雌で PRL 陽性細胞の増加が認められたが、生後

11 週目にはいずれの細胞にも変動が認められなかった。生後 11 週の雌では、下垂体重量の増加や前葉のび慢性過形成を認めており、このことは前葉を構成している細胞が全体に増加していることを示唆している。1200 ppm MXC 群の雌との陽性細胞率の差異の原因は明らかではないが、1) エストロゲン作用の強弱による生体影響の差、ないし 2) MXC のエストロゲン作用以外の作用（抗アンドロゲン作用）を反映している可能性が考えられる。

DINP はポリ塩化ビニル類の可塑剤で、玩具類の塗料に用いられており、この物質の投与によりラットでペルオキシゾーム増殖作用の他、精巣障害の生じることが知られている。本研究では、雄の 20000 ppm 曝露動物で脳の性分化終了時の mPOA 領域における GAT-1 の発現が低値を示し、この濃度で脳の性分化に対する影響の生じていることが示唆された。ただし、春期発動の時期には対照群との差が認められていず、生後 3 週時での下垂体のゴナドトロピン産生細胞数の変動も明らかではないことから、性的発育を支配する視床下部・下垂体軸に対する影響はあったとしてもごく軽度であると考えられた。一方、生後 3 週時に精巣重量の低下が認められ、生後 11 週目の精巣に軽微ではあるが病理組織学的変化を認めている。この病理変化は、セルトリ細胞の空胞変性と XIV ステージの変性精母細胞の増加から構成されていたが、前者については児動物精巣への曝露による影響が残っているものと考えられた。ただし、精子細胞は正常に形成されており、セルトリ細胞の機能は保たれているものと考えられた。後者の変性精母細胞の増加については原因が不明であり、同群の雌で認められた卵巣の黄体数の減少が EE 曝露でも認められる変化であることを考慮すると、軽度の視床下部障害が示唆される。これらの変化については、可逆性も含めた再現性の確認が必要である。

Gen, BA, NP, Tam 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なかった。Gen においては、春期発動の認められた時の体重は対照群と比較して低値を示したが、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た。

脳の性分化臨界期における SDN-POA を含む mPOA 領域での遺伝子発現解析については、昨年度報告した EE の他、今年度は real-time RT-PCR 法を用いて MXC、DINP、Gen 曝露例での検索を行ったが、DINP の 20000

ppm や MXC の 1200 ppm の雄で、EE で認められたような GAT-1 の発現低下ないし低下傾向が認められた。その他の化合物では、有意な発現変動は明らかではなかった。エストロジェンに反応して発現変動することが知られている GAT-1 は GABA ニューロン特異的に発現することが知られている。このニューロンは発達過程で興奮性刺激伝達を行うが、成熟するに従い抑制性刺激を伝達するようになる。脳の性分化過程においても、神経細胞領域によって GABA ニューロンの反応性（興奮性ないし抑制性）が雌雄で異なることが指摘されている。当然 GABA の transporter である GAT-1 も性分化過程での神経構築の可塑性の変化に応じて発現調節を受ける可能性がある。本研究では EE で得られたような検出感度での GAT-1 の発現変動を MXC、DINP、Gen では得ることができなかったが、DINP あるいは MXC の最高用量の曝露を受けた雄動物での GAT-1 の発現低下ないし低下傾向は、内分泌中枢障害が生じていることを示唆しているものと考えられた。

本研究では、脳の性分化終了後における SDN-POA のサイズ測定で各 EDC 候補物質曝露による影響は認められなかった。昨年度までの研究で、周産期に EE を 0.5 ppm 曝露することにより、児動物の SDN-POA のサイズが雄で減少することを確認している。エストロジェン作用による 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ジェ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ジェンは ER β を介してアポトーシスを促進する可能性のあることが報告されている。そこで、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たため、性分化時期における mPOA 領域でのアポトーシスを起こしている細胞数を評価指標として検索を行った。しかし、生後 6 日目における検索では、EE の混餌投与による差を検出することができなかった。昨年度に行った生後 9 日目における抗アポトーシス遺伝子の bcl-x_L の発現解析においても雌雄ともに EE 曝露による変動は認められなかったことから、持続的な曝露形態では投与期間中に sporadic にアポトーシスの生じている可能性が推定され、脳の性分化過程の一時点だけにおける神経細胞のアポトーシスの検索は、持続的な曝露に起因する性分化障害の検出には不適切であると考えられた。

大豆・アルファルファ由来の phytoestrogen を含む通常の基礎飼料と phytoestrogen を含まない飼料を用いた

実験においては、基礎飼料の違いにより性発育パラメータに変動が認められ、外因性ホルモンにより誘発される変化の発現強度も異なることが示された。この原因が Gen に代表される phytoestrogen の影響によるものか否かは現段階では不明であるが、EDCs などの評価に際しては、目的に応じて適切な飼料を使用することが必要である。もし飼料の違いによるエストロジェン曝露影響の違いが飼料中に含まれる phytoestrogen に起因する場合、食餌中の phytoestrogen 含量が EDC による曝露影響を増強する可能性が考えられる。そこで外因性に曝露した EE と飼料中の phytoestrogen との相乗作用を検討するために、現在 Gen と EE の周産期同時投与の実験を継続中であるが、生後 11 週までの時点で Gen は EE 曝露影響に対して明らかな修飾作用を認めていない。

Wistar:Imamichi ラットを用いた解析では、雄ラットの性行動については、明らかな雄性行動の異常は観察されなかった。雄ラットにおける雄性行動を司る神経系の形成に対して、今回用いた EDC 候補物質の種類及び濃度では影響を及ぼさないという結果となった。なお昨年度に EE 群によるマウント頻度の上昇、初回までのマウント、挿入までの時間の短縮が観察された。今回の結果は昨年度のものとは異なる結果となったが、これは今回は化学物質の混餌投与に SF-NIH07 飼料を使用したため、前回は phytoestrogen の含まれている通常の飼料を使用しており、SD:IGS ラットを用いた実験結果を考慮すると、これらの反応性の違いは、飼料に起因している可能性が示唆される。しかしながら血中 FSH 濃度については、DINP (400-20000 ppm)、MXC (24-1200 ppm)、Gen (1000 ppm) 各々の曝露により顕著な減少が観察された。その意義は現時点では明らかではないが、周産期におけるこれらの化学物質曝露が雄ラットの性成熟後でのホルモン分泌に影響を及ぼしたことを示すものである。この血中 FSH 濃度の低下については、今後これらの動物の精子形成能を解析するなど、精巣機能に対する影響を評価する必要があると考えられる。また、この現象の原因として、視床下部-下垂体-精巣のどのレベルの影響が主体となっているのかを突き止めることも今後の課題と考えられる。

新生期の EB 処置により、成熟後の雌ラットの性周期の回帰パターンや発情前期夕刻における LH サージの減少が観察された。これらの結果は新生期の大量のエストロジェン曝露による脳の性分化の異常により、ゴナドトロピンサージおよび排卵が起こらなくなったことを強く示唆するものである。MXC 曝露例でも用量依存性は明らかではないが LH サージの減少

が 24 ppm から認められ、性周期異常に関しては用量に依存した発現頻度を示した。この他、DINP 曝露例で用量に依存せずに性周期異常を認め、Gen 曝露例でも 1000 ppm で性周期異常を認めた。ただ、いずれの EDC 曝露群においても EB 処置群とは異なり性周期は回帰しているため、排卵自体は起こっているものと考えられる。排卵数への影響の検討が今後必要となろう。一方、用量依存性はないものの、MXC、Gen、DINP 曝露例で雌性行動であるロードーシスの低下が観察された。異常の結果の多くは用量に関連した変動を示さなかったが、胎仔期・新生期において形成される雌性行動を司る神経系に対して、外因性のこれらの物質の曝露が影響を及ぼしたと考えられる。

Wistar:Imamichi ラットを用いた検索では、母ラットの摂餌量をモニターしていなかったため、1 日あたりの化学物質の摂取量は求められなかったが、2 つの異なる系統のラットを用いて得られた解析結果から、個々の化合物についての出生児影響に関する母体曝露の無毒性量を SD:IGS ラットでの摂餌量を基に求めたところ、MXC で 1.9 mg (妊娠時)~3.8 mg (授乳時)/kg/day (24 ppm)以下、DINP で 30.7 mg (妊娠時)~66.2 mg (授乳時)/kg/day (400 ppm)以下、Gen で 13.7 mg (妊娠時)~23.0 mg (授乳時)/kg/day (200 ppm)、NP で 270.4 mg (妊娠時)~455.3 mg (授乳時)/kg/day (3000 ppm)以上、BA で 231.8 mg (妊娠時)~384.4 mg (授乳時)/kg/day (3000 ppm)以上、Tam で 20.5 μ g (妊娠時)~34.8 μ g (授乳時)/kg/day (0.25 ppm) 以上であった。本研究で明らかに変動の認められた MXC、Gen、DINP について、他の研究で求められた無毒性量と比較すると、まず MXC については、OECD Test Guideline 407 のドラフトプロトコールに従って行った 28 日間反復投与試験結果からは無毒性量が 20 mg/kg/day 以下 (Okazaki et al., Arch. Toxicol., 75(2001) 513-521)、周産期及び出生後 6 週間の曝露による試験結果からは 5 mg/kg/day 以下という報告がある (Chapin et al., Fundam. Applied Toxicol., 40 (1997) 138-157)。これらと比較しても、本研究で得られた MXC の無毒性量が一番低い値を示している。Gen については、OECD Test Guideline 407 のドラフトプロトコールに従って行った 28 日間反復投与試験報告では無毒性量が 1000 mg/kg/day 以上との結果がある。一方、生後 1 日目から 5 日目までの期間の母ラットへの曝露により、100 mg/kg/day より明らかな内分泌影響を検出したとの報告があるが、より長期間 (妊娠 5 日ないし 7 日目から出生後 50 日目までの間) 混餌投与した研究報告では、明らかな変化は 25 ppm 以上から認められており、5 ppm では認めていない (Delclos et al.,

Reprod.Toxicol., 15 (2001) 647-663; Laurenzana et al., Food Chem. Toxicol., 40(2002) 53-63)。本研究での Gen の無毒性量は Wistar ラットを用いての雄児動物での血中 FSH レベルの 1000 ppm 群での低値を基に求めているが、200 ppm 以下の群では FSH レベルを計測していないため、厳密には最小毒性量が 1000 ppm ということになる。また、DINP の無毒性量に関しては、成熟動物に対する精巣毒性では 1000 mg/kg/day 以上 (CERHR (2000)), 生殖毒性では 665 mg/kg/day (Waterman et al., Reprod. Toxicol., 14(2000) 21-36)、発生毒性では 100 mg/kg/day (Waterman et al., Reprod. Toxicol., 13(1999) 131-136)という報告結果と比較すると、本研究で得られた無毒性量が一番低い値を示している。成熟動物より幼若動物の方が、外因性のホルモンに感受性の高いことが知られており、本研究結果はそれに合致している。また、ラットの脳の性分化の臨界期は、通常胎生 18 日前後から生後 10 日前後であるため、本研究では、その最も感受性の時期に合わせて曝露期間を設定した経緯がある。しかし、脳の性分化に関して、少なくとも生後 29 日まで外因性のホルモンに感受性の時期が持続するとの報告 (Davis et al. Neuroendocrinol. 62(1995) 579-585)があり、上記の Delclos らの Gen に関する報告にあるように、投与期間を拡大して EDC を投与した場合、内分泌障害を高感度に検出できる可能性が高い。一方、本研究では SD:IGS より Wistar:Imamichi ラットの方が感度高く低用量域からパラメータの変動を検出できたが、今後、再現性も含めて、大きく系統差の生じた原因を追求する必要があると考えられた。また、観察されたような内分泌系や行動の異常が個体に与える影響の重みは、個々には精子形成、排卵数、受胎効率等への程度の影響の有無で判断されるが、最終的には正常な生殖能力の有無で判断される。今回の実験条件ではラットの脳が性ステロイドに対して感受性の高い時期 (臨界期) に暴露しているが、ヒトで感受性の高い時期は、もしあるとすれば、胎児期中期以前と想定されているため、乳幼児の脳はすでに性ステロイドに対する感受性が低下している、あるいは失っていることが考えられる。従って、もしヒトに外挿する場合には、何らかの経路で胎児期に暴露される場合を想定することも必要だと考えられる。

In vitro 評価研究に用いたモデルとして、独自に開発・確立した in vitro B-BB モデル、アストロサイトモデル、ニューロンの各種初代培養系が挙げられ、エストロゲン化合物を用いての EDCs の評価指標を絞り込んできている。In vitro B-BB 評価系に関して、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、estradiol 及び各種 EDCs 候補物質を作用させたとき、ほぼすべての薬物で、即時的に L-glucose の透過性が低下した。この即時的反応である物質透過性の変化は、作用させた薬物が細胞内レセプターを介して遺伝子転写調節を介した反応として考えるには余りにも短時間の反応である。そこで細胞膜上にあるレセプター（ないし類似作用を持つ蛋白）を介して細胞質内で即時的に反応している可能性が示唆された。事実、即時的な物質透過性の抑制効果は Wortmannin の投与で消失することから PI3K を介したシグナル伝達系が直接関与していることがわかり、L-NAME を投与することでも、17 β -estradiol の即時的な物質透過性の抑制効果が消失したことから、最終的には NO が物質透過性制御のシグナルを担っていることが示された。従来 17 β -estradiol はエストロゲンレセプターを介した核内の遺伝子転写調節因子として考えられてきたが、核内因子としてのみならず、細胞質内の情報伝達シグナルの制御機能を有することが今回の研究で明らかとなった。この事実から EDC の効果を検討するに当たり、核内の遺伝子転写調節の観点ばかりではなく、細胞質内での情報伝達シグナルかく乱の可能性からも検討する必要性が明らかとなった。

次に、DINP の投与効果が、NO 産生低下傾向として見い出された事実は、昨年度までに t-BBEC-117 細胞へ DINP を投与した場合に L-glucose の透過性の抑制効果を見出せなかった事実を説明するものと考えられる。ただし他の EDC 候補物質に関する NO 産生量の測定結果は厳密な評価が難しい段階である。その原因として、今回用いた NO 測定系の検出限界が問題点と考えられている。DAF-2 による測定系は細胞外へ放出される NO を蛍光色素である DAF-2 が捕捉した結果の蛍光強度が変化する現象を基準とした実験系であり、NO が拡散する問題点と検出精度が NO 濃度で 10 nM 以上必要とする限界がある。今後は細胞内へ浸透する DAF-2 を用いて細胞内で NO を捕捉し、より厳密に NO 産生量を定量化できるように実験系を検討する必要がある。

培養中枢ニューロンの EDCs 検索系では、ラット胎仔海馬ニューロンの血清除去による細胞死評価系を用いることでエストロゲンや EDC 候補物質がニューロンの生存を一部抑制し、さらにインシュリンや IGF-1 などの神経栄養因子によるニューロンの生存維持作用を著しく増強することを初めて明らかにした。

古くからの研究により、脳神経系の分化発達や維持

に神経栄養因子が重要な役割を演じていることが知られている。特に発達期の脳神経系では、神経栄養因子によるニューロンの生と死の調節が「適切」に行われることが、ニューロンネットワークや脳構造の形成にとって不可欠であることが知られている。今回のニューロン評価系で得られた結果は、EDCs が発達期における神経栄養因子の生理作用を乱すことにより、正常な脳神経系の構造異常や機能障害を引き起こす可能性を示した点で重要である。これらは EDCs による発達期中枢神経系障害への新たな作用メカニズムとして注目される。今後、生存維持効果に限らず神経栄養因子による神経突起やニューロトランスミッター放出に対する影響についても検討する必要もあると考えられる。細胞内分子メカニズムについてはインシュリンレセプターまたは IGF-1 レセプターの下流を介するシグナル伝達分子とのクロストークが最も有力と考えられ、今後の実験で明らかにする必要がある。

E. 結論

EDCs の胎生期ないし乳児期曝露による内分泌機能中枢に与える影響のリスク評価を目的として、ラットを用いた個体レベルでの *in vivo* 評価研究と、神経中枢の個々の細胞機能単位を対象とした *in vitro* 評価研究を継続・終了した。

平成 11 年度は *in vivo* 及び *in vitro* の評価系ともエストロゲン化合物を用いて、その曝露条件の検討と各種検出系の確立に努めた。12 年度は、*in vitro* 評価系では、検出系の確立に伴い多数の検体をスクリーニングする系としての実験系の整備を図り、最終年度である 13 年度は EDCs の中枢ニューロンや B-BB に及ぼす影響に関して、分子メカニズムの解析を行った。その中で、培養中枢ニューロンの検索系では、ラット胎仔海馬ニューロンを用いた血清除去による細胞死に対する細胞保護作用の評価システムが、示唆されているホルモン作用の違いに関わらず EDC 候補物質の影響検索に有効であることが確認され、これらの化合物による生存維持効果が MAP kinase や PI3 kinase を介していることを明らかとした。また、神経栄養因子とのクロストークは、これまで知られていなかった EDCs の脳神経系における標的を新たに示した点で重要なものと考えられる。特にそれらの細胞内シグナル伝達経路を分子レベルで解析していく必要がある。

In vitro B-BB 評価系においては、estradiol 及び各種 EDCs 候補物質によって観察された即時的な L-glucose の透過性低下には、細胞質に存在する PI3 kinase と最終的には NO シグナルを介することが明かとなったが、

血管内皮細胞の NO 産生を評価に導入するためには、より厳密に NO 産生量を定量化できるように実験系を検討する必要がある。

In vivo 評価系では、脳の性分化の過程に関与する遺伝子ないしは性分化の結果として発現変動する遺伝子を指標として、脳の性分化に対する影響評価に盛り込んでいるが、今回の SD:IGS ラットを用いた実験で脳の性分化の臨界時期における視床下部神経核での遺伝子発現解析の結果、EDC 候補物質、特に他のパラメータでも明らかな内分泌影響が確認された MXC においても明らかな発現変動を感度良く見出せなかった。今後、化学物質による脳の性分化に対する影響を検索するためには、microarray を利用した標的神経核(SDN-POA 等)での網羅的遺伝子発現解析法の開発・導入や、脳の性分化の結果生じる神経細胞の可塑性の違いを検出する系の開発が望まれる。また、下垂体ホルモン産生細胞率の変動は MXC および EE 曝露群においてのみ認められ、他の検査項目による評価結果と一致していた。特に PRL 陽性細胞率は、これまでの検査で影響の検出されなかった 240 ppm MXC 曝露群においても変動が認められ、EDCs の周産期曝露の影響を検出する鋭敏なパラメータとなる可能性が考えられる。しかしながら EE 曝露群では、性成熟後での各抗体陽性細胞率の変動は検出されなかったことから、今後より詳細な経時的検討あるいは血中のホルモン濃度との比較などを通じてパラメータとしての有用性を見極める必要があると考えられる。

SD:IGS ラットを用いた検索結果から、MXC は最高用量で視床下部-下垂体軸に対する直接影響を介した性成熟後の生殖器障害を示すものと考えられた。DINP の最高用量の雌雄の精巣・卵巣に見られた変化については、脳の性分化障害を介した変化かどうかを確定するために更に経時的な観察による確認試験が必要と考えられたが、影響としては軽度であると考えられた。他の化合物については今回の実験条件では内分泌中枢かく乱影響がないものと判断された。

また、異なる飼料を用いることによって性発育パラメータに変動が認められ、外因性ホルモンによって誘発される変化の発現強度も異なることが示された。その原因は不明であるが、EDCs の評価に際しては、飼料の選択に留意する必要があると考えられる。

Wistar: Imamichi ラットを用いた検索結果から、脳の性分化の時期である胎仔期、新生仔期における EDC の曝露の成熟後の影響についての検討を行う上で、雄での血中 FSH の減少、雌における性周期回帰の検討や発情前期午後に誘起される LH サージの発現変化が有

用なパラメータとなりうるものと考えられたが、今後、例数を増やしての追試確認が必要であると考えられた。さらに、精子形成能や排卵数を確認するとともに、ロードーシス反射などを含めた生殖能力に対する影響を総合的に評価するために、実際にこれらの雌雄動物を用いて繁殖を行い、その効率を検討することも必要であると考えられた。

最後に、Wistar: Imamichi ラットを用いた検索では、母ラットの摂餌量をモニターしていなかったため、1日あたりの化学物質の摂取量は求められなかったが、2つの異なる系統を用いて得られた解析結果から、個々の化合物についての出生児影響に関する母体曝露の無毒性量を SD:IGS ラットでの摂餌量を基に求めたところ、MXC で 1.9 mg (妊娠時)~3.8 mg (授乳時)/kg/day (24 ppm)以下、DINP で 30.7 mg (妊娠時)~66.2 mg (授乳時)/kg/day (400 ppm)以下、Gen で 13.7 mg (妊娠時)~23.0 mg (授乳時)/kg/day (200 ppm)、NP で 270.4 mg (妊娠時)~455.3 mg (授乳時)/kg/day (3000 ppm)以上、BA で 231.8 mg (妊娠時)~384.4 mg (授乳時)/kg/day (3000 ppm)以上、Tam で 20.5 μ g (妊娠時)~34.8 μ g (授乳時)/kg/day (0.25 ppm) 以上であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. J. Histochem. Cytochem. (in press).

Shibutani, M., and Uneyama, C.: Methacarn a fixation tool for multipurpose genetic analysis from paraffin-embedded tissues. Methods Enzymol. (in press).

Shibutani, M., Uneyama, C., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Application of methacarn fixation for genetic analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. Toxicogenomics (in press).

Suzuki M, Yonezawa T, Fujioka H, Matsumuro M, Nishihara M.: Induction of granulin precursor gene expression by estrogen treatment in neonatal rat hypothalamus. Neuroscience Letters, 297: 199-202, 2001

Suzuki M, Nishihara M.: Estrogen affects gene expression of estrogen receptors, androgen receptor, and aromatase in the neonatal rat hypothalamus. J. Reprod. Dev., 48: 17-23,

2002

Suzuki M, Nishihara M: Granulin precursor gene; a sex-steroid inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol. Genet. Metab.*, 75: 31-37, 2002

Yokoi, T., Yamamoto, N., Tada, T., Fujita, M., Moriyama, A., Matsui, H., Takahashi, T., Togari, H., Kato, T., Asai, K.: Developmental changes and localization of mouse brain serine proteinase mRNA and protein in mouse brain. *Neuroscience Letters* (in press)

Yoneda, K., Yamamoto, N., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M., Mase, M., Yamada, K., Nakanishi, M., Tada, T., Miura, Y., Kato, T.: Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. *Mol. Brain Res.* 89: 94-102, 2001

Yamamoto, N., Yoneda, K., Asai, K., Sobue, K., Tada, T., Fujita, Y., Katsuya, H., Fujita, M., Aihara, N., Mase, M., Yamada, K., Miura, Y., Kato, T.: Alteration in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Mol. Brain Res.* 90: 26-38, 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.* 40: 53-60, 2001

Nakanishi, K., Kukita, F., Asai, K., Kato, T.: Recurrent subthreshold electrical activities of rat neocortical neurons progress during long-term culture. *Neurosci. Letters* 304: 85-88, 2001

Morikawa, M., Asai, K., Kokubo, M., Fujita, K., Yoneda, K., 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

Kataoka, H., Miura, Y., Joh, T., Seno, K., Tada, T., Tamaoki, T., Nakabayashi, H., Kawaguchi, M., Asai, K., Kato, T. and Itoh, M.: Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATF1 *Oncogene* 20: 869-873, 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

Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., Asai, K., and Kato, T.: Cyclic ADP-ribose as a potential second messenger for neuronal Ca^{2+} 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. *Neuroscience Letters* 297: 13-16, 2001

Katano, H., Fujita, K., Kato, T., Asai, K., Kawamura, Y., Masago, A., Yamada, K.: A metabotropic glutamate receptor antagonist, α -methyl-4-carboxyphenylglycine, attenuates immediate early gene mRNA expression following traumatic injury in cultured rat cortical glial cells. *Neuroscience Letters* 306: 101-105, 2001

Yamamoto, N., Sobue, K., Miyachi, T., Inagaki, M., Miura, Y., Katsuya, H., Asai, K.: Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C. *Mol. Brain Res.* 95: 110-116, 2001

Nishiwaki, A., Asai, K., Tada, T., Ueda, T., Shimada, S., Ogura, Y., Kato, T.: Expression of glia maturation factor during retinal development in the rat. *Mol. Brain Res.* 95: 103-109, 2001

Murai, M., Enokido, Y., Inamura, N., Yoshino, M., Nakatsu, Y., van der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Tanaka, K., Hatanaka H.: Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13379-13384, 2001

Inamura, N., Enokido, Y., Hatanaka, H.: Involvement of c-Jun N-terminal kinase and caspase 3-like protease in DNA damage-induced, p53-mediated apoptosis of cultured mouse cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 904: 270-278, 2001

2. 学会発表

渋谷淳, 畠山智香子: PALMを用いたパラフィン包埋微量組織からのRNA, 蛋白質, DNAの解析について—メタカーン固定法の利用, 第90回日本病理学会総会ランチョンセミナー, 東京, 4月, 2001

榊富直哉, 渋谷淳, 畠山智香子, 中川恵子, 仁保直子, 高橋則行, 小林恒雄, 広瀬雅雄: メトキシクロールの周産期曝露によるラットの性成熟および生殖器系への影響について, 第28回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京, 第28回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: p123 (O12-18), 6月, 2001

畠山智香子, 渋谷淳, 榊富直哉, 高橋則行, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からの多目的な遺伝子発現解析 (第三報), 第60回日本癌学会総会, 横浜, 第60回日本癌学会総会記事: p541 (1870), 10月, 2001

高木広憲, 渋谷淳, 榊富直哉, 畠山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 三森国敏, 広瀬雅雄: DiisononylphthalateおよびGenisteinの周産期曝露によるラットの性成熟および生殖器系への影響について, 第18回日本毒性病理学会, 東京, 第18回日本毒性病理学会講演要旨集: p45 (7), 1月, 2002

榊富直哉, 渋谷淳, 高木広憲, 畠山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 広瀬雅雄: エチニルエストラジオールの周産期曝露により誘発されるラット内分泌・生殖器系の変化に及ぼす実験動物用飼料の影響について, 第18回日本毒性病理学会, 東京, 第18回日本毒性病理学会講演要旨集: p46 (9), 1月, 2002

鈴木正寿, 西原真杉ら: グラニューリン前駆体蛋白のラット脳における免疫組織学的解析, 第24回日本神経科学大会, 2001年9月, 京都

西原真杉: 脳の性分化の誘導機構について 第94回日本繁殖生物学会シンポジウム, 2001年9月, 東京

西原真杉: 脳と性差 第4回万有製薬シンポジウム 若手研究者のための薬理学セミナー, 2001年10月, 東京

Kato, K., Mase, M., Masago, A., Aihara, N., Yamada, K., Yamamoto, N., Asai, K. (2001) Brain edema and glial cells: Role of the water channel Aouaporin-4

in Brain edema 第11回脳血管シンポジウム 2001.9.1 大阪

Nakanishi, K., Asai, K., Kato, T. (2001) Recurrent subthreshold electrical activities of rat neocortical neurons in long-term culture. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting 2001.11.10-15. San Diego, California, U.S.A.

Fujita, M., Ueki, T., Miura, Y., Asai, K., Yamada, K., Kato, T. (2001) Epidermal growth factor decreases connexin-43 expression in cultured rat cortical astrocytes. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting 2001.11.10-15. San Diego, California, U.S.A.

Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Ohira, M., Inuzuka, H., Morohashi, A., Kato, T., Nakagawara, A. (2001) High expression of human rim gene in neuroblastomas with favorable biologies. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting 2001.11.10-15. San Diego, California, U.S.A.

稲垣雅昭, 祖父江和哉, 多田豊曠, 浅井清文, 津田喬子, 勝屋弘忠 (2001) Glia Maturation Factor (GMF) 測定法の確立とその臨床的意義 日本麻酔学会第48回大会 4.26-27, 神戸

藤田政隆, 相原徳孝, 山本愛美, 山本直樹, 浅井清文, 多田豊曠, 加藤泰治, 山田和雄 (2001) カイニン酸誘発てんかんモデルでのラット海馬内における N-カドヘリンの変化 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

山本直樹, 浅井清文, 祖父江和哉, 多田豊曠, 藤田政隆, 山田和雄, 三浦 裕, 加藤泰治 (2001) 培養アストロサイトにおける低酸素-再酸素化における AQP9s 遺伝子の発現変化 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

青山峰芳, 浅井清文, 穴倉朋胤, 太平美紀, 犬塚博之, 諸橋愛子, 赤澤智宏, 高坂新一, 加藤泰治, 中川原 章 (2001) シナプス形成関連遺伝子 nbla0761/RIM1 の神経芽細胞腫における発現とその解析 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

中西圭子, 浅井清文, 加藤泰治 (2001) ラット大脳

皮質ニューロンのシナプス発達における GABA の役割 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

植木孝俊, 藤田政隆, 浅井清文, 佐藤康二, 山田和雄, 加藤泰治 (2001) Epidermal growth factor (EGF) による大脳皮質初代培養アストロサイトでの connexin-43 の発現の低減について 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

藤田政隆, 植木孝俊, 浅井清文, 加藤泰治, 山田和雄 (2001) 大脳皮質初代培養アストロサイトにおける epidermal growth factor (EGF) による connexin-43 の発現の低減 第 60 回日本脳神経外科学会総会 岡山

祖父江和哉, 山本直樹, 稲垣雅昭, 藤田義人, 浅井清文, 津田喬子, 勝屋弘忠 (2002) 脳冷凍損傷モデルにおけるアクアポリン発現の変化と脳浮腫への関与 第 29 回日本集中治療医学会大会 2.28-3.2, 岡山

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究
分担研究報告書（平成13年度）

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 病理部室長

研究要旨：内分泌かく乱化学物質(EDCs)の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手法を用いた *in vivo* 評価研究を行った。具体的には、脳の性分化の臨界期に代表的なEDC候補物質を母ラットに混餌投与して児動物に経胎盤・経乳的曝露を行い、脳の性分化の臨界期、離乳期及び性成熟後に各種解析を実施し、各々の曝露影響の評価を行った。最終年度である本年度は、まず昨年度までに動物実験を実施した methoxychlor (MXC; 24, 240, 1200 ppm), genistein (Gen; 20, 200, 1000 ppm), diisononylphthalate (DINP; 400, 4000, 20000 ppm), nonylphenol (NP; 60, 600, 3000 ppm), bisphenol A (BA; 60, 600, 3000 ppm) 及び tamoxifen (Tam; 0.005, 0.05, 0.25 ppm)の周産期曝露例について病理組織学的評価を確定した。その結果、MXCは、1200ppm 曝露を受けた雌で、エストロゲン作用の陽性対照物質である ethinylestradiol (EE) の0.5ppm 曝露例での生殖器影響に類似した病理組織学的変化を誘発した。また、20000ppm DINP は非常に弱いながら性成熟後の雌雄生殖器官に変化を誘発した。その他の化学物質はいずれの用量においても性成熟後の生殖・内分泌関連器官に病理変化を与えなかった。11週齢（一部、3週齢）時での性的二型核のサイズ測定を行った結果、全ての化合物で投与に関連した変動を認めなかった。次にこれらの児動物について、下垂体ゴナドトロピン産生細胞を免疫組織学的に定量解析した結果、MXCにおいて離乳時、成熟後にゴナドトロピン産生細胞数の変動を認め、特に性成熟後の雌で240ppm より prolactin 陽性細胞率が増加し、これらの検索が内分泌かく乱影響検出の有用な手段になりうることを見出した。また他の化合物では変動を認めなかった。脳の性分化への影響の microdissection 法を利用した分子生物学的解析については、既にEE周産期曝露例の視床下部の性的二型核を含む内側視索前野領域で、脳の性分化終了時の GABAtransporter type-1 (GAT-1)等のエストロゲン応答性遺伝子の発現変動を、雌雄で性成熟後に検出される変化と同等以上の感度で検出しうることを見出している。今年度は定量的なPCR解析方法を real-time RT-PCR 法に変更し、MXC, Gen, ないし DINP 曝露例での estrogen receptor α, β 及び GAT-1 の発現を検討し、雄における GAT-1 の発現が MXC の 1200 ppm 群で減少傾向を、DINP の 40000 ppm 群で有意な減少を示し、脳の性分化影響が示唆された。この発現解析と平行して、この神経核領域でのアポトーシスの定量解析を検討したが、無処置対照とEE曝露例で差を認めず、アポトーシス指標は混餌投与による *in vivo* 評価には適切でないことが判明した。この他、被検物質の混餌投与に用いる飼料の違いによるEEの周産期曝露影響を検討した結果、大豆・アルファルファ由来の phytoestrogen を含む通常の基礎飼料を用いた方が、phytoestrogen を含まない飼料に較べて、EEによる性成熟後の雌での生殖器影響が強く現れることを見出した。

以上の解析結果を総合すると、MXCは明らかに性成熟後影響を示したが、DINPに関しては更に確認試験が必要と考えられた。他の化合物は今回の実験条件では影響がないものと判断された。本実験条件における個々の化合物についての出生児影響のNOAELは、MXCで1.9mg（妊娠時）~3.8mg（授乳時）/kg/day (24ppm), DINPで306.7mg（妊娠時）~656.7mg（授乳時）/kg/day (4000ppm), Genで66.6mg（妊娠時）~113.1mg（授乳時）/kg/day (1000ppm) 以上, NPで270.4mg（妊娠時）~455.3mg（授乳時）/kg/day (3000ppm)以上, BAで231.8mg（妊娠時）~384.4mg（授乳時）/kg/day (3000ppm)以上, Tamで20.5 μ g（妊娠時）~34.8 μ g（授乳時）/kg/day (0.25ppm) 以上であった。

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。

最終年度にあたる今年は、代表的なEDC候補物質であるmethoxychlor (MXC), genistein (Gen), diisononylphthalate (DINP), nonylphenol (NP), bisphenol A (BA)や抗エストロゲン作用の知られているtamoxifen (Tam)を周産期曝露した児動物において、性成熟後の生殖・内分泌関連器官における病理組織学的評価の確定、脳の性分化終了後における児動物の性的二型核(SDN-POA)のサイズ測定並びに下垂体でのゴナドトロピン産生細胞の定量解析を行った。また、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おり、プロモーター領域にエストロゲンに反応するestrogen response element (ERE)をもつglial fibrillary acidic protein (GFAP)遺伝子の発現がビスフェノールAの胎生期曝露

により低用量から用量依存的に増加するとの報告もある。そこで、脳の性分化臨界期におけるSDN-POAを含む内側視索前野領域でのアポトーシスの定量解析とEREをもつ遺伝子群のreal-time RT-PCRによる定量解析を行った。

一方、通常用いられる実験動物用飼料には植物に由来するphytoestrogenが含まれているが、ラットを胎児期から新生児期にかけて異なる飼料で飼育することにより、春期発動期などの性発育パラメータの変動することが報告されている。しかし飼料の違いが外因性ホルモンにより誘発される変化に与える修飾作用については、ほとんど報告例がない。そこで、本研究では、基礎飼料中に含まれるphytoestrogenがEDCsの周産期曝露によるリスク評価に及ぼす影響についても、エストロゲン作用の陽性対照物質であるethinylestradiol (EE)を用いて検討した。

B. 研究方法

MXC, Gen, DINP, NP, BA及びTamを各々、SD(IGS)ラットに妊娠15日から生後10日までの間投与し、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、上記化合物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。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MXCを24, 240, 1200 ppm, Genを20, 200, 1000 ppm, DINPを400, 4000, 20000 ppm, NPを60, 600, 3000 ppm, BAを60, 600, 3000 ppm, Tamを0.005, 0.05, 0.25 ppmと設定した。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蛋白質を含まない

特殊飼料 (SF-NIH07, 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内側視索前野領域における遺伝子発現を解析する目的で、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 (雌では陰開口、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。

新生児視床下部の内側視索前野領域における遺伝子発現解析法として、メタカーン固定・パラフィン包埋切片について、レーザー光を用いた microdissection 法により目的部位を採取し、その部位の total RNA を用いて competitive RT-PCR を行い、plate hybridization 法により標的遺伝子の mRNA のコピー数を測定する方法を既に確立している。昨年度までに、EE を周産期曝露した雌雄の児動物での SDN-POA を含む内側視索前野領域において、GABA transporter type-1(GAT-1)の発現量の低下、GFAP 発現量の雄での増加、雌での減少を確認している。しかし、その後の検討で plate hybridization に用いる capture plate のロット差の大きいことが判明したため、PCR 産物の定量法を real-time RT-PCR 法に変更し、定量条件等の検討を行った。そして MXC, DINP 及び Gen 周産期曝露児動物について、生後 10 日目での遺伝子発現解析として、内側視索前野領域での estrogen receptor α , estrogen receptor β , GAT-1 及び GAPDH 発現量の定量解析を行った。

また、脳の性分化を果たす時期での EDC による視床下部ニューロンのアポトーシスを定量化する目的で、EE 0.4 ppm をラットに妊娠 15 日から生後 6 日までの間混餌投与し、生後 3 及び 6 日に児動物の脳を採取し、ホルマリニア

ルコール (ユフィックス) 固定後、連続切片を作製し、TUNNEL 染色、Nissle 染色、active caspase 3 免疫染色を施して、内側視索前野領域でのアポトーシス・インデックスを求めた。

また、基礎飼料中に含まれる phytoestrogen が EDC の周産期曝露によるリスク評価に及ぼす影響を検討するために、phytoestrogen を含む通常の基礎飼料 (CRF-1: オリエンタル酵母社製) あるいは phytoestrogen (-) の SF-NIH07 飼料を用いて、ラットに 0.5 ppm の EE を周産期 (妊娠 15~生後 10 日) 曝露し、母動物及び児動物に及ぼす影響を比較・検討した。

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は混餌投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺するため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

C. 研究結果

各 EDC 候補物質を用いた実験結果を Tables 1~18 にまとめた。Gen, 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・摂餌量の低値、児動物の出生時体重・体重増加量の低値等の毒性影響が認められた。Gen の 1000 ppm 群においても有意差はないが、児動物の出生時体重・体重増加量の低値が認められた。

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 (Tables 1~3)。同群では、生後 3 週時に雄で下垂体の FSH, LH, PRL 陽性細胞の減少、雌で LH 陽性細胞数の減少が認められた (Figs. 1, 2)。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 (Table 2)。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 (Table 2). 生後 11 週時の剖検では、同群で卵巣重量の低下が認められ (Table 2), 病理組織学的検索では、多卵胞性卵巣、子宮内膜上皮の増生、腔内膜上皮の増生・単細胞角化を伴う粘液変性が認められた (Table 3). 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が (Fig. 5), 雌の下垂体において PRL 陽性細胞率の増加が 240 ppm から、FSH 陽性細胞率の増加が 1200 ppm 群で認められた (Figs. 3, 4). しかし、陽性対照である 0.5 ppm EE では、生後 3 週目の雌の PRL 陽性細胞の増加が認められたのみで、生後 11 週目には変動が認められていない (Figs. 1, 2).

DINP の 20000 ppm 群では、精巣重量の低値及び雌の副腎重量の低値が生後 3 週時に認められたが、生後 11 週時には精巣及び副腎重量は対照群と同程度の値を示した (Tables 4, 5). 春期発動期の認められた時の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 (Table 5). 病理組織学的検索では、20000 ppm 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、卵巣における黄体数の減少が認められたが (Table 6), 他のパラメータには明らかな変動を認めなかった (Figs. 1, 3, 6).

Gen においては、1000 ppm 群の雄で春期発動の認められた時の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 週時には雄で 200 ppm から副腎重量 (相対) の高値が認められたが、病理組織学的検索や他の検索による結果では変化は認められなかった (Tables 7~9, Figs. 1, 3, 7).

NP においては、生後 11 週時に高用量群の雌で副腎重量 (相対) の高値が認められたが、病

理組織学的検索では変化は認められなかった (Tables 10~12, Figs. 1, 3, 8).

BA と Tam においては、全ての検索パラメータにおいて被検物質の曝露に直接起因すると考えられる変化は認められなかった (Tables 13~18, Figs. 1, 3, 9, 10).

新生児視床下部の内側視索前野領域における遺伝子発現解析として、本年度は real-time RT-PCR 法を導入し、定量条件等を確立した. そして MXC, DINP 及び Gen 周産期曝露児動物について estrogen receptor α , estrogen receptor β , GAT-1 及び GAPDH 発現量の定量解析を行ったところ、EE と同様に雄における GAT-1 の発現が MXC の 1200 ppm 群で減少傾向を、DINP の 40000 ppm 群で有意な減少を示した (Figs. 11, 12).

EE 0.4 ppm を母ラットに妊娠 15 日から生後 6 日までの間投与し、生後 6 日における児動物の SDN-POA を含む内側視索前野領域におけるアポトーシスを TUNNEL 染色, Nissle 染色, active caspase 3 免疫染色により検討したが、生後 11 週の卵巣・子宮に明らかな病理組織学的変化を誘発する本用量においても、SDN-POA 領域の神経細胞のアポトーシスに EE 曝露による影響は認められなかった.

EE の混餌投与による周産期曝露による影響の検索を行った. SF-NIH07 の飼料組成, 栄養組成, phytoestrogen 含量を Table 19 に示した. 異なる基礎飼料を用いることにより、性発育パラメータに変動が認められ、EE の混餌投与により誘発される変化の強度にも変化が認められた (Tables 20~23). 飼料自体の影響としては、SF-NIH07 において出生時体重の低値及び春期発動期の早期化が認められた. EE により誘発される変化の強度に関しては、春期発動期は CRF-1 群では雌で早期化、SF-NIH07 では雄で遅延が認められ、両飼料群で変化の発現様式が異なっていた (Table 22). 一方、性成熟後には CRF-1 群で EE により誘発される変化がより顕著であった. すなわち、CRF-1 群では全例が異常な性周期を示し、病理組織学的検索において