

図表

(マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価)

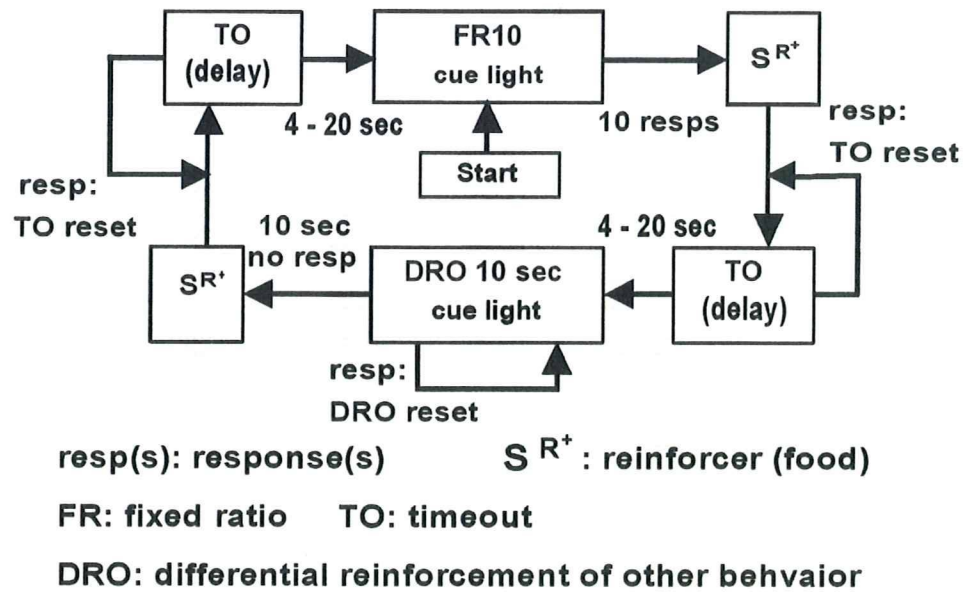


Fig. 1 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 説明図.

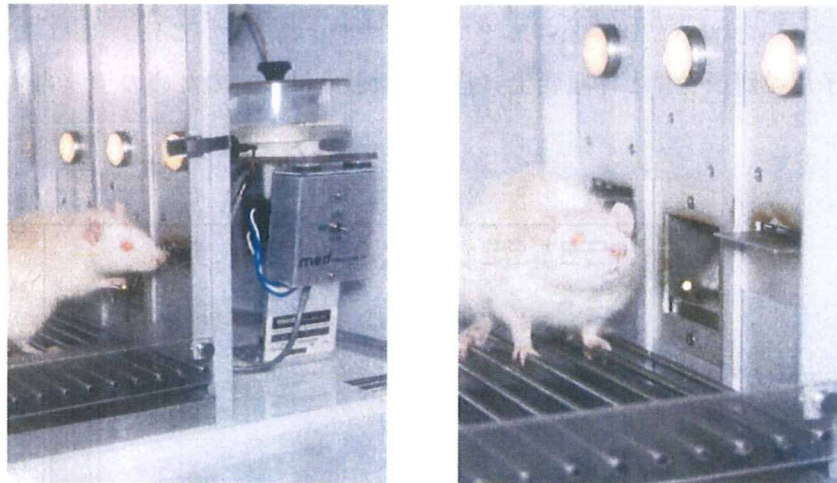


Fig.2 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) でのラットのSCOB (通常は閉じておく防音箱の扉を開きストロボを使用して撮影).

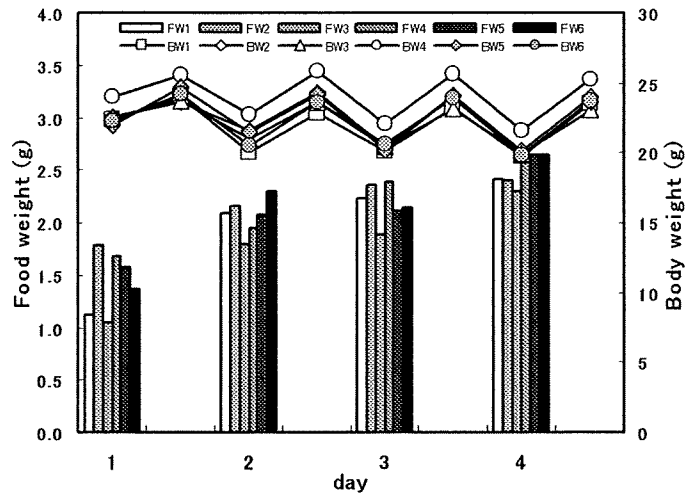


Fig. 3 給餌量と体重変化 (基本的実験条件決定のための予備的検討 1).

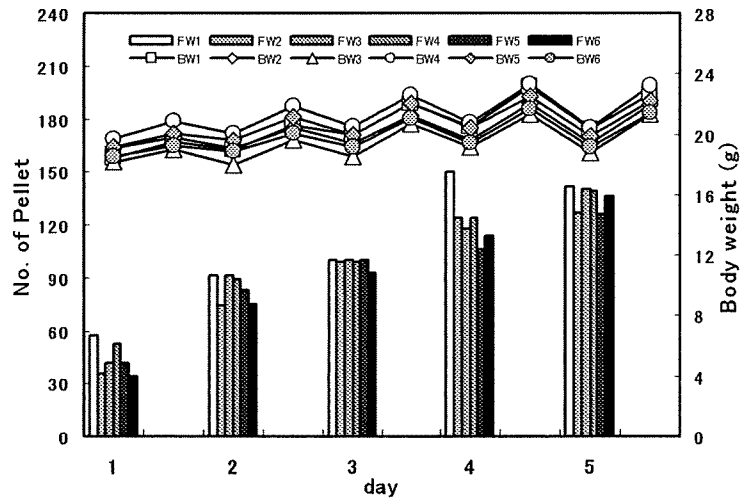


Fig. 4 強化子用粒餌摂食量と体重変化 (基本的実験条件決定のための予備的検討 2).

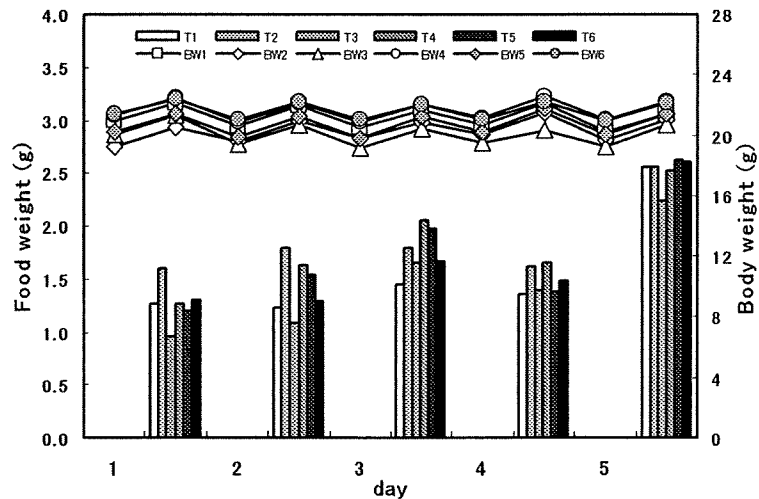


Fig. 5 強化子用粒餌摂食前後体重と給餌量 (基本的実験条件決定のための予備的検討 5 ; 飲料水同時呈示・自由摂取可条件).

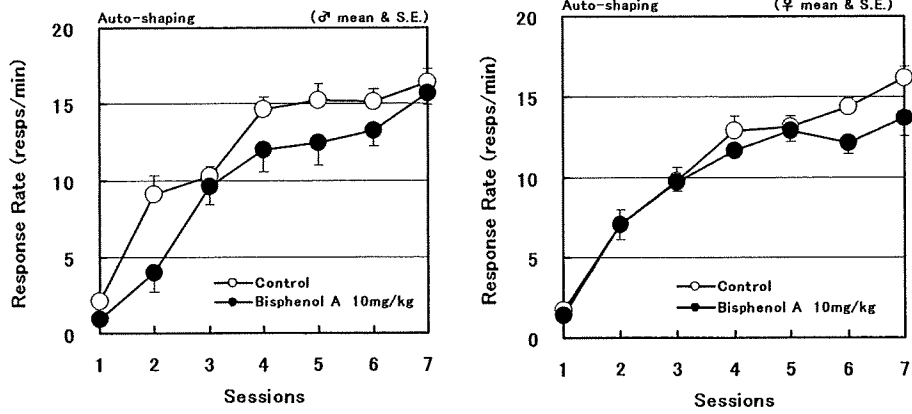


Fig. 6 ラットの自動反応形成スケジュールでの訓練セッションにおける反応率の変化とビスフェノールAの影響 (左：雄、右：雌).

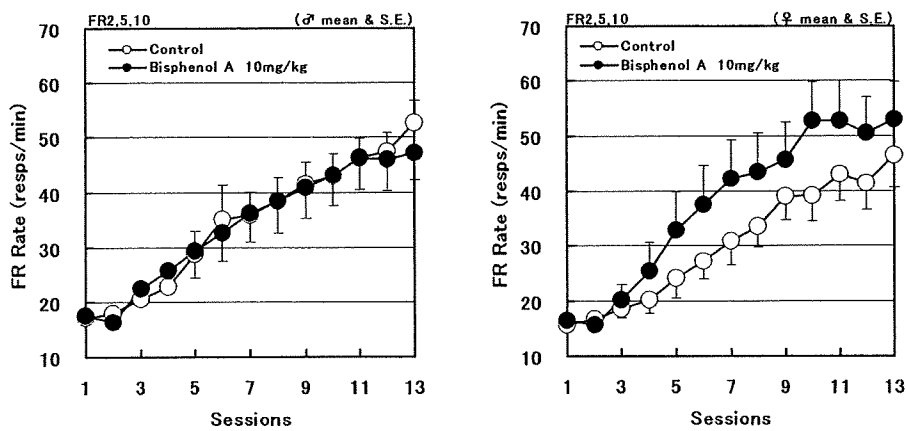


Fig. 7 ラットの FR スケジュールでの訓練セッションにおける反応率の変化とビスフェノールAの影響 (左：雄、右：雌、セッション1-2：FR2、セッション3：FR5、セッション4-13：FR10).

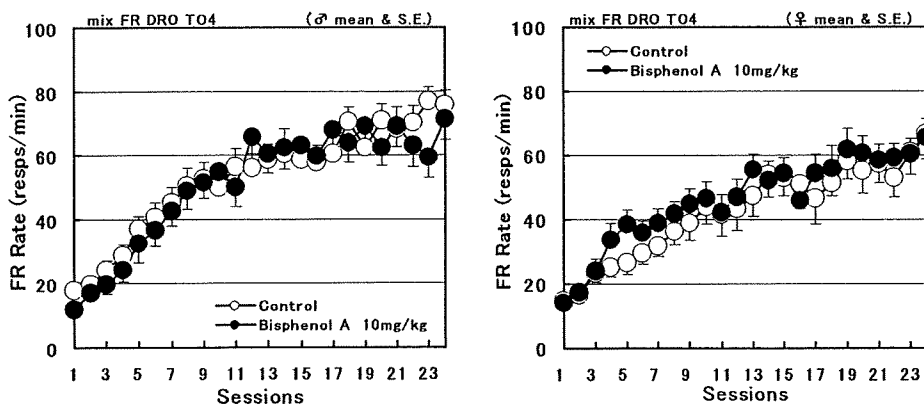


Fig. 8 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4s スケジュールでの訓練セッションにおけるFR反応率の変化とビスフェノールAの影響.

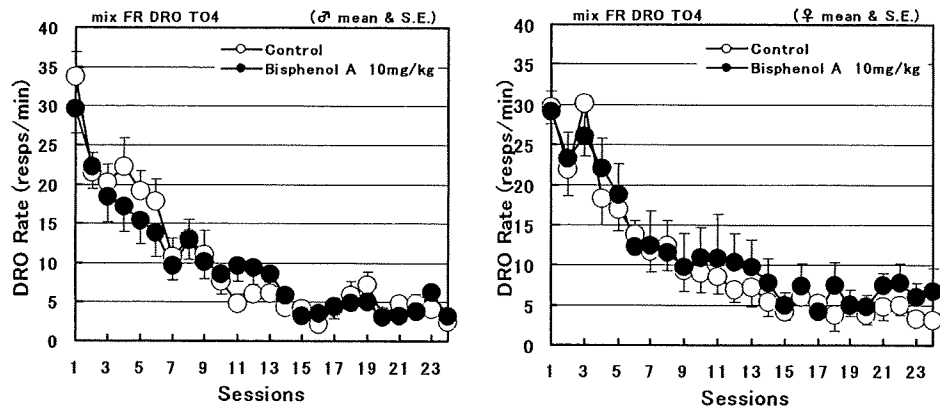


Fig. 9 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4s スケジュールでの訓練セッションにおける DRO 反応率の変化とビスフェノールAの影響.

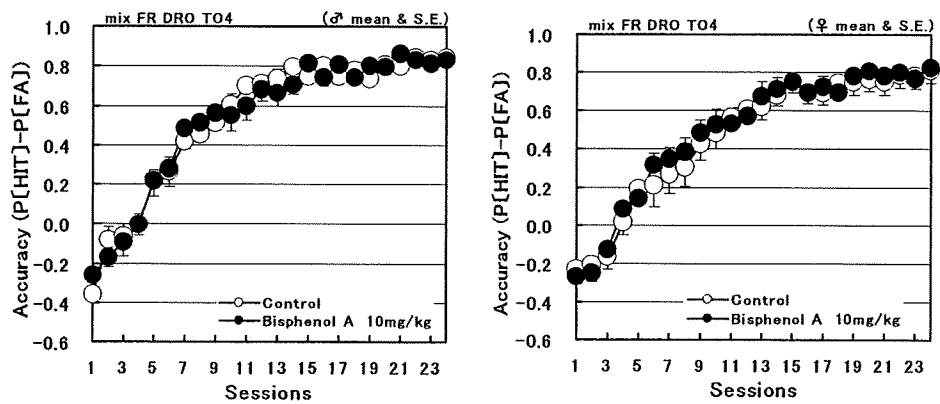


Fig. 10 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4s スケジュールでの訓練セッションにおける反応 Accuracy の変化とビスフェノールAの影響.

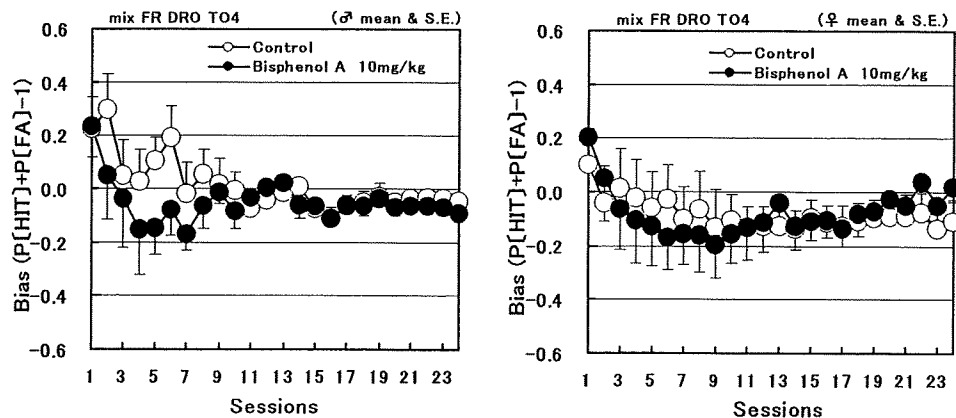


Fig. 11 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4s スケジュールでの訓練セッションにおける反応 Bias の変化とビスフェノールAの影響.

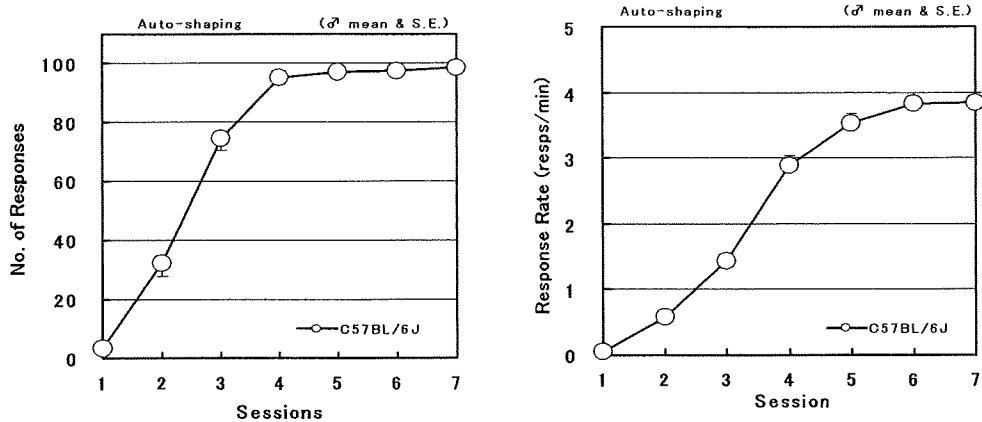


Fig. 12 マウスの自動反応形成スケジュール訓練セッションにおける反応数(左)および反応率(右)の変化(平均値と標準誤差).

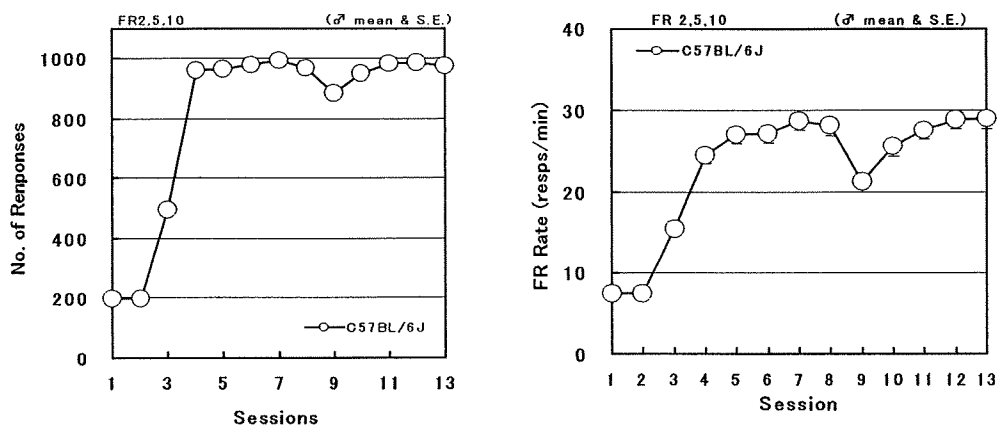


Fig. 13 マウスのFRスケジュール訓練セッションにおける反応数(左)および反応率(右)の変化(平均値と標準誤差、セッション1-2:FR2、セッション3:FR5、セッション4-13:FR10)。

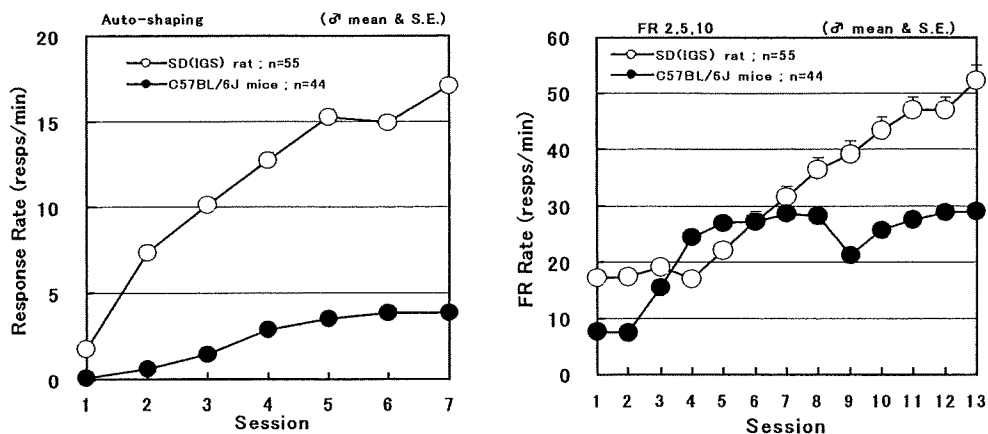


Fig. 14 自動反応形成訓練(左)およびFR訓練(右)期間におけるマウス(今回の結果)とラット(背景データ)の反応率の比較

Table 1 強化子用粒餌 100 個の摂食に要した時間 (基本的実験条件決定のための予備的検討 3; 飲料水なし条件)

animal No.	Unit : min				
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
1	25	26	20	26	44
2	37	35	36	33	35
3	46	28	26	29	30
4	27	25	25	23	22
5	42	39	40	37	39
6	37	31	30	28	33
mean	35.7	30.7	29.5	29.3	33.8
S.D	7.52	4.99	6.78	4.57	6.91

Table 2 強化子用粒餌 50 個の摂食に要した時間 (基本的実験条件決定のための予備的検討 4; 飲料水なし条件)

animal No.	Unit : min				
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
1	16	12	10	9	8
2	16	13	10	10	9
3	14	10	8	8	8
4	9	8	7	8	7
5	13	11	9	9	8
6	13	11	10	9	9
mean	13.5	10.8	9.0	8.8	8.2
S.D	2.36	1.57	1.15	0.69	0.69

Table 3 強化子用粒餌 50 個の摂食に要した時間 (基本的実験条件決定のための予備的検討 5; 飲料水同時呈示・自由摂取可条件)

animal No.	Unit : min				
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
1	9	9	8	7	8
2	12	9	8	7	9
3	9	7	8	8	8
4	6	7	7	6	7
5	10	8	8	8	8
6	10	9	9	8	9
mean	9.3	8.2	8.0	7.3	8.2
S.D	1.80	0.90	0.58	0.75	0.69

Table 4 強化子用粒餌授食中の飲水回数 (基本的実験条件決定のための予備的検討5; 飲料水同時呈示・自由摂取可条件)

animal No.	Unit : time				
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
mean	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
S.D	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00

Table 5 強化子用粒餌100個の授食に要した時間 (基本的実験条件決定のための予備的検討6; 飲料水同時呈示・自由摂取可条件)

animal No.	Unit : min				
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
1	20	18	18	17	20
2	22	29	29	26	32
3	17	17	17	17	21
4	16	15	16	15	16
5	24	24	25	30	31
6	19	17	19	19	21
mean	19.7	20.0	20.7	20.7	23.5
S.D	2.75	4.90	4.71	5.44	5.97

Table 6 強化子用粒餌授食中の飲水回数 (基本的実験条件決定のための予備的検討6; 飲料水同時呈示・自由摂取可条件)

animal No.	Unit : time				
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
1	1	1	0	0	1
2	8	12	15	12	15
3	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	1
5	8	6	2	4	12
6	0	0	2	0	0
mean	2.8	3.2	3.2	2.7	5.0
S.D	3.67	4.49	5.37	4.42	6.08

Table 7 体重実測値と維持目標体重との差に応じた最適ホームケージ給餌量（基本的実験条件決定のための予備的検討7；最終確認）

体重差	～ -2.50 g	-2.49 g ～ -1.50 g	-1.49 g ～ +0.49 g	+0.50 g ～
体重制限時	3.5 g	2.8 g	2.1 g	0.7 g
SCOB実験期間	2.1 g	1.4 g	0.7 g	0.7 g

注) 体重制限開始後から SCOB 測定開始前までは、「体重制限時」の欄に示された量の通常飼料に加えて、報酬用粒餌 35 個 (0.7 g) を与えることとした。また、SCOB 測定開始後は、「SCOB 実験期間」の欄に示された量の通常飼料を与えることとした。なお、実験を実施しない土曜日・日曜日には一律 2.8 g の通常飼料を与えた。

4. 内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

分担研究者 今井 清

(財)食品農医薬品安全性評価センター 技術総括部長

研究要旨 性ホルモン様物質を、胎児期あるいは新生児期に暴露すると、性分化に関わる神経核に作用し、性成熟に達した後に性機能に異常を来たすことが知られているが、その機序は十分に解明されていない。今回、新生児期における性機能に関与する神経発達の経過を明らかにする目的で、ドーパミン作動性神経の指標であるチロシンヒドロキシラーゼおよびエストロジェン受容体 α (ER α)を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果、チロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞の数は視床下部性的二型核において雌雄差はなく、ER α 陽性細胞はむしろ雌に多数観察されたことから、ラットにおいて、チロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞および ER α 陽性細胞数が、性的二型核の雌雄差の形成に関与している可能性は少ないと思われる。

A. 研究目的

成熟したラットのみならず多くの哺乳動物の視床下部には、雌に比較して雄の方が大きな容積をもつ神経核(性的二型核: SDN-POA)と、雌の方が大きな容積を持つ神経核(前腹側室周囲核: AVPvN-SDA)が存在することが明らかにされており、雌雄の生殖機能あるいは性行動の差は、これら神経核の雌雄差に依存していると考えられている。さらに最近になって、ラットではストレスや新規刺激に反応し記憶として定着させるのに関与していると考えられている中脳の青斑核は、雄より雌の方がより大きな容積を有しており、その生理機能が注目されている。一方、周産期にアンドロジェンあるいはエストロジェンに暴露された雌では SDN-POA の容積が増大し、周産期に去勢あるいはエストロジェン投与された SDN-POA の容積が減少するが、雌ラットでは胎生期あるいは新生児期のある一定時期(臨

界期)に生理的な範囲を超えた大量のエストロジェン様物質に暴露されると androgenization が起き、正常な性成熟を迎えるにもかかわらず、早期に生殖機能の障害が現れること(遅発効果: delayed effect)が知られている。また、SDN-POA は成熟ラットではアドレナリン作動性神経支配を受けており、新生児期の雌に α 受容体作動薬を投与すると血中の LH 濃度が増加し、これに伴って lordosis (脊柱前湾)反応が増加するが、 β 受容体作動薬を投与すると、LHの血中濃度が減少し lordosis 反応が低下する。しかし現在、周産期に急速に発達分化する視床下部における、ホルモン受容体との関連を含め神経線維網の発達・過程に関しては不明の点も多い。さらに、青斑核の見られる性差は、ビスフェノール A あるいは DES 投与によって逆転することも明らかにされているが、その生理学的な意義についても、現時点では十分に解

明されていない。

そこで、胎生期、新生児期のラットの脳を経時的に形態学的手法を用いて観察し、性差の認められることが明らかにされている神経核の発達・分化過程を詳細に検討し、数種の内分泌かく乱作用が疑われている物質を用いて脳の性分化への影響を調べることを目的に以下の実験を行った。

B. 研究方法

平成 16 年度は、生後、1、3、5、7、10 日目の Sprague - Dawley 系ラット (CrjCD:IGS) 新生児雌雄各 4 匹の脳の連続切片を作製し、ドーパミン神経の指標としてチロシンヒドロキシラーゼを免疫組織学的手法 (ABC 法) により染色して、視床下部の主要神経核における陽性細胞数を計測した。さらに、エストロジェンと SDN-POA との関係をはっきりさせるための第一段階として、中枢神経系におけるエストロジェン α 受容体 (ER α) の免疫組織学的手法による検出方法の検討を行った。

C. 研究結果

新生児の中枢神経系におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞は、成獣で最も多数のドーパミン作動性神経細胞が集中している黒質では、生後 1 日目においても多数観察されたが、生後 3 日以降急速にその数を増し、黒質の容積も急速に増大した。なお、黒質におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞の数に雌雄差は認められなかった。一方、視床下部においては、雄において生後 1 日目から、視床下部後核に相当すると思われる神経核にチロシンヒドロキシラーゼ陽性の神経細胞が多数観察さ

れ (写真 1)、同部のチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞は、生後 3 日目まで同程度観察されたが、生後 5 日目以降は減少した。一方、雌においても生後 1 日から視床下部後核にチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞が観察されたがその数は雄より明らかに少なかったが、5 日目以降雌雄間で差は見られなくなった (第 1 図)。

SDN-POA に相当する神経核すなわち内側視索前野では、生後 3 日以降明らかにチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞数が増加したが、その数には雌雄差は認められなかった (第 2 図)。

ER α 陽性細胞は、視床下部内側視索前野において、生後 1 日目から観察され、生後の日齢が増加するに従ってその数も増加する傾向にあったが、雄に比較するとむしろ雌において多数の ER α 陽性細胞が観察された (写真 2)。なお、雌雄ともに視床下部後核には ER α 陽性細胞はほとんど観察されなかった (写真 1)。

D. 考察

ドーパミン作動性神経の指標として、チロシンヒドロキシラーゼ免疫組織化学染色法をラット新生児にも適用したが、生後 1 日目から 10 日目までの新生児において、本来多数のドーパミン作動性神経細胞が存在する黒質において多数の陽性細胞が観察された。このことは、今回用いた免疫組織化学的染色法がドーパミン作動性神経細胞の指標として十分に使用可能であることを意味するものと考えられる。

新生児の視床下部では、SDN-POA に相当する部位 (内側視索前野) においても、生後 3 日目から明らかにチロシンヒドロキシ

ラーゼ陽性神経細胞数が増加したが、その数には雌雄差はなく、SDN-POA の容積の雌雄差を形成する要因としてドーパミン陽性神経細胞の数に関与している可能性は少ないと思われる。

一方、ER α 陽性細胞は雌雄ともに視床下部内側視索前野において、生後1日目から観察され、生後の日齢が増加するに従ってその数も増加する傾向にあったが、雌雄を比較すると雌のほうがむしろ多数のER α 陽性細胞が観察されることから、ER α 陽性細胞の数もSDN-PON の容積の雌雄差を形成する要因になっている可能性は低いと考えられる。なお、特に雄では生後1日から3日目にかけて視床下部後核に相当する部位に一時的に多数のチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞が観察されたが、この部位ではER α 陽性細胞はほとんど観察されず、性ホルモンとの関係を含めその生理学的意義については現時点では不明である。

E. 結論

新生児期における性機能に関与する神経発達の経過を明らかにする目的で、生後1日目から10日目のSprague-Dawley系ラット(Crj CD:IGS) 新生児雌雄各4匹の脳の連続切片を作製し、ER α およびドーパミン作動性神経の指標であるチロシンヒドロキシラーゼを免疫組織学的手法を用いて染色し、視床下部の主要神経核における陽性細胞を計測した。その結果、視床下部性的二型核の雌雄差を形成する要因に、ER α 陽性細胞、ドーパミン作動神経細胞の数に関与する可能性は少ないと思われる。

G. 研究発表

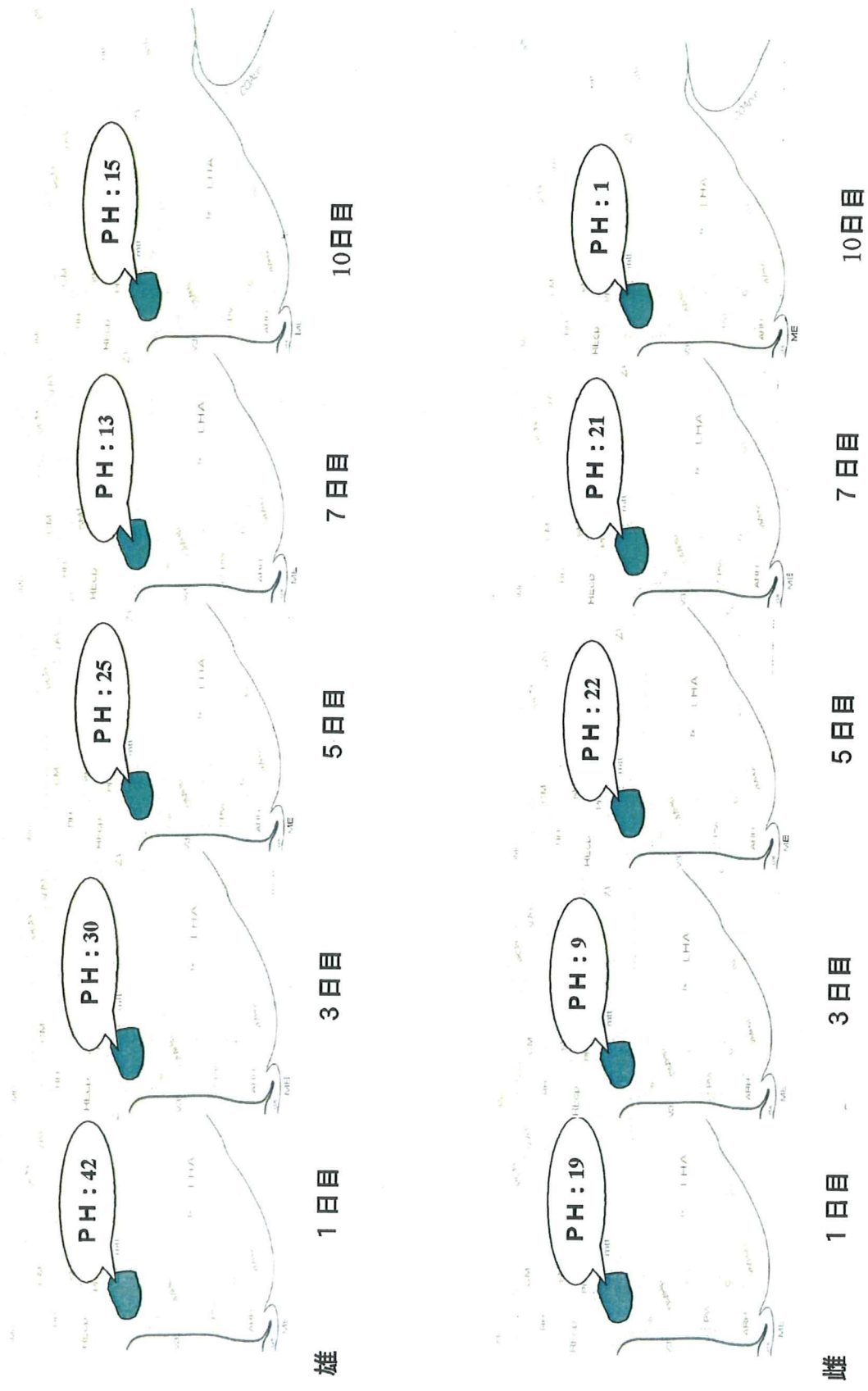
1. 論文発表

A. Maekawa, M. Yoshida, S. Katsuda and K. Imai

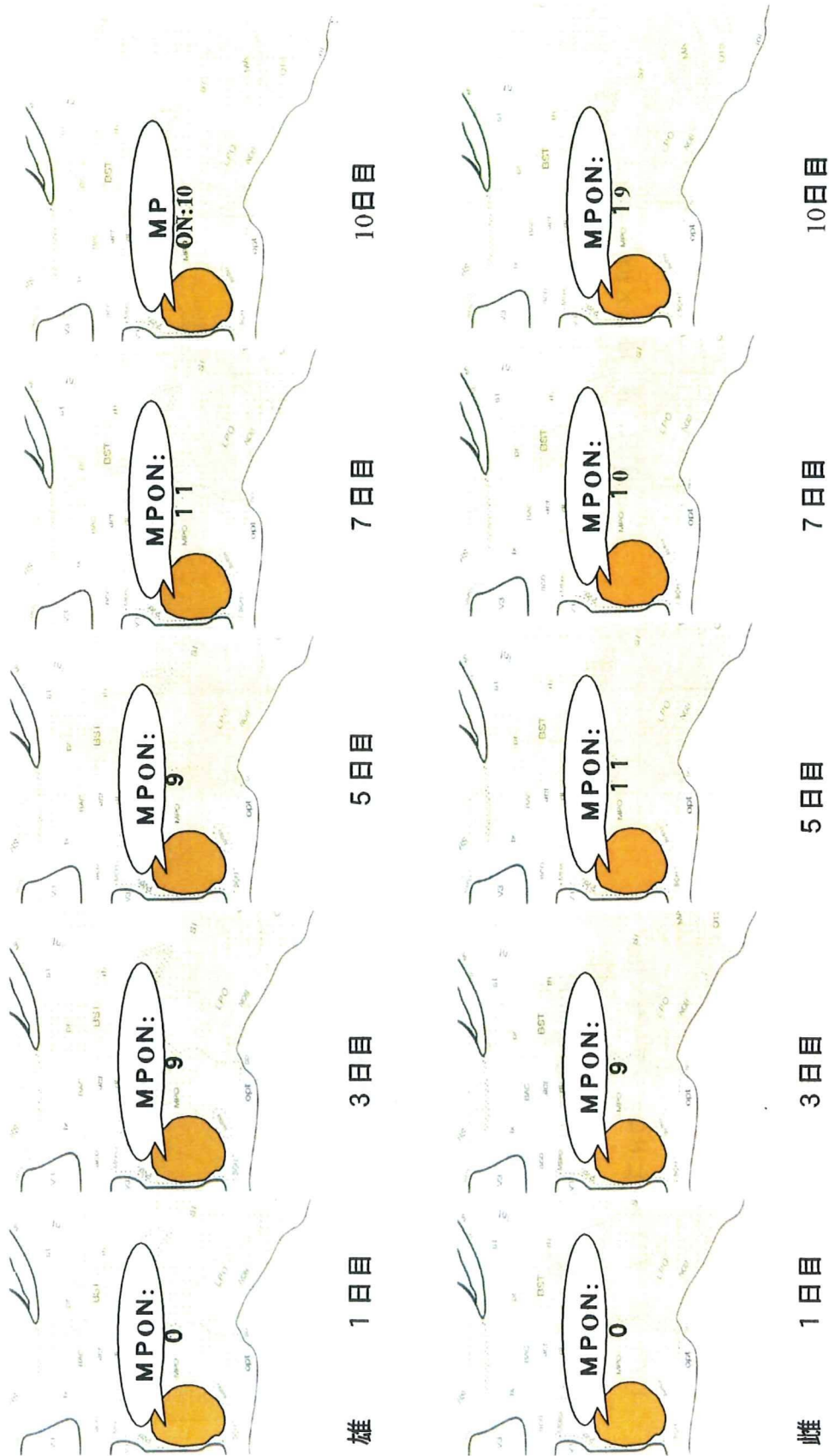
"Toxicologic/Carcinogenic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on the Female Genital Organs of Rodents" J. Toxicol. Pathol. 17, 69-84, 2004

H. 知的財産賞有権の出願・登録状況

なし



第1図 視床下部後核における Tyrosine Hydroxylase 陽性細胞数



第2図 内側視索前野における Tyrosine Hydroxylase 陽性細胞数

写真 1 視床下部後核

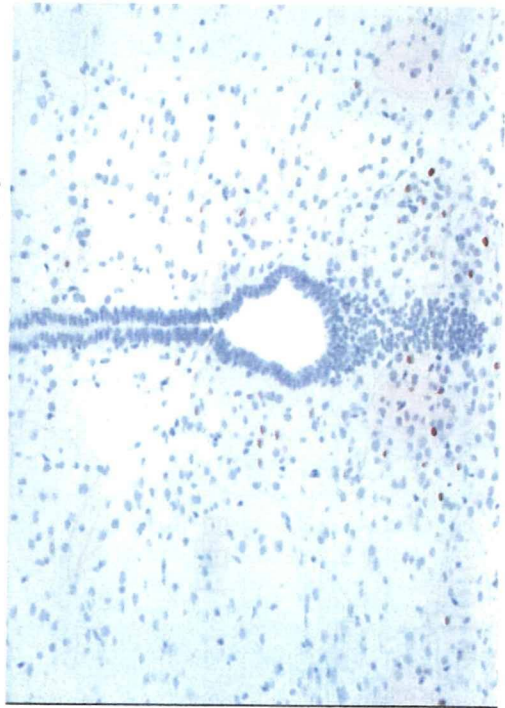


1日目, 雄 チロシンヒドロキシラーゼ×100

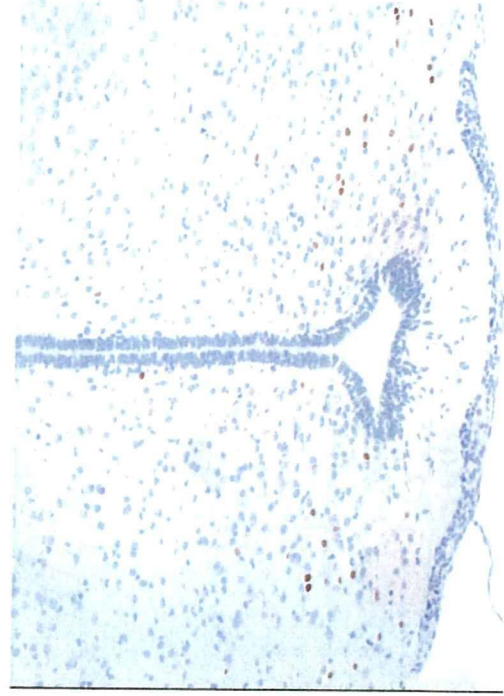


10日目, 雄 ER α ×100

写真 2 視床下部内側視索前野



10日目, 雄 ER α ×200



10日目, 雌 ER α ×200

2) 免疫

5. 内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 林 良夫 徳島大学大学院 教授

研究要旨 シェーグレン症候群は涙腺・唾液腺を中心とする外分泌腺を標的臓器として発症し、ドライアイ・ドライマウスなどの乾燥症状を特徴とする難治性自己免疫疾患である。当研究室ではシェーグレン症候群疾患モデルを開発し、その病因・病態解析を実施してきた。NFS/sldマウスは生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより自己免疫病態を呈することから、内分泌かく乱物質投与によって3d-Txを施すことなく免疫異常の誘導が可能か否かについて検討を加えた。新生児期にビスフェノールAを含む内分泌かく乱化学物質を投与した結果、投与後2週目に胸腺萎縮、T細胞分画、B細胞分画の異常が認められた。

A. 研究目的

シェーグレン症候群は涙腺・唾液腺を中心とする外分泌器官を標的臓器として発症し、ドライアイ・ドライマウスなどの乾燥症状を臨床的特徴とする原因不明の難治性自己免疫疾患であるが、極めて高率に女性優位に発症することから性ホルモンとの関連が指摘されている。当研究室ではNFS/sldミュータントマウスを用いてシェーグレン症候群疾患モデルを開発し、その病因・病態解析を実施してきた。NFS/sldマウスは生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより4週目以降、涙腺・唾液腺に限局する自己免疫病変を必発し涙液・唾液分泌障害を伴うヒト・シェーグレン症候群に極めて類似した病態を呈することから、薬剤などの治療効果の判定に有用な疾患モデルマウスである。従来から、内分泌かく乱化学物質が免疫機能に及ぼす影響が指摘されているが実験動物を用いたin vivoにおける

詳細については不明である。そこで、本研究は新生児期NFS/sldミュータントマウスに内分泌かく乱物質を投与することによって3d-Txを施すことなく免疫異常の誘導による自己免疫病態の発症が可能か否かについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) マウスおよび投与方法

新生児期雌NFS/sldマウスを使用。NFS/sldマウスは舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントマウスとして樹立され、当施設にてSPF (specific pathogen-free) 下で繁殖飼育されている。雌NFS/sldマウスは生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより4週目以降、涙腺・唾液腺に限局する自己免疫病変を発症しヒト・シェーグレン症候群類似の病態を呈する。新生児期NFS/sldマウスに対し、生後0日、1日、2日

にビスフェノールA (20 μ g/head) (以下BPAと略)、 β -エストラジオール (20 μ g/head) (E2と略)、及びデキサメサゾン (20 μ g/head) (Dexと略)を腹腔内投与後 (但し、Dex投与は0日のみ)、2週後、4週後、8週後の変化を対照群と比較した。各々につき体重測定を実施し、主要臓器の湿重量測定を行った。

2) 病理組織学的検索

全身諸臓器は臓器重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、軟パラフィン包埋後4 μ の組織切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。唾液腺および涙腺における炎症性病変の組織学的評価はWhiteらの分類に準じた。

3) フローサイトメトリー解析

各群における全てのマウスから胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体 (Thy1.2, CD4, CD8, B220, CD44, CD45RB, Mel-14; Pharmingen) と反応させた後に、細胞自動解析装置 (EPICS, Coulter) にて解析した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として本学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

C. 研究結果

NFS/s1dマウスの新生児期 (生後0日、1日、2日) にBPA (20 μ g/head)、E2 (20 μ g/head)、及びDex (20 μ g/head)を腹腔内投与した後 (Dexは0日のみ)、2週、4週、および8週後の変化を検討し、それぞれ対照群 (セサミオイル投与) と比較した。

1) 体重および臓器湿重量に対する影響

内分泌かく乱化学物質の新生児期投与による体重および臓器湿重量に対する影響について検討を加えた。体重 (mg) の変動については、BPAおよびE2投与により2週目で対照と比較してBPA:85.6%, E2:87.8%と約15%の減少を示していたが、4週目・8週目では回復がみられた。Dexの影響は2週、4週目とも65.6%と約35%の著明な体重減少がみられたが、8週目では回復していた。

臓器湿重量については、胸腺への影響がDexで最も大きく認められ、2週目、4週目で対照群と比較して56.3%、76.6%と減少し、8週目では回復がみられた。BPA投与群、E2投与群における胸腺重量は2週目にBPA:85.9%、E2:73.4%と約15%~25%の萎縮が認められたが、4週目以降は回復していた。脾臓重量への影響はいずれの実験群でも特に認められなかった。その他の臓器では、子宮重量がBPA投与群で4週目に減少傾向 (76.4%) が現れていたが、8週目 (92.4%) にはほぼ回復していた。Dex投与群の子宮重量は4週目に25%と著明な影響がみられたが8週目では回復がみられた。

2) 病理組織学的変化

全身諸臓器の病理組織学的検索の結果、BPA (20 μ g/head)、E2 (20 μ g/head)、及びDex (20 μ g/head)を投与した実験群において4週齢、8週齢において軽度ながら唾液腺 (顎下腺)、および涙腺における炎症性病変 (Whiteらの分類のgrade 1またはgrade 2)の出現が認められた。唾液腺炎、涙腺炎とも炎症性病変は導管周囲の巣状単核細胞浸潤として観察された。また、Dex投与群では、8週齢にごく軽微であるが肺内細気管支周囲炎、間質性腎炎の所見がみられた。

3) 免疫担当細胞への影響

内分泌かく乱化学物質の新生児期投与による胸腺、脾臓の総細胞数の変動に関しては著変はなかった。新生児期Dex投与群は4週、8週ともに

胸腺細胞数の減少がもたらされ（4週：75.9%、8週：66.6%）、脾細胞数は4週のみで64.4%と減少がみられた。

内分泌かく乱化学物質の新生児期投与による免疫担当細胞への影響について明らかにするため、胸腺および脾細胞を分散し、フローサイトメトリーによる解析を実施した。脾臓Thy1陽性T細胞に対するBPAの影響は2週目に35.3%と顕著な減少がみられたが、その後は回復していた。Dexの脾臓T細胞に対する影響は2週目に34.7%と顕著であった。脾臓B220陽性B細胞に対するBPAおよびDexの影響が投与2週後にB220陽性B細胞集団がhighとlowの2相性を示すフラクションの出現として観察されたが、この変化は4週後には消失していた。また、投与4週後には脾臓B220陽性B細胞が88.3%とやや減少傾向がみられた。Dexの脾臓B220陽性B細胞に対する影響は2週群

（68.6%）、4週群（58.1%）と顕著にみられたが、8週群では回復していた。

胸腺内T細胞のCD4およびCD8分画の変動について検討した結果、いずれの実験群でも特に顕著な変化がみられなかった。新生児期Dex投与後2週目のCD4陽性T細胞は71.3%とやや減少がみられた。末梢脾臓T細胞のCD4およびCD8分画の変動について検討した結果、新生児期BPA投与後2週目のCD4陽性、およびCD8陽性T細胞に著明な減少が認められた（CD4陽性T細胞:32.4%；CD8陽性T細胞:35.7%）。Dex投与群でも同じく2週後のCD4陽性、およびCD8陽性T細胞に著明な減少が認められている（CD4陽性T細胞:35.7%；CD8陽性T細胞:38.1%）。これらの減少傾向は4週目以降回復がみられ、新生児期投与による影響は2週目までの初期段階に末梢T細胞分画の障害として出現する可能性が示唆される。

また、末梢CD4陽性T細胞の活性化機構におけるBPA、E2、Dexの影響についてT細胞活性化マ-

ーカー（CD44、CD45RB、Me1-14）の動態解析を実施した。その結果、いずれの実験群とも2週目、4週目、8週目の脾細胞におけるT細胞活性化分子に著明な変動は認められなかった

D. 考察

内分泌かく乱化学物質が免疫機能に及ぼす影響がin vitroの解析に基づいて指摘されているが実験動物を用いた詳細な検討は為されていない。原因不明の自己免疫疾患シェーグレン症候群の疾患モデルNFS/sldマウスは生後3日目の胸腺摘出（3d-Tx）によって4週齢、8週齢と自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎が必発する。さらに加齢の進行とともに自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎の病態増強が認められること、および12ヶ月以降の老齢マウスに関節リウマチ様病変が発症することを明らかにしている。また、本疾患モデルを用いて卵巣摘出の影響を検討した結果、エストロゲン欠乏状態が免疫担当細胞の機能障害を誘導すると同時に、標的細胞のFas依存性アポトーシスを亢進している事実を明らかにした。今回、新生児期NFS/sldマウスに対し、胸腺摘出を施すことなく、生後0日、1日、2日にBPA、E2、及びDexを投与した後（Dexは0日のみ）、2週後、4週後、8週後の変化を観察した。

内分泌かく乱化学物質の新生児期投与による体重（mg）の変動に関しては、BPAおよびE2投与により対照群と比較して2週目でBPA:85.6%、E2:87.8%と約15%の体重減少がみられた。Dex投与の影響は2週、4週目とも65.6%と約35%の著明な体重減少がみられたが、8週目では回復していた。臓器湿重量については、胸腺への影響がDexで最も大きく2週、4週で56.3%、76.6%と減少していた。BPA投与群、E2投与群における胸腺重量は2週目に約15%—25%の萎縮が認められた。内分泌かく乱化学物質の新生児期投与によって生後2

週目に胸腺萎縮がもたらされることは生直後に開始される胸腺内T細胞分化へ機能的な障害を与えている可能性が考えられる。その他の臓器として、BPA投与によって子宮重量の減少が4週目でみられたが(76.4%)、8週目でほぼ回復していた(92.4%)。Dex投与群の子宮重量は4週目に25%と顕著な影響がみられたが8週では回復がみられた。BPAおよびDex投与後4週目に認められる子宮重量の減少については機能的な解析を含めた検討が必要である。

免疫担当細胞への影響について胸腺および脾細胞を用いてフローサイトメトリーによる解析を実施した。脾臓T細胞に対するBPA およびDexの影響は投与後2週目に35.3%、34.7%と顕著に認められたが、その後は回復していた。さらに、末梢脾臓T細胞のCD4およびCD8分画の変動について検討した結果、BPA投与後2週目にCD4陽性T細胞:32.4%;、CD8陽性T細胞:35.7%と著明な減少が認められた。Dex投与群でも同じく2週後のCD4陽性、およびCD8陽性T細胞に著明な減少が認められている。これらの減少傾向は4週目以降回復がみられ、新生児期投与による影響は2週目までの初期段階に末梢T細胞分画の障害として出現する可能性が示唆される。また、脾臓B220陽性B細胞に対するBPAおよびDexの影響が投与2週後に認められ、B220陽性B細胞がhigh分画とlow分画の2相性を示していた。新生児期BPA投与後およびDex投与後2週目にみられるこれらのT細胞分画、B細胞分画への影響は免疫機能障害と関連している可能性が示唆され、今後の詳細な検討が不可欠である。全身諸臓器の病理組織学的検索の結果、BPA、E2、及びDexを投与したいずれの実験群においても4週齢、8週齢において軽度ながら唾液腺(顎下腺)、および涙腺における炎症性病変(Whiteらの分類のgrade 1またはgrade 2)の出現が認められた。生後3日目の胸腺

摘出によって成立する自己免疫病変に比較するとごく軽度の変化であるが、これらの炎症性病変が自己免疫に起因するの否か実験群のn数を増加して詳細に解析することや、長期間にわたる影響を観察することが必要と考えられる。

現在までに内分泌かく乱化学物質の免疫機能に及ぼすin vitroにおける影響が検討されている。ヒト末梢リンパ球への影響についてはリンパ球を刺激するマイトージェン(コンカナバリンA)に内分泌かく乱化学物質を加え、リンパ球増殖反応が検討されている。その結果によるとノニルフェノール、BPA、フタル酸エステルなどの内分泌かく乱化学物質が末梢リンパ球の増殖反応を抑制すると報告されている。また、マクロファージの分化能への影響についてBPAがマクロファージ前駆細胞からの分化誘導能を促進する作用のあることが報告されている。ヒトを含めた哺乳類の免疫系は胎児期も含め、生後まもない時期に完成することが知られている。この時期に胸腺内T細胞分化を中心とする自己と非自己の識別機構に何らかの障害が生じることによって免疫異常を基盤とした自己免疫疾患の発症に至ることが推定される。

新生児期に内分泌かく乱化学物質を投与した初年度の検討結果から、投与後2週目に主としてみられた胸腺萎縮、T細胞分画、B細胞分画の異常、および軽度ながら出現した唾液腺・涙腺における炎症性病変は出生直後に内分泌かく乱化学物質が体内に取り込まれることによって免疫機能障害が誘導されたことに起因する可能性が示唆された。エストロゲンと類似した作用を示す内分泌かく乱化学物質が、エストロゲンレセプターを介して遺伝子を活性化し、生体反応を起こすことが知られていることから、次年度以降はT細胞、B細胞の機能解析に加え、エストロゲンレセプターの動態解析を含めた動

物実験を実施する予定である。

E. 結論

生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより成立するシェーグレン症候群疾患モデル NFS/sldマウスを用いて新生児期にビスフェノールAを含む内分泌かく乱化学物質を投与した結果、投与後2週目に胸腺萎縮、T細胞分画、B細胞分画の異常が認められ、4週後および5週後に軽度ながら唾液腺・涙腺における炎症性病変の出現がみられた。

G. 研究発表 (過去3年間)

1. 論文発表

- 1) Entesarian M, Matsson H, Klar J, Bergendal B, Olson L, Arakaki R, Hayashi Y, Ohuchi H, Falhat B, Bolstad AI, Jonsson R, Wahren-Herlenius M, Dahl N, Mutations in the fibroblast growth factor 10 gene are associated with aplasia of lacrimal- and salivary glands (ALSG). *Nature Genetics*, in press, 2005.
- 2) Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouriy, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M, Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol.* in press, 2005.
- 3) Kobayashi M, Yasui N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Development of autoimmune arthritis with aging via bystander T cell activation in the mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 50:3974-3984, 2004.
- 4) Ishimaru N, Arakaki R, Katunuma N, Hayashi Y, Critical role of cathepsin-inhibitors for autoantigen processing and autoimmunity. *Adv. Enzyme. Regul.* 44:309-320, 2004.
- 5) Hayashi Y, Ishimaru N, Arakaki R, Tsukumo S, Kishihara K, Shiota H, Yasutomo K, Hayashi Y, Effective treatment of a mouse model of Sjogren's syndrome with eyedrop administration of anti-CD4 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum.* 50:2903-2910, 2004.
- 6) Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y, Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinol.* 145:2384-2391, 2004.
- 7) Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N, Apoptosis and estrogen deficiency in primary Sjogren's syndrome. *Cur. Opin. Rheumatol.* 16:522-526, 2004.
- 8) Maruyama T, Saito I, Hayashi Y, Kompfner E, Fox RI, Burton DR, Ditzel HI, Molecular analysis of the human autoantibody response to α -fodrin in Sjogren's syndrome reveals novel apoptosis-induced specificity. *Am. J. Pathol.* 165:53-61, 2004.
- 9) Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hayashi Y, Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background. *Am. J. Pathol.*