

稲熊真悟、大西浩之、村崎敏也、彦坂敦也、
曹 永晩、朝元誠人、白井智之 第 62 回日
本癌学会総会、名古屋、2003 年 9 月 25 日-27
日。

朝元誠人、外岩戸尚美、白井智之 2 次元
電気泳動法によるラット前立腺癌血清マー
カーの同定、第 62 回日本癌学会総会、名古
屋、2003 年 9 月 25 日-27 日。

外岩戸尚美、朝元誠人、白井智之 肝前が
ん病変の発生・進展に及ぼすギャップジャ
ンクションの役割—変異コネクシン 32 トラ
ンスジェニックラットを用いた解析—、第
62 回日本癌学会総会、名古屋、2003 年 9 月
25 日-27 日。

栗林正伯、朝元誠人、鈴木周五、白井智之
薬物代謝酵素誘導物質による MeIQx の肝発
がん修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名
古屋、2003 年 9 月 25 日-27 日。

小川久美子、竹下文隆、二口 充、朝元誠
人、白井智之 ラット肝細胞癌転移抑制遺
伝子 PARM-1、第 62 回日本癌学会総会、名
古屋、2003 年 9 月 25 日-27 日。

杉浦 諭、小川久美子、二口 充、彦坂敦
也、高橋青志郎、加藤浩司、白井智之
Phenylethyl isothiocyanate (PEITC)のマウス膀
胱発がんに対する影響、第 62 回日本癌学会
総会、名古屋、2003 年 9 月 25 日-27 日。

村崎敏也、彦坂敦也、小川久美子、杉浦 諭、

白井智之 p27^{kip1} 欠損マウスの N-butyl-N-
(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN)誘発膀胱発
がんに対する感受性、第 62 回日本癌学会総
会、名古屋、2003 年 9 月 25 日-27 日。

大西浩之、辻村和也、朝元誠人、白井智之
植物由来各種がん抑制候補物質の肝発がん
修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、
2003 年 9 月 25 日-27 日。

鈴木周五、朝元誠人、辻村和也、白井智之
ラット肝前癌病変内外の網羅的遺伝子発現
解析、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003
年 9 月 25 日-27 日。

Tsujimura, K, Asamoto, M, Suzuki, S,
Inaguma, S, Ogawa, K, Shirai, T Potential for
the prediction of carcinogenicity by gene
expression profile in rat hepatoma cells and
comparison of expression patterns between
chemically treated rat and human hepatoma cells
JSTP/IFSTP(IATP), Kobe, Feb, 2004

Suzuki, S, Asamoto, M, Kazunari Tsujimura,
K, Ogawa, K, Futakuchi, M, Shirai, T
SPECIFIC DIFFERENCES IN GENE
EXPRESSION PROFILE REVEALED BY
CDNA MICROARRAY ANALYSIS OF
GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
PLACENTAL FORM (GST-P)
IMMUNOHISTOCHEMICALLY POSITIVE
RAT LIVER FOCI AND SURROUNDING
TISSUE JSTP/IFSTP(IATP), Kobe, Feb, 2004

Hokaiwado, N, Asamoto, M, Shirai, T

Enhanced preneoplastic lesion induction in the livers of gap junction disrupted transgenic rats
JSTP/IFSTP(IATP), Kobe, Feb , 2004 特になし

Kandori, H, Kuribayashi, M, Inaguma, S, Asamoto, M, Hokaiwado, N, Takahashi, S, Shirai, T Lack of modification of MeIQx rat liver carcinogenesis by caffeine induction of CYP1A2
JSTP/IFSTP(IATP), Kobe, Feb , 2004

Murasaki, T, Ogawa, K, Hikosaka, A, Sugiura, S, Takahashi, S, Shirai, T SUSCEPTIBILITY OF P27^{KIP1} KNOCKOUT MICE ON *N*-BUTYL-*N*-(4-HYDROXYBUTYL) NITROSAMINE-INDUCED URINARY BLADDER CARCINOGENESIS
JSTP/IFSTP(IATP), Kobe, Feb , 2004

Ohnishi, H, Tsujimura, K, Asamoto, M, Kuribayashi, M, Suzuki, S, Ogiso, T and Shirai, T Chemopreventive effects of plant derived compounds in a rat medium term liver bioassay and on hepatocellular carcinoma cell lines and gene expression analysis by a *microarray*
JSTP/IFSTP(IATP), Kobe, Feb , 2004

H 知的所有権の取得状況

1 特許

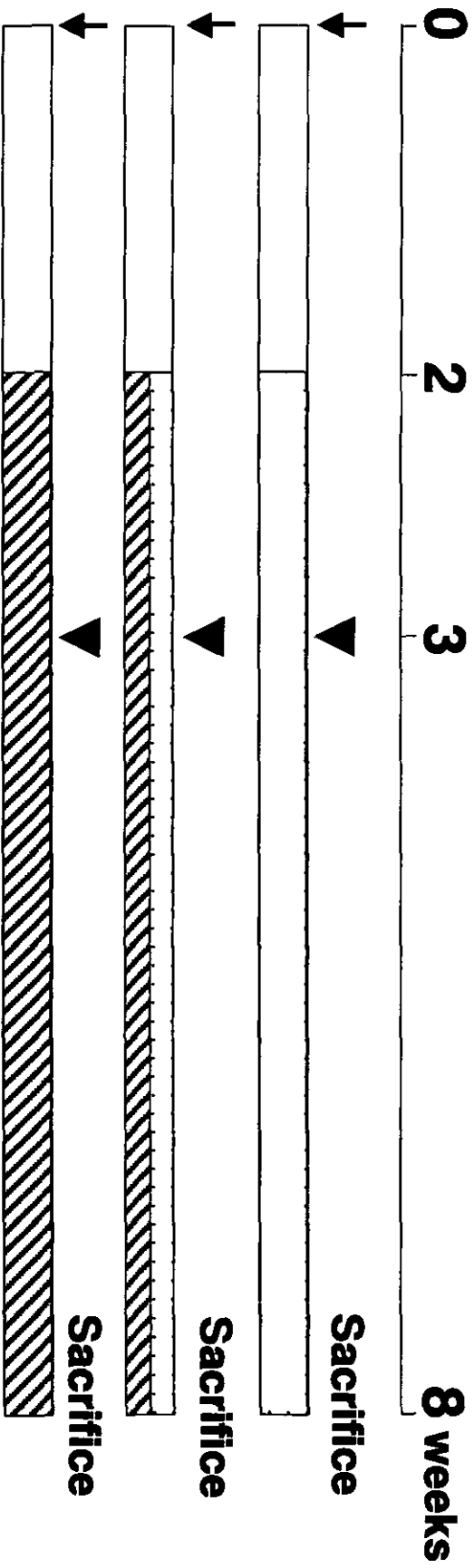
特になし

2 実用新案登録

特になし

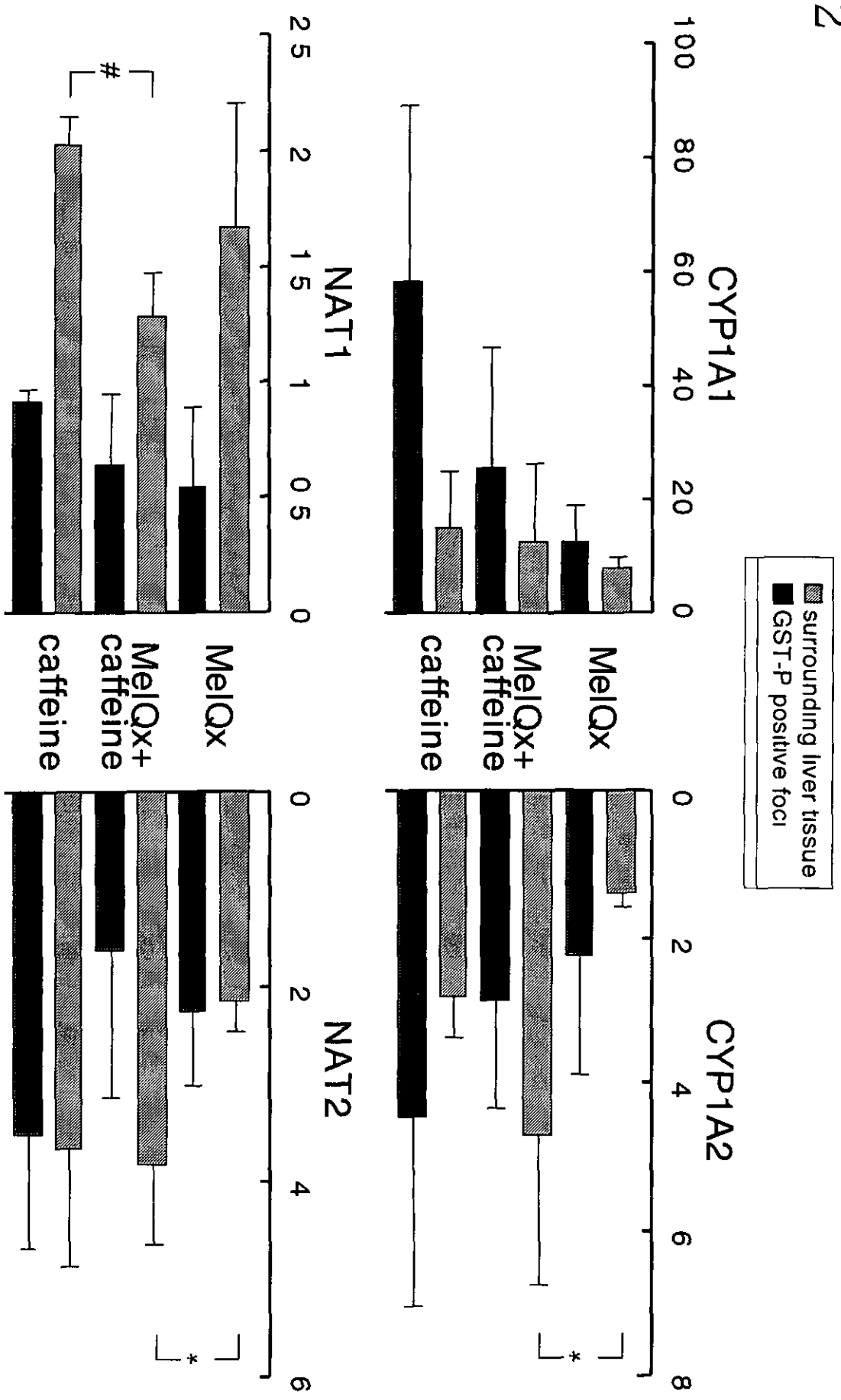
3 その他

Animal experiment design



F344 male rats

- ↓ : DEN 200 mg / kg, i.p.
- ▼ : 2/3 Partial hepatectomy
- : MeIQx (0.01%, in diet)
- ▨ : CYP1A2 inducers



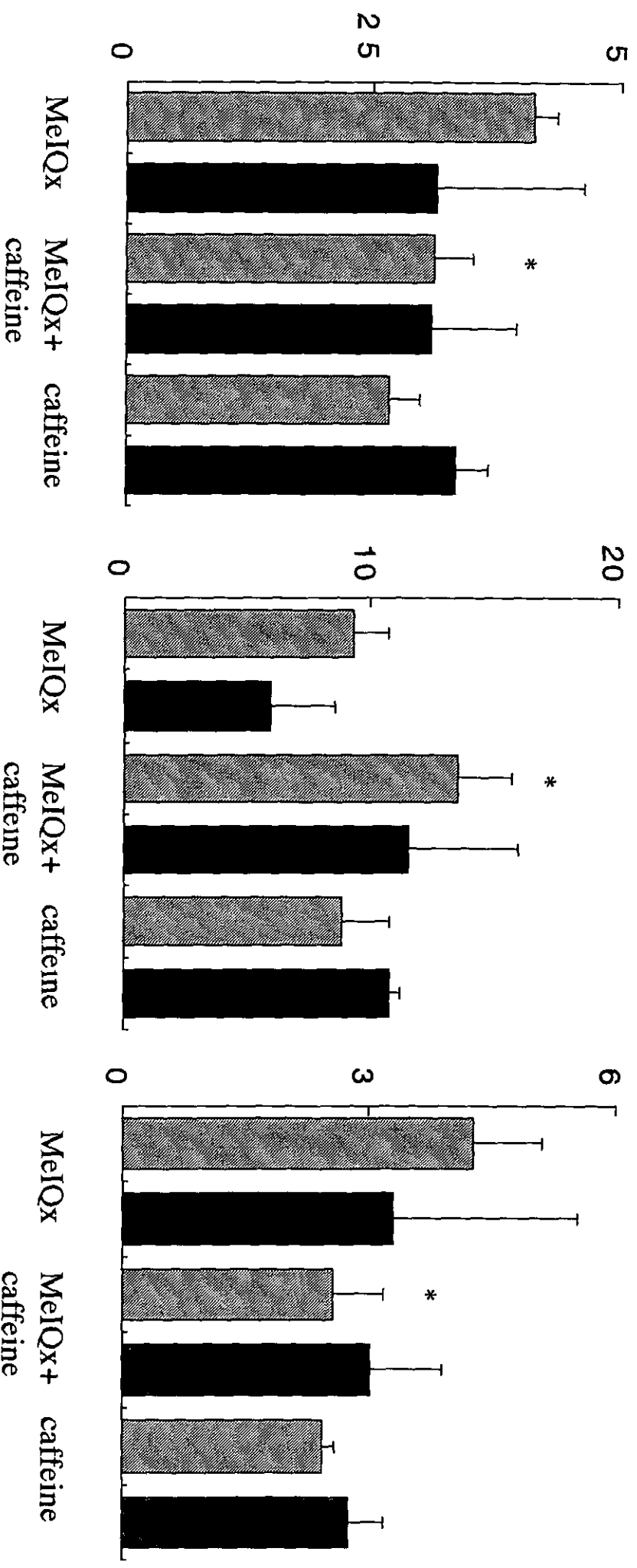
*, $P < 0.05$, MelQx v s MelQx+caffeine #, $P < 0.05$, MelQx+caffeine v s caffeine t -test
 Values for horizontal axis showed relative expression to normal F344 rat liver tissue

**Gene expression of MelQx metabolizing enzymes
 (Quantitative RT-PCR, Lightcycler)**

Sdc2

p21

CDK4



*, $P < 0.05$, MeIQx v s MeIQx+caffeine t -test
 Values for longitudinal axis showed relative expression to normal F344 rat liver tissue

**Gene expression of Sdc2 and Sdc2-related cell cycle genes
 (Quantitative RT-PCR, Lightcycler)**

Quantitative results for GST-P positive liver cell foci

Treatment	Number (/ cm ²)	Area (mm ² / cm ²)
MelQx	10.1 ± 3.4	0.64 ± 0.25
MelQx+caffeine	9.4 ± 2.8	0.61 ± 0.21
<u>caffeine</u>	<u>6.5 ± 1.2</u> *	<u>0.41 ± 0.13</u> *

Data shows mean ± S.D.

* $P < 0.05$ s. MelQxMann-Whitney U-test with Bonferroni correction

Representative genes which showed altered expression in MelQx+caffeine compared to MelQx

Gene symbol	Surrounding liver tissue	GST-P positive foci	Gene name (commentary)
Ahsg	↓	-	fetuin
Apoa1	↓	-	apolipoprotein AI (APOA1)
Apoa4	-	↓	apolipoprotein AIV (APOA4, APOC4)
Bhmt	↓	-	betaine homocysteine methyltransferase (BHMT)
Cyca	-	↓	cytochrome c expressed in somatic tissues (CYCSA)
Cyp2b1	-	↓	cytochrome P450 11B1 (CYP2B1)
Cyp2c11	↓	↓	cytochrome P450 11C11 (CYP2C11), P450(M-1), P450H, P450-UT-A, UT2
Cyp7a1	-	↓	cholesterol 7- α -hydroxylase
dbi	↓	↓	11-kDa diazepam binding inhibitor (DBI)
Erp70	↑	↓	endoplasmic reticulum stress protein 72 (ERP72), calcium-binding protein 2 (CABP2)
Fabp1	↓	↓	liver fatty acid-binding protein (L-FABP), Z-protein, squalene- & sterol-carrier protein (SCP)
FBN	-	↑	fibronectin
GPX1	↓	-	cellular glutathione peroxidase I (GSHPX1, GPX1)
Hsd11b1	↓	-	corticosteroid 11- β -dehydrogenase isozyme 1 (11-DH) 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11- β -HSD1)
HSP90-beta	-	↓	heat shock 90-kDa protein beta (HSP90-beta), HSP84, HSPCB
Mak	↓	-	Mak, male germ cell-associated kinase, highly expressed at and after meiosis
Map2k2	↓	-	MAPKK2, mitogen-activated protein kinase kinase 2
Mgst1	↓	-	microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1), GST12
NfkB1	-	↓	NF- κ B(P105)
Pon1	↓	-	serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1)
Rpl3	↓	-	serum arylalkylphosphatase 1, aromatic esterase 1 (A-esterase 1)
Sdc2	↓	-	60S ribosomal protein L3 (RPL3)
Serpina1	-	↓	Ryudocan/syndecan 2
Sic10a1	-	↑	alpha-1-antitrypsinase, alpha-1-proteinase inhibitor, alpha-1 antitrypsin solute carrier family 10 member 1 (SLC10A1)
Sod1	↓	-	sodium/bile acid cotransporter, sodium/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)
Sparc	-	↓	Superoxide dimutase 1, soluble
Ugt2b12	↓	-	Secreted acidic cysterin-rich glycoprotein (osteoneclin) UDP-glucuronosyltransferase 2B

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

生体防御因子としての酸化ストレス感受性の偏倚による食品中残留農薬等の
毒性発現の修飾に関する研究

分担研究者 菅野純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

複数の毒物に同時に曝露（複合曝露）される事例は食品中残留農薬を対象とした場合、通常の食生活等に於いて十分にその様なことが起こりうると想定される。農薬の中には、標的とする細胞を傷害する機構として酸化ストレスや生体内エネルギー生成阻害を引き起こすものが少なくない。酸化ストレスの様に、その反応自体は新たな遺伝子発現を必要としない機構や、それらの複合曝露時の毒性機序の解析は従来手法では遂行し難く、高精度のデータ標準化を併用した網羅的遺伝子発現解析手法を以て初めて効率的に行うことが出来る。本研究では酸化ストレス誘導剤に対して生体内活性酸素種の最大の生成源でもあるエネルギー代謝系の阻害剤が複合的に作用した事例をモデルとして網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、より高精度の毒性評価・解析手法の構築を行う。平成15年度は酸化ストレス障害物質が引き起こす毒性機序を Affymetrix 社 GeneChip システムを用いて *in vitro* および *in vivo* で解析すると共に、複合曝露下に於いて相殺・相殺効果を呈する遺伝子候補の絞り込み手法の検討を行った。

A 研究目的

本研究は、毒性評価に於いて使用されている安全係数に含まれるところの毒性反応に於ける宿主要因（種差、個体差等）の指標のより科学的メカニズムに基づいた設定に向けて、残留農薬等、外来性化学物質の曝露による毒性反応を分子

生物学的知識に基づき検討することを究極の目的とし、そのための基本的な技術である宿主要因と複合曝露効果の検出・評価方法を構築するものである。

B 研究方法

平成14年度までの成果で、酸化ス

トレスによる毒性のような、新たな遺伝子発現を介さない毒物においても二次的な遺伝子発現誘導を観察することで毒性評価可能であることが示唆され、また複合曝露時の毒性機序を遺伝子発現データで予測出来る可能性が示唆されていたため、本年度は主に *in silico* での解析と基本アルゴリズムの開発を進めた。

酸化ストレスに関しては、細胞培養環境と生体内環境の酸素分圧を含めた酸化還元状態が異なるため、BALB/3T3 細胞におけるパラコート曝露実験の遺伝子発現データのみならず、C57Bl/6 12 週齢・雄にパラコートを強制経口投与し用量・経時的にサンプリングした肝・肺での遺伝子発現データの分譲を得て、毒性機序の分子レベルでの比較解析を行った。

複合曝露時の毒性誘導現象である相乗・相殺効果については、遺伝子発現レベルにおける評価アルゴリズムで既知のものか存在しないため、平成 14 年度に得られたデータをモデルとし、評価アルゴリズム新規構築に向けた基礎的検討を行った。

遺伝子発現データは独自に開発した遺伝子発現量の絶対量化手法により標準化し、SiliconGenetics 社 GeneSpring および独自開発のソフトウェア (MF ツール群) にて解析を行った。

(倫理面への配慮)

基本的に *in vitro* および *in silico* 実験を

中心に行うが、やむを得ず使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。

C 研究結果

酸化ストレス毒性物質であるパラコートは、エネルギー代謝回路毒である 2-デオキシグルコース (2-DG) やシアノ化ナトリウム (NaCN) と比べ激的な毒性反応を呈するが、*in vitro* において、曝露後 3, 6, 12hr での遺伝子発現誘導では DNA 修復や細胞周期、および細胞死関連分子など酸化ストレスに特徴的とされる主要分子で有意な変化を示したのは *Atm* のみで他はほとんどなかった。*in vivo* においては、各遺伝子毎に特有の日内変動周期パターンを差し引いた上で評価したところ、各種の酸化ストレス応答遺伝子の変動が観察され、さらにはパラコートの主要標的とされる肺臓と、一般的な体内酸素分圧環境にある肝臓とでは、遺伝子発現誘導までの経過時間に差異が観察された。すなわち、いずれの臓器でも *Gst* 関連分子や *Txn* 関連分子、*Hsp* 等のストレス応答分子が発現していたが、それらの誘導は肺臓では曝露後 2hr、肝臓では 8hr を中心にしていた。また特に酸化ストレス分子の補充的二次誘導は一

一般的に複数の観測時点で捉えられることなく、急峻な一峰性の誘導反応であるが示唆された。

次に、平成 14 年度までに細胞死の相殺効果を確認されている 2-DG および NaCN の複合曝露モデルにおいて詳細な解析を進めたところ、本モデル系では単剤曝露効果の単純加算では説明の出来ない相乗・相殺効果の要因が、最終的な細胞死誘導段階にあることが示唆された。すなわち解糖毒の 2-DG およびミトコンドリア毒の NaCN それぞれの単剤曝露において、それぞれの作用標的とその関連分子への影響パターンが全く異なり、複合曝露時の該当分子の遺伝子発現パターンは単剤曝露の相加で説明の付くものが多かった。一方、2-DG および NaCN の最終毒性作用である細胞死、特にアポトーシスにおいては、共通の誘導・抑制分子を利用していることが多く、複合曝露時の遺伝子発現パターンには単剤曝露の加算では説明の付かないものが複数見いだされた。

D 考察

パラコートによる毒性分子機序の *in vitro in vivo* 比較では、両者の差異を改めて認識するに至った。*In vitro* の測定時点設定 (3, 6, 12hr) と、*in vivo* の測定時点 (2, 4, 8, 24hr) が、生物学的に対応する時間軸であったかどうかの検証は済んでいない段階ではあるか、時間的に近接す

るデータ間の比較によれば、有意と思われる差異が観察された。将来、生体における毒性評価を *in vitro* データから予測するためには、かなりの規模の比較データベースを構築する必要があるだろう。

さらに肺臓と肝臓では、特に抗酸化ストレス分子の遺伝子発現パターンにおいて、それらの細胞系譜差以上の差異があるように観察され、酸素分圧等、各臓器のおかれている酸化還元環境の影響が推察された。このことは将来のゲノミクスによる毒性予測システムでは細胞系譜毎の発現遺伝子構成のみならず、細胞・臓器がおかれている酸化還元状態等の環境因子を加味する必要性を示唆している。すなわち、今回観察された肺臓と肝臓では、抗酸化ストレス分子の分子シグナルカスケードには根本的な差異は無いと考えられた。そのため、抗酸化ストレス分子の発現時点のズレは各臓器での酸化還元状態を反映したものであると考察され、このことから、諸臓器の反応の総体として把握し得ると想定される個体レベルでの最終的な毒性予測自体は少数の代表臓器での測定評価で賄える可能性が高い。

また複合曝露モデルの解析により、単独曝露時の遺伝子発現パターンデータベースによって複合毒性予測の実現可能性が高まった。すなわち、同じ分子シグナルカスケードを介する複数の毒性物質が複合的に作用する場合、程度の差こそあ

れ、毒性の相乗・相殺効果が生し得ること、逆に分子シグナルカスケードレベルで全く重複のない毒性物質同士が複合的に作用しても、相乗・相殺効果を呈する可能性は低いこと、が示唆され、単独曝露時の情報だけでも高度な予測が可能であり、個々の複合曝露の組み合わせを評価してゆくよりも効率が良く現実的と考えられる。ただし、このための遺伝子発現情報データベースは分子シグナルカスケードを抽出し得る高精度かつ全遺伝子を含む網羅的なものであることが必須である。ここで、データの標準化手法選択の重要性が示され、絶対量化を行わないデータでは十分な解析が行えなかった。

完全な複合毒性予測を行うためには遺伝子発現情報データベースを元に分子シグナルカスケード情報を完全に把握するシステムが将来的に必要となる。しかし、十分な性能を持ったシグナルカスケード抽出アルゴリズムが出来上がっていない現状においては、各分子機能の既知情報や、教師なしクラスタリング（自動遺伝子分類）による疑似的シグナルカスケード抽出の段階を以って代替することになる。今回の解析結果によれば、絶対量化システムによる高精度網羅的遺伝子発現情報データベースが完成すれば、現行の代替手法でもある程度の複合毒性予測が出来るようになるものと推測される。

E 結論

新たな遺伝子発現を必要としない酸化的ストレス障害のような毒性についてもゲノミクス手法で捕捉・評価できることを明らかにし、この際、測定時点設定の重要性や実験サンプルの酸化還元状態などの留意点を含めた測定手法を確立した。これにより遺伝子発現情報データベースによる総合的な毒性評価・予測システム構築の可能性が一層高まった。

また複合曝露のような通常手法では評価難しい毒性についても、実際に相殺効果の確認されている複合毒性モデルから分子レベルの知見が得られたことから、網羅的な遺伝子発現の観察により根本的な評価が可能であることが示唆された。これらにより、将来の総合的な毒性評価・予測システムの実現のために必要な、高度な遺伝子発現情報データベースが有すべき基本性能が明らかとなった。

F 健康危機情報

なし

G 研究発表

● 1 論文発表

なし

2 学会発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

平成15年度厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

「食品中化学物質の毒性評価に及ぼす諸要因に関する調査研究」
農薬等の複合投与による免疫系並びにアレルギーへの影響に関する研究

分担研究者 小野 宏 （財）食品薬品安全センター秦野研究所 所長
研究協力者 澤田 純一、手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所、
金澤 由基子、小島 幸一、新藤 智子、古谷 真美
（財）食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

農薬等食品中化学物質相互のアレルギー増悪作用の有無を検討するために、*in vitro* の系では食品中に混在し得る化学物質として、農薬、可塑剤として用いられているフタル酸ジブチル（DBP）をとりあげ、ラットの培養マスト細胞の脱顆粒並びに遺伝子発現変化を遊離 β -hexosaminidase 活性並びに DNA チップ技術（Affymetrix GeneChip）を用いて解析した。その結果、非常に多くの転写因子や転写調節因子の発現が増加し、また、ストレス応答遺伝子 Gadd 45a の発現も顕著に増加した。他に、サイトカインである TNF- α や IL-3 の発現も顕著に増加した。また、各種ヒストンの発現も増加した。多くの遺伝子発現は、DBP と抗原との共存刺激により、相加的あるいは相乗的に増加した。中でも、転写因子 Egr-1 や Jun-D の相乗的な発現増加は顕著であった。チオファネートメチル（TM）は RBL-2H3 細胞からの脱顆粒反応に有意な影響を与えなかった。クロロニトロフェン（CNP）あるいは TM それぞれ単独では、CNP による増強効果が観察されたが、PAP による増強効果はみられなかった。CNP と PAP の併用では、CNP 単独による増強効果が相殺される結果が得られた。*in vivo* の系では、フェントエート(PAP)、CNP あるいは TM の単独吸入曝露、PAP と CNP との併用曝露による免疫機能への影響を、BALB/c マウスを用いて検討した。脾臓細胞を用いたリンパ球幼若化反応では、mitogen 無刺激時に対する増加率で比較すると、CNP、PAP の単独および併用曝露群の多くで mitogen である PHA および LPS 刺激に有意に強く反応した。ヒツシ赤血球浮遊液を用いたプラーク形成試験では、TM 曝露群が有意な低値を示した。

免疫系の作用は神経系、内分泌系などとの相互作用が強く、*in vitro* で確認された作用が *in vivo* で直接認められないことも多い。しかし、*in vitro* の実験結果を手がかりに、*in vivo* で確認を行い、生体に影響するかどうかを調べていくことは環境化学物質の安全性評価に重要であり、本研究で実施してきた *in vitro* および *in vivo* の実験系はその関連性を検討する手段として有用である。

A 研究目的

アレルギー疾患は近年増加する傾向が認められているが、環境汚染物質の存在がその原因の一つとして疑われている。これらの環境汚染物質曝露によるアレルギー疾患増悪の有無を明らかにすることが急務とされるものの、簡便かつ適切な評価系に乏しいのが現状である。我々の分担研究としては、農薬等食品中化学物質相互のアレルギー増悪作用の有無を検討するために、アレルギーモデル系を確立することを目的としている。今年度は、*in vitro* の系として食品中に混在し得る化学物質として、農薬に加えて、ゴム製品、プラスチックなどの可塑剤として用いられているフタル酸エステル（フタル酸シブチル、DBP）をとりあげ、抗原特異的 IgE で感作されたラットの培養マスト細胞の抗原刺激による脱顆粒並びに遺伝子発現変化を遊離 β -hexosaminidase 活性並びに DNA チップ技術（Affymetrix GeneChip）を用いて解析し¹⁾、農薬並びにフタル酸エステルのマスト細胞への影響を評価した。

また、*in vivo* の系としては、フェントエート（PAP）、クロルニトロフェン（CNP）あるいはチオファネートメチル（TM）の単独吸入曝露、PAP と CNP との併用曝露による免疫機能への影響を、BALB/c マウスを用いて検討した。

B 研究方法

1 *In vitro* アレルギーモデル系での検討

(1) 試薬の調製 TM、CNP、PAP は、50mg/mL、100mg/mL、200mg/mL の濃度で、また DBP は、10mM の濃度で DMSO に溶解し、PIPES 緩衝液（10mM PIPES (pH7.4)、0.14M NaCl、5mM KCl、0.1% BSA、5.5mM glucose、1.0mM CaCl₂、0.6mM MgCl₂）を用いて所定の薬物濃度になるように調製し、DMSO 濃度は 0.5% として細胞に作用させた。

(2) 脱顆粒反応の測定 24 ウェルのマイクロタイタープレートに、10% FCS を含む DMEM 培地に 1×10^5 cells/mL の濃度に浮遊した RBL-2H3 細胞を 1mL ずつ加え、37°C で 16 時間、CO₂ インキュベーター中で培養した。その際、DNP 特異的マウスモノクローナル IgE 抗体溶液 5 μ g を培養液に加え、細胞の感作を行った。上清を除き、細胞

を PIPES 緩衝液で洗浄した後、各種濃度の農薬を加え、37°C で 30 分培養し、次いで抗原 (DNP-BSA、10 μ g/mL) を加え、刺激を開始した。刺激開始後、35 分後に上清を分取し、上清中に放出された β -hexosaminidase 活性を、基質を用いて比色法にて測定し、脱顆粒の程度の指標とした。なお、細胞に残った酵素量は、細胞から 0.2% Triton-X100 処理で溶出させ、比色法にて測定し、IgE 受容体架橋形成に伴って放出された酵素の割合を計算した。

(3) 遺伝子発現の測定 T-75 フラスコ中に 10% FCS を含む DMEM 培地に 1×10^6 cells/mL の濃度で培養された RBL-2H3 細胞 10mL に、シニトロフェノール (DNP) 特異的マウスモノクローナル IgE 抗体溶液 50 μ g を加え、細胞の感作を行った。上清を除き、細胞を PIPES 緩衝液で洗浄した後、DBP 50 μ M を加え、37°C で 10 分培養し、次いで抗原 (DNP-BSA、10 μ g/mL) を加え、刺激を開始した。刺激開始後、1 時間および 3 時間後に細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies) により total RNA を抽出した。T7 プロモータを付加したオリゴ dT プライマー (T7-(dT) 24 プライマー) (GENSET Corp) を用いて、SuperScript Choice system (Invitrogen Life Technologies) により逆転写し、二本鎖 cDNA を得た。PCI 処理によりこれを精製し、12 μ L の DEPC 処理水に溶解した。12 μ L のうち 3.3 μ L を用いて BioArray HighYield (ENZO) により 37°C、7 時間の *in vitro* 転写反応を行い、ヒオチン標識された cRNA を増幅した。RNeasy Mini (QIAGEN) により RNA を精製し、吸光度により濃度を測定した。20 μ g の RNA (1~32 μ L) に 5 倍濃縮 RNA Fragmentation Buffer (1M Tris acetate (水酢酸で pH 8.1) 4.0mL、0.64g MgOAc、0.98g KOAc/DEPC 処理水 20mL) を 8 μ L 加え、DEPC 処理水により全量を 40 μ L にして 94°C、35 分間処理を行った。断片化の前後における RNA のサイズを電気泳動により確認した。15 μ g のヒオチン標識 cRNA を用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションに用いたアレイは Rat Genome U34A (RG-U34A) で、これはラットの既知遺伝子と機能既知 Expressed Sequence Tag (EST) のすべて (8799 種) が載っており、コントロール遺伝子および断片化した cRNA を 60rpm、45°C、16 時間ハイブリ

45℃、16 時間ハイブリダイズした。Affymetrix Fluidics Station により、アレイの染色および洗浄を行い、ヒオチン標識 cRNA を streptoavidin-PE (SAPE) で染色、ヒオチン標識抗アヒシン IgG の結合、SAPE による再染色という増感手法で蛍光を増幅し、アレイスキャナ GeneArray により、Ar⁺レーザ 488nm 単色光励起の共焦点系で染色した RG-U34A の蛍光画像を取得した。解析には、Microarray Suite (Affymetrix)、GeneSpring (Silicon Genetics) および Microsoft Excel を用いた。Microarray Suite による統計処理の後、発現量を示すパラメータ (Signal) や、シグナルの信頼度 (Detection)、比較解析した場合はコントロールに対する発現比 (Fold Change) などのパラメータが、GenBank の Identifier などとともに表示されるので、このデータを元に GeneSpring および Microsoft Excel によりさらに統計処理を加えた。具体的には、Student の t 検定 (n=2) により、有意 (p<0.05) な発現増加を示した遺伝子を抽出し、このうち、発現変化が 3 倍以上でかつ発現シグナルが少なくとも 1 回は 1000 以上で、EST でないものを遺伝子として抽出した。

動物は、6週齢の雄性BALB/cマウスを使用した。群構成をTable 1に示した。各種農薬を1回1時間、週3回、計10回吸入曝露した。最終曝露の2日後に採血および脾臓、胸腺および肺(高濃度曝露群のみ)の摘出を行い、脾臓、胸腺および肺重量を測定した。各群5~6匹について脾臓細胞を単離し、リンパ球の増殖活性をBrdU assay (Cell proliferation detection kit, ロシユダイアグノスティクス) で測定した(実験1)。また、各農薬の高用量曝露群の各5~6匹について、あらかじめヒツシ赤血球浮遊液(SRBC)を静脈内投与した4日後に脾臓細胞を単離し、プラーク形成試験(PFC assay)を行った(実験2)。さらに、得られた血清を用いて、ELISAによる血清中総IgM濃度(BETHYL LABORATORIES)を測定した。統計学的処理にはStudentのt検定およびDunnettの多重比較検定を用いた。本試験は、法令に基づいて定めた所内動物取り扱い規定に従い、動物愛護の精神を遵守して行った。

C 研究結果

1 In vitroアレルギーモデル系での検討

(1) DBPによるRBL-2H3細胞の遺伝子発現への影響 Fig 1に、RBL-2H3細胞をDBP (50μM) のみ、抗原 (10μg/mL) のみ、およびDBP+抗原で処理して1時間および3時間後の遺伝子発現の様子を示す。Fig 1は、いずれかの処理によりcontrolに比べて有意 (p<0.05) な発現増加を示した遺伝子すべてを表示している。1時間後の時点では発現変化した遺伝子の総数は346種、3時間後では501種であった。転写因子であるEgr-1やGadd153、ケモカインの一種MCP-1等の発現増加が顕著であった。Table 2は、Fig 1に表した遺伝子のうち、発現変化が3倍以上でかつ発現シグナルが少なくとも1回は1000以上で、ESTでないものをまとめたものである。非常に多くの転写因子や転写調節因子の発現が増加していることが分かった。また、ストレス応答遺伝子Gadd 45aの発現も顕著に増加した。他に、サイトカインであるTNF-αやIL-3の発現も顕著に増加した。また、各種ヒストンの発現も増加した。多くの遺伝子発現は、DBPと抗原とによる共存刺激により、相加的あるいは相乗的に発現が増加した。中でも、転写因子Egr-1やJun-Dの相乗的な発現増加は顕著であった。

(2) 農薬類によるRBL-2H3細胞からの脱顆粒への影響 Table 3に、各種濃度 (0.01~100μg/mL) のTMによるRBL-2H3細胞からの脱顆粒(β-hexosaminidaseの遊離)結果を示すが、抗原刺激(Ag+)による脱顆粒反応への有意な影響は観察されなかった。Table 4に、含窒素系農薬CNP (10~30μg/mL)、有機リン系農薬PAP(100μg/ml)のそれぞれ単独での抗原刺激による脱顆粒反応への影響を調べ、更に両者の併用効果を調べた結果を示すが、単独効果では、CNPによる増強効果が観察されたが、PAPによる増強効果はみられなかった。CNPとPAPの併用では、CNP単独による増強効果が相殺される結果が得られた。

2 In vivo アレルギーモデル系での検討

有機リン系農薬PAPと、含窒素系農薬CNPの単独および併用曝露による影響および含硫系農薬TMの免疫系に対する影響をTable 5およびTable 6に示した。吸入曝露期間の体重推移 (Fig 2、3)、解剖

時体重、脾臓重量、胸腺重量および肺重量に吸入曝露の影響は認められなかった。血清中総IgM濃度にも変化は認められなかった。脾臓細胞を用いたリンパ球幼若化反応(BrdU assay)では、細胞のみの培養により、CNP-PAP併用曝露群で有意に低値を示した。Tリンパ球特異的mitogenであるPHA刺激により、CNP、PAPの単独および併用曝露群の多くで、有意な高値を示した。TM曝露群に関しては、媒体対照であるDMSO/Acetone曝露により増加傾向が認められ、TM曝露によりその増加が抑制される傾向が認められた。Bリンパ球特異的mitogenであるLPS刺激によりCNP-PAP併用曝露群の低濃度群が、有意な高値を示した。Mitogen無刺激時に対する増加率で比較すると、CNP、PAPの単独および併用曝露群の多くでPHAおよびLPS刺激に有意に強く反応していることが示された。一方、TM曝露群では、いずれの刺激に対しても有意な変化は認められなかった。曝露に用いた農薬による刺激に対してはいずれの群においても変化は認められなかった。

SRBCを前投与した動物を用いた実験2では、解剖時体重、脾臓重量および血清中総IgM濃度に変化は認められなかった。PFC assayでは、TM曝露群が有意な低値を示した (Table 6)。

D 考察

1 In vitroアレルギーモデル系での検討

我々は以前に、環境汚染物質であるDBPがマスト細胞に作用して細胞内カルシウム応答を惹起し、脱顆粒を誘導することを報告した³⁾。このことはDBPが遺伝子発現を介さずに直接的にマスト細胞の活性化を促す可能性があることを示している。今回の結果は、DBPが遺伝子発現レベルにも作用し、様々な転写因子の発現を介してマスト細胞の活性化に影響を及ぼしている可能性を示唆した。DBPは少なくとも7種の転写因子 転写調節因子の遺伝子発現を増加させたが、特に転写因子Egr-1は他の細胞系においてTNF- α の転写調節に関与しているという報告があり⁴⁾、本実験においてもTNF- α は有意な発現増加を示したことから非常に興味深い応答遺伝子であると思われる。ラットTNF- α 遺伝子上流にはEgr-1の認識配列 (atgcctgggtgtccc)

が存在するが、同様の配列がJun-DやEgr-1自身の上流にも存在する。Egr-1がこれらの遺伝子発現に決定的な役割を果たしているかどうかについてはさらなる解析が必要であるが、Table 2に掲げた遺伝子の半数以上にEgr-1の認識配列が確認されており、DBPによるマスト細胞の遺伝子発現変化におけるこの転写因子の重要性が強く示唆された。特に、抗原刺激とDBP処理による相乗的な発現増加効果が認められたEgr-1およびJun-Dにはそれぞれ8箇所および4箇所のEgr-1の認識配列が存在し、DBPによるマスト細胞のアレルギー反応の増悪反応においてEgr-1が重要な役割を果たしていることが想像された。また、農薬類による影響では、含窒素系農薬CNPが10-30 μ Mの比較的高濃度で、脱顆粒反応の亢進が見られたが、有機リン系農薬との併用によるさらなる上昇がみられるという結果は得られなかった。

2 In vivoアレルギーモデル系での検討

これまでに我々は、種々の環境化学物質、特に農薬について、免疫機能に対する影響を調べたが、今までの曝露条件は、経口投与、皮下投与が中心であった。環境化学物質の曝露経路として吸入曝露が臨床的にも重要な経路であることは知られおり、多くの毒性作用が吸入により認められている。今年度は、本研究の最終年度でもあり、今までの実験結果をより臨床に近づけることを目的に、吸入曝露による免疫系への影響を調べた。各農薬の高用量群の曝露量は、最大残留基準 (MRL) あるいは水質基準を基に設定した。すなわちTM 20ppm、CNP 0.005ppm、PAP 1ppm、CNP-PAP CNP 100ppm-PAP 1ppmとした。それぞれの低用量群は、高用量群の1/100とした。これらの農薬を吸入曝露した結果、体重推移、一般状態、解剖時の脾臓、胸腺、肺重量に変化は認められず、基準値内の曝露であれば、重篤な毒性は認められないことが確認された。免疫機能に対する実験のうち、リンパ球幼若化反応試験では、CNPおよびPAPの吸入曝露により、mitogenに対する反応性が増強する傾向が認められた。また、CNP-PAPの併用曝露により、その反応がさらに増強される傾向が認められた。一方、TM曝露においては反応が抑制される傾向が認められた。SRBC投与によるアレルギー状態に

においても、体重推移や各臓器重量に曝露の影響は認められなかったが、PFC assayにおいてTM曝露群が抗体産生能の低下を示した。この結果は、先に示したBrdU assayでの細胞増殖活性の抑制傾向と共通した作用と考えられ、TMはリンパ球などの免疫細胞の増殖抑制作用を有する可能性が示唆された。

CNPはin vitroの実験で脱顆粒促進作用が認められているが、in vivoの実験ではCNPを直接添加してもリンパ球の幼若化反応は促進されなかった。In vitroで用いた濃度はかなりの高濃度であり、生体に曝露させた濃度とは大きく異なっていること、in vivoの実験では、内的な経時的変化を捉えることが相当数の動物を用いないと困難であること、また全身性の反応では多くの生体反応の総合的所見があらわれることから、in vitroで確認される作用が直接認められないことも多い。従って、このような結果の乖離が起こった可能性がある。免疫系の反応は非常に複雑で、神経系や内分泌系など他の作用が大きく影響する分野である。この免疫系に対する環境化学物質の影響を調べることは、容易ではない。しかしin vitroの実験結果を手がかりに、in vivoで確認を行い、生体に影響するかどうかを調べていくことは環境化学物質の安全性評価に重要であり、本研究で実施してきたin vitroおよびin vivoの実験はその手段として有用である。

【参考文献】

- 1) Lockhart, D J et al Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays Nat Biotechnol 14, 1675-1680 (2000)
- 2) Nakamura, R, Ishida, S, Ozawa, S, Saito, Y, Okunuki, H, Teshima, R and Sawada, J Gene expression profiling of Ca²⁺-ATPase inhibitor DTBHQ and antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells Inflamm Res 51, 611-618 (2002)
- 3) Nakamura, R, Teshima, R and Sawada, J Effect of dialkyl phthalates the degranulation and Ca²⁺ response of RBL-2H3 mast cells Immunol Lett 80, 119-125 (2002)
- 4) McMahon, S B and Monroe, J G The role of early

growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response J Leukoc Biol 60, 159-166 (1996)

E 結論

DBP、CNP、PAPについてラットの培養マスト細胞の脱顆粒並びに遺伝子発現変化をβ-hexosaminidase release 並びにDNAチップ技術 (Affymetrix GeneChip) を用いて解析した。その結果、ストレス応答遺伝子Gadd 45a、サイトカインであるTNF-_αやIL-3の発現が顕著に増加した。DBPと抗原との共存刺激により、転写因子Egr-1やJun-Dが相乗的な発現増加を示した。in vivoの系では、PAP、CNPあるいはTMの単独吸入曝露、PAPとCNPとの併用曝露による免疫機能への影響を、BALB/cマウスを用いて検討した。リンパ球幼若化反応では、CNP、PAPの単独および併用曝露群の多くでmitogen刺激に有意に強く反応した。SRBCを用いたPFC assayでは、TM曝露群が有意な低値を示した。In vitroの実験結果を手がかりに、in vivoで確認を行い、生体に影響を与えるかどうかを調べていくことは環境化学物質の安全性評価に重要であり、本研究で実施してきたin vitroおよびin vivoの実験系はその手段として有用である。

F 【研究発表】

1) 論文発表

Teshima, R, Nakamura, R, Nakajima, O, Hachisuka, A and Sawada, J Effect of two nitrogenous diphenyl ether pesticides on mast cell activation Toxicol Lett 150, 277-283 (2004)

2) 学会発表

なし

G 知的所有権の取得状況

該当せず

Table 1 In vivo 農薬吸入曝露実験概要

マウス BALB/c、雄

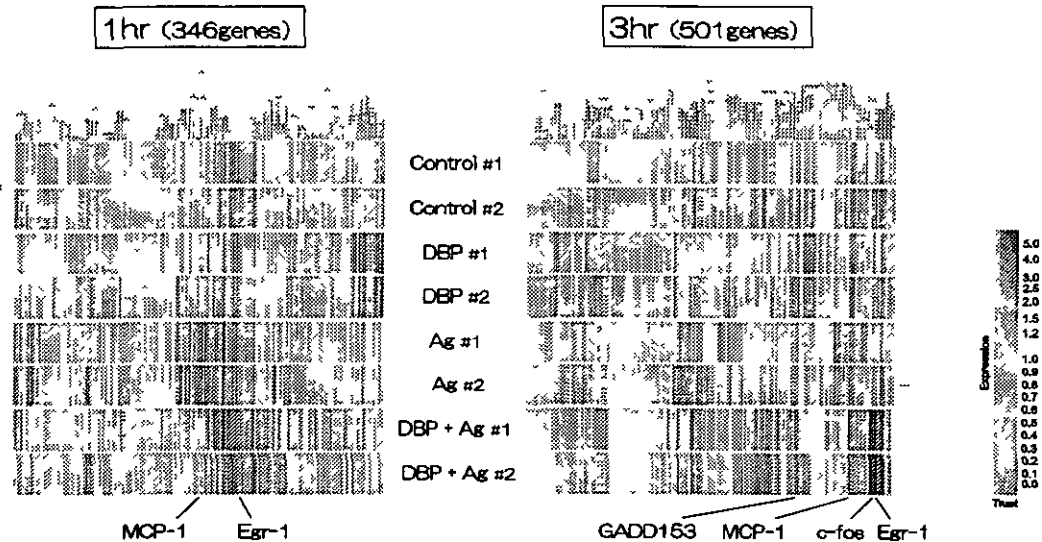
群	物質	濃度 (ppm)	動物数	
			実験 1	実験 2
1	100%エタノール (媒体 1)	100%	5	5
2	GNP (L)	0.00005	6	-
3	GNP (H)	0.005	6	6
4	PAP (L)	0.01	6	-
5	PAP (H)	1	6	6
6	GNP-PAP (L)	0.00005/0.01	6	-
7	GNP-PAP (H)	0.005/1	6	6
8	DMSO-Acetone (1/1) (媒体 2)	1/1	5	5
9	TM (L)	0.2	6	-
10	TM (H)	20	6	6
11	Non-treatment	-	4	4

GNP chlornitrofen, PAP phenanthroate, TM thiophanate-methyl

実験 1 脾臓細胞を用いたリンパ球幼若化反応 (LIT)

実験 2 ヒツジ赤血球によるブラーウ形成反応 (PFC assay)

Fig. 1 GeneChip による網羅的遺伝子発現解析



RG-U34A アレイに載っている 8799 種の遺伝子のうち、刺激 1 時間または 3 時間後に有意 ($p < 0.05$) に発現が増加した遺伝子の発現パターンを示す。縦方向が各遺伝子、横方向が各実験を示す。

Table 2 GeneChip による遺伝子発現解析

Gene	DBP		antigen		antigen + DBP	
	1 hr	3 hr	1 hr	3 hr	1 hr	3 hr
c-fos	2.32	1.90	24.70	0.59	54.67	3.61
c-jun	2.82	2.83	7.29	2.89	12.29	8.38
jun-D	1.25	6.19	1.67	0.98	1.98	36.31
Egr-1	2.29	2.02	19.42	2.77	31.93	23.81
Egr-2	2.06	0.77	19.56	1.02	28.55	3.58
CREM	0.71	2.52	3.12	4.27	2.15	5.62
GADD153	7.03	16.56	2.28	2.11	11.41	23.65
GADD45	1.48	3.47	4.11	2.99	3.78	5.05
MCP-1	0.69	8.22	29.63	144.87	9.82	169.48
TNF- α	0.73	1.52	10.21	3.33	6.17	5.57
IL-3	0.44	0.96	8.18	13.81	0.99	19.16
Histone H1d	5.47	6.68	2.90	1.02	10.40	12.03
Histone H2A	1.63	2.23	1.16	0.70	2.08	3.77
Histone H4	2.44	6.15	1.30	0.99	3.45	16.31

DBP (50 μ M) および抗原 (10 μ g/ml) で RBL-2H3 細胞を刺激した際の遺伝子発現変化。発現シグナルが 1000 以上で、かついずれかの条件で発現が 3 倍以上に増加した遺伝子を抜粋した。Control に対する比 (Fold Change) として表してある。

Table 3 チオファネートメチル(TM)の RBL-2H3 細胞脱顆粒への影響

TM ($\mu\text{g/ml}$)	β -hexosaminidase release %	
	Ag-	Ag+
0	2.77 \pm 0.33	14.2 \pm 2.49
0.01	0.19 \pm 0.36	15.7 \pm 1.60
0.1	1.83 \pm 2.23	17.3 \pm 1.96
1	2.52 \pm 0.53	18.3 \pm 0.09
10	1.32 \pm 2.41	15.6 \pm 0.36
100	0.57 \pm 2.35	11.3 \pm 0.09

Values are mean \pm SD (n=3)

Table 4 クロルニトロフェン(CNP), フェントエート(PAP)の RBL-2H3 細胞脱顆粒への影響

($\mu\text{g/ml}$)	β -hexosaminidase release %	
	Ag-	Ag+
0	0	23.0 \pm 0.37
CNP 10	1.05 \pm 0.52	31.7 \pm 8.83
CNP 30	2.76 \pm 2.53	30.1 \pm 2.26
PAP 100	0	16.1 \pm 2.19
CNP10, PAP100	0	13.1 \pm 1.92
CNP30, PAP100	0	11.5 \pm 1.16

Values are mean \pm SD (n=3)