

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

高感受性集団に於ける化学物質の有害性発現メカニズム
の解明及び評価手法開発にかかる総合研究

(H19-化学-一般-003)

平成19年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 小野 宏

財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

平成 20(2008) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

高感受性集団に於ける化学物質の有害性発現メカニズムの解明
及び評価手法開発にかかる総合研究
(H19-化学-一般-003)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野 宏

平成 20 (2008) 年 3 月

I. 総括研究報告

- 高感受性集団に於ける化学物質の有害性発現メカニズムの解明及び評価手法開発
にかかると総合研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
小野 宏

II. 分担研究報告

1. 総括補佐、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究・・・・・・・・・・・・・・ 23
菅野 純

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】**1) 神経・行動**

2. 胎児期及び授乳期の Bisphenol-A 暴露による中枢神経系の発達に及ぼす影響・・・・・・・・ 67
鈴木 勉
3. 発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化
に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71
宮川 宗之
4. 新生児脳の性分化への化学物質高感受性影響に関する研究・・・・・・・・・・・・・・ 95
今井 清

2) 免疫

5. 周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明・・・・・・・・・・・・・・ 103
林 良夫
6. 化学物質の周産期暴露及び in vitro 暴露の初期免疫応答に対する影響評価・・・・・・・・ 117
武吉 正博

3) 生殖器

7. 胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生生物学的解析研究・・・・・・・・・・・・ 131
長尾 哲二
8. 周産期・小児期の化学物質暴露による生殖器系の発達および老化に及ぼす影響の
研究・・ 139
太田 亮
9. 化学物質の齧歯類周産期暴露による雌性生殖器等の遅発性障害の研究・・・・・・・・ 147
松島 裕子

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

10. ES 細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及び AhR を介する
晩発影響の解析研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 151
高木 篤也

11.	新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究・	155
	藤本 成明	
12.	神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する化学物質脳神経系 影響の分子毒性学的解析・	161
	五十嵐 勝秀	
13.	AhR の生理機能と炎症応答・小児期個体における役割・	165
	藤井 義明	
14.	CYP 遺伝子発現を制御する SXR、CAR、AhR 等の薬物受容体と免疫系制御因子 NF κ B の相互作用の分子解明・	171
	西川 淳一	
	【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】	
15.	形態形成期への影響を中心とした研究動向に関する OECD/WHO 関連等ハーモ ナイゼーション総括・	179
	井上 達	
16.	POPs を中心とした有害性評価手法における高感受性集団対応に関する国際動向 調査研究・	183
	広瀬 明彦	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表・	191
IV.	研究成果の刊行物・別刷・	203

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

I. 総括研究報告書

高感受性集団に於ける化学物質の有害性発現メカニズムの解明及び
評価手法開発にかかる総合研究

研究代表者 小野 宏 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 研究顧問

研究要旨

平成 16 年度からの 3 年間に先行して実施された厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）「内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究（H16-化学-一般-001）」、及び、同「内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究（H16-化学-一般-003）」に於いて、受容体原性毒性のメカニズムに基づくと理解される低用量影響が神経-内分泌-免疫系にまたがり、特に Bisphenol A による遅発影響は再現性をもって示され、それを含めた作用の検出の為に「確定試験」として一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於いて懸念される毒性指標を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発とその支援基礎研究としての分子毒性メカニズム研究、催奇形性メカニズム研究についての所定の成果が得られ、その結果、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」の策定と実施、ダイオキシン行政への貢献等の行政対応への貢献が可能となった。

一方で、日常生活に於いて使用される数万種類に及ぶ化学物質の、子供（小児）を含む高感受性集団に対する有害性評価体制は、従来から指摘されるとおり、催奇形性の評価を別にすれば、対老人を含めて、成人を対象に組織されたそれに比べ十分ではない。本研究は、この指摘に応える為に、上述の先行研究成果を最大限に取り入れつつ、小児を含む化学物質暴露に対して脆弱な集団にその視野を拡大し、その生体の恒常性維持メカニズムの揺らぎ等に着眼し、(1)これら高感受性集団についても検出可能な新評価手法の開発研究、それを支援するための(2)高感受性集団に特有な有害性発現メカニズムの解明に関する最先端分子生命科学研究、及び、これらを基に個別の毒性のみならず、生体に発現する有害性を体系的、総合的に評価するための、(3)高感受性有害性総合評価大綱の策定、を目的とする。

その為に、本研究は、先行研究班の構成の一部を継承しつつ、【総括、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究】を取り纏め部門として、以下、目的に沿って、【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】、【有害性発現分子メカニズムの解明研究】、【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】の3部門を置き、研究を推進する。最終的には、各研究課題の展開を促進し、最終年度の 21 年度に向けての高感受性有害性総合評価大綱の策定への成果の集約を図る。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

鈴木 勉・星薬科大学 薬学部薬品毒性学教室、教授

菅野 純・国立医薬品食品衛生研究所安全生性生物試験研究センター毒性部、部長

宮川 宗之・独立行政法人 労働安全衛生総合研究所 産業医学総合研究所 健康障

害予防研究グループ、上席研究員

今井 清・財団法人 食品農医薬品安全性
評価センター 技術総括部、技術顧問

林 良夫・徳島大学大学院 ヘルスバイオ
サイエンス研究部 口腔分子病態学分野、
教授

武吉 正博・財団法人 化学物質評価研究
機構 安全性評価技術研究所 研究第一部
研究第二課、課長

長尾 哲二・近畿大学 理工学部 生命科
学科 発生生物学研究室、教授

太田 亮・財団法人 食品薬品安全セン
ター 秦野研究所 遺伝毒性部 遺伝学研究
室、室長

松島 裕子・国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 毒性部、主
任研究官

高木 篤也・国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 毒性部、室
長

藤本 成明・広島大学 原爆放射線医科学
研究所、准教授

五十嵐 勝秀・国立医薬品食品衛生研究
所 安全性生物試験研究センター 毒性
部、主任研究官

藤井 義明・筑波大学 先端学際領域研究
センター、客員教授

西川 淳一・武庫川女子大学 薬学部 衛
生化学研究室、教授

井上 達・国立医薬品食品衛生研究所 安
全性生物試験研究センター、センター長

広瀬 明彦・国立医薬品食品衛生研究所
総合評価研究室、室長

A. 研究目的

本研究は、小児を含む化学物質暴露に
対して脆弱な集団にその視野を拡大し、
その生体の恒常性維持メカニズムの揺ら
ぎ等に着目し、(1)これら高感受性集団に
ついても検出可能な新評価手法の開発研
究、それを支援するための(2)高感受性集
団に特有な有害性発現メカニズムの解明
に関する最先端分子生命科学研究、及び、
これらを基に個別の毒性のみならず、生
体に発現する有害性を体系的、総合的に
評価するための、(3)高感受性有害性総合
評価大綱の策定、を目的とする。

B. 研究方法

本研究は、(1)生体の恒常性維持メカニ
ズムの揺らぎ等に着目したこれら高感受
性集団についても検出可能な新評価手法
の開発研究、(2)それを支援するための高
感受性集団に特有な有害性発現メカニ
ズムの解明に関する最先端分子生命科学
研究、及び、(3)これらを基に個別の毒性の
みならず、生体に発現する有害性を体系
的、総合的に評価するための、高感受性
有害性総合評価スキームの策定を目的と
し、【総括、総合評価スキーム開発研究
及び低用量影響研究】を取り纏め部門と
して、【恒常性維持メカニズムの揺らぎ
に着目した新評価手法開発研究】、【有
害性発現分子メカニズムの解明研究】、
及び【小児など高感受性集団の評価に関
する国際動向調査研究】の3部門から構
成する研究体制を敷く。

また、本年度は、解明研究の中で OECD
対応委託研究を実施する。

各班員の研究方法を下記に記載する。

【総括】部門

総合スキーム策定のとりまとめ、低用量
遅発影響の機序の解明

小野 宏

内分泌かく乱化学物質問題に対応する
ための厚労省試験スキームの方針・年次
計画に沿った研究体制の維持・統率を行
った。2007年12月5～6日パリに於いて
開催された ECD/EDTA/VMG-mammalian 7
(哺乳類試験検証運営委員会第7回会

議)に厚労省代表として本研究班等の業績を携え参加し、今後の国際的試験法制定及びバリ デーションに関する方向性の設定に大きな貢献を果たし、また、そこでの合意内容を本邦に持ち帰り、研究施策へ反映させた。

齧歯類一生涯試験取り纏め事項

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】

1) 神経・行動

- 胎児期及び授乳期の BPA 暴露による中枢神経系の発達に及ぼす影響
- 発達神経毒性評価のため次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究
- 新生児脳の性分化への化学物質高感受性影響に関する研究

2) 免疫

- 周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明
- 周産期による免疫系への影響評価

3) 生殖器

- 胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生生物学的解析研究
- 周産期・小児期の化学物質暴露による生殖器系の発達および老化に及ぼす影響の研究
- 化学物質の齧歯類周産期暴露による雌性生殖器等に遅発性障害の研究

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

- ES 細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及び AhR を介する晩発影響の解析研究
- 新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究
- 神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する化学物質脳神経系影響の分子毒性学的解析
- AhR の生理機能とその周産期小児期個体における役割
- 齧歯類前立腺を用いた化学物質の新生児暴露の作用

【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】

- 子ども健康問題を中心とした OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括

- POPS を中心とした有害性評価手法における高感受性集団対応に関する国際動向調査研究

総括補佐、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究

菅野 純

EDCs による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、低用量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、EDCs の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。

ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い方法体系を開発することに重点を置き、内分泌かく乱性確定試験開発詳細試験(確定試験)としての「齧歯類一生涯試験法」を提案した。

「試験スキーム」のスクリーニングに於いて形成された化学物質優先順位リストの上位化合物について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきたため、本申請班の前身となる研究班において種々の調査研究を実施してきた。その結果、ここでは既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の発生、発達、成熟、及び老化に亘る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指す。これは、OECD の Conceptual Framework Level 5 に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究及び支援基盤研究の 2 要素から成る。

本分担研究者は、(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏めを行うと共に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、既に実施し、低用量影響データを得ている BPA に引き続き、(2) DES を雌性動物の新生児期に低用量暴露した際の性ホルモン系に対する低用量影響に関する動物実験を実施する(委託研究:委託先:バイオラボ株式会社)。

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項(同上)

(2) ラットを用いた BPA 及び Deihylstilbestrol の子宮内・経乳汁暴露による晩発影響についての検討試験 (委託研究)

平成 16 年度の研究において、Bisphenol A(BPA)の 5、50 μ g/kg/day 及び 40、400 mg/kg/day をラット 妊娠6日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し、低用量及び大量投与時の出生児に於ける遅発性性周期異常の誘導について検討した結果、7 ヶ月齢時に於ける性周期検査で異常周期を示す動物が BPA 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、11/19、8/19、11/24、11/17 匹で観察され、大量投与時のみならず、低濃度 BPA の妊娠期・授乳期投与によっても pre-middle age に於ける性周期異常が誘導される可能性が示された。

平成 17 年度は、更に、試験の再現性の有無を検討することを目的とし、0.5、5、50 μ g/kg/day の用量で BPA をラットの妊娠期から授乳期にかけて投与し、得られた雌出生児の性周期を最長 12 ヶ月齢まで継続して検査した(委託研究:委託先:(財)化学物質評価研究機構)。その結果、低濃度 BPA の妊娠期・授乳期投与によって pre-middle age に於ける性周期異常が誘導されることが確認された。

平成 18 年度は、BPA と同様な晩発影響が陽性対象の DES の暴露によっても認められるかを確認する試験を行った。受容体結合試験やその他の内分泌かく乱作用に関する情報から DES は BPA の約 2,500 ~5,000 倍の作用を持つと考えられる。従って、20 ng/kg/day を高用量とし、以下 2 ng/kg/day を中用量、及び 0.2 ng/kg/day を低用量に設定した(委託研究:委託先:(財)食品農医薬品安全性評価センター)。

平成 19 年度は、引き続き、DES の低用量影響の確認試験を行う。20 ng/kg/day を高用量とし、以下 2 ng/kg/day を中用量、及び 0.2 ng/kg/day を低用量に設定する(委託研究:委託先:バイオラボ株式会社)。

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】

神経系・免疫系・内分泌系の高次調節率の変動による化学物質の有害性評を評価するための手法を確立する。

1) 神経・行動

胎児期および授乳期慢性的 bisphenol-A 曝露による中枢神経系の発達に及ぼす影響

鈴木 勉

使用動物および BPA の慢性曝露

実験には C57BL/6J 系雄性および雌性マウスを使用した。BPA の慢性曝露は薬物混入飼料法に従い、BPA を胎児期および授乳期に曝露し、離乳後は通常飼料にて飼育した。なお、本研究は関連法規および星薬科大学動物実験指針に従い、Refinement、Replacement、Reduction の 3R 原則に基づいて遂行した。

免疫組織化学染色法

海馬領域を含む凍結脳切片をそれぞれ作成し、GFAP、DCX および NeuroD に対する特異的抗体を用いて免疫染色法に従い検討した。

神経幹細胞における免疫組織化学的染色法

神経幹細胞の分化誘導実験は、DMEM あるいは DMEM に BPA を添加した培地にて 7 日間培養することにより行った。アストロサイトへの分化誘導の同定は、GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的染色法に従い行った。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

マウスの全脳より抽出した total RNA を用い、RT-PCR 法に従って HDAC1、2、3、4、5、6、7、9 mRNA 発現レベルを検討した。

発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究

宮川 宗之

被験動物: 9 週齢の妊娠ラット (IGS-SD) を購入し、妊娠第 6 日 (GD6) から離乳日 (PND21) まで高純度の BPA を混餌投与 (0、0.33、3.3 及び 33 ppm、各群 12

匹)した。出産5日後(PND5)に各腹の児数を8匹(雌雄同数)に調整した。離乳時に、各腹から行動試験に使用するための個体雄1匹をランダムに選び、離乳後は通常飼料(日本クレア CE-2)を与えて8週齢まで集団飼育(各ケージ4匹)した。8週齢で、食餌強化によるSCOB行動測定のため、個体別飼育と給餌制限を開始し、以後実験期間を通じての体重を300gを目標に給餌量を調整した。飲用水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。ラットの飼育室は、すべて温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の清浄環境飼育施設内にあり、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施した。

BPA 混餌投与: 市販の粉末飼料(オリエンタル酵母 MF)に、BPA(和光純薬・測定用標準品・純度>99.6%を使用)を、0 ppm、0.33 ppm、3.3 ppm 及び 33 ppm の濃度となるよう混入し、混入後に市販の固形飼料サイズに成形したものを使用した。

SCOB 測定装置: スケジュール制御オペラント行動(SCOB)の測定には8台のオペラントチャンバー(MED Associates製)を使用した。パーソナルコンピュータ用の行動実験プログラム作成システム(MED Associates製)上で、一連の条件付け訓練に必要な(各種のSCOBに対応した)プログラムを作成し、これらを用いてチャンバーを制御するとともに、反応を記録した。各オペラントチャンバー内部の前面パネル中央には、ペレットディスペンサー(粒餌提示装置)に接続された餌皿が設置され、その左右には反応レバーが1基ずつ備えられているが、今回は右側のレバーのみを使用した。餌皿と両反応レバーの上部には、cue lightが1つずつ合計3個設置され、反対側の後面パネル上部中央にはhouse light 1基が設置された。各チャンバーを防音箱(MED Associates製、換気ファン付でファンから実験中一定レベルのノイズを発生し外部騒音の影響を低減)内に置き、さらに外部からの騒音等を低減するため、全ての装置を動物舎内の専用室に設置して実験を行った。報酬の呈示を知らせる音刺激は4500 Hz($75-80\text{ dB}$ に調整、持続1

秒)を使用した。タイムアウト中以外のレバー押し反応には2900 Hzの短音(“ピップ”)という音:ピップ音)を随伴させた。

SCOB の測定手続き: 食餌を報酬としたSCOB測定のため、給餌量の調整・制限を行い体重が目標値付近で安定した後、13週齢からSCOBの測定を開始した。初めに、レバー押し反応の条件づけ訓練を行った。SCOB訓練・測定は、1日1セッションで週5日行い、後述するすべての実験が終了まで継続した。

SCOBの測定ではレバー押し反応に随伴させて報酬となる粒餌を提示する(反応の強化)が、反応回数や反応間隔など一定の条件を設定し、その条件を満たした反応のみ強化を行う。この条件を強化スケジュールと呼ぶ。強化スケジュールを、1)自動反応形成(auto-shaping)スケジュール(7セッション)、2)定率強化(fixed rate: FR)スケジュール(FR2 \times 2セッション、FR5 \times 1セッション、FR10 \times 10セッション)と順次変更して基礎的な訓練を実施し、その後、タイムアウト付交替型混合定率強化他反応分化強化(alternating mixed FR 10 DRO 10sec with TO)スケジュールを導入した。毎回のセッションは、あらかじめ規定した回数まで報酬が与えられるか規定の時間が経過することで終了とした(規定時間は自動反応形成訓練では60分、他はすべて50分に設定)。なお、報酬には45 mgの粒餌(Bio-Serv社製オペラント条件付け用ペレット)を使用した。

一連のSCOB条件付け学習訓練の初めの段階となる自動反応形成スケジュールでは、セッション中、被験動物がレバーを押す反応を自発した場合には、“ピー”という報酬呈示を予告する刺激音に引き続いて粒餌が餌皿上に一つ供された。セッション中100秒間反応が生じない場合は、セッション開始時に点灯するレバー上部のcue lightが20秒間点滅し、その後予告音に続いて粒餌が与えられた。セッション中house lightは常時消灯とした。合計100回反応が生じるか100個の粒餌が提示された時点で、規定の時間経過をまたずにセッション終了とした。

定率強化スケジュールによるセッションでは、FR 率にしたがって粒餌が与えられた。すなわち、FR2 では 2 回の反応毎に、FR5 では 5 回の反応毎に、FR10 では 10 回の反応毎に、報酬が提示された。合計 100 個の粒餌が提示されるか、50 分経過した時点でセッション終了とした。

タイムアウト付交替型混合スケジュールは、定率強化 (FR) と他反応分化強化 (Differential Reinforcement of Other Behavior: DRO) の 2 種類のコンポーネントスケジュールとタイムアウト (TO) を含む。このスケジュールでは、10 回の反応完了時に報酬が与えられる定率強化 (FR10) と 10 秒間無反応で待機することで報酬が与えられる他反応分化強化 (DRO 10 s) の 2 種類のコンポーネントスケジュールを、遅延時間となるタイムアウト (TO) を挟んで報酬提示 (強化) 毎に交替させた。タイムアウトの長さであるが、訓練の第 1 段階 (固定長タイムアウト条件・TO 4s) では、タイムアウト時間を 4 秒に固定し 25 セッション (5 週間) の訓練・測定を実施した。第 2 段階 (上昇系列タイムアウト条件・TOA) では、4 秒、8 秒、12 秒、16 秒、20 秒と、セッション内でタイムアウト時間を徐々に延長し、25 セッションの訓練・測定を実施した。第 3 段階 (上下系列タイムアウト条件・TOC) では、4 秒から 20 秒の間で、タイムアウト時間をセッション内で上下させ、25 セッションの訓練・測定を実施した。その後、薬理的負荷試験として methamphetamine、(±) SKF38393(D1 系アゴニスト)、(-) quinpirole (D2 系アゴニスト) 投与による影響の測定を行なった。

毎回の実験セッションでは、初めに FR コンポーネントがスタートし、左右の反応レバー及び餌皿上部の cue light 及び house light が点灯する。この状態で被験体が反応レバーを 10 回押すと、粒餌 1 粒が餌皿上に供される (報酬の提示・強化)。その後はタイムアウトとなって、cue light は消灯し house light のみに暗転する。規定の長さのタイムアウト後、DRO コンポーネントとなり、左右の反応レバー及び餌皿上部の cue light が再び点灯する。DRO では、10 秒間無反応で経過すれば自動的

に粒餌が与えられるが、反応があった場合にはタイマーがリセットされ、さらに 10 秒間の無反応が要求される。報酬提示後は再び暗転しタイムアウトとなる。タイムアウト終了後は、再び FR が始まる。なお、タイムアウト中に反応が生じた場合には、タイムアウト時間がリセットされ、規定長のタイムアウトがその時点から計り直されることとなる。タイムアウト中の反応にはピップ音を随伴させなかった。

このように FR であるか DRO であるかを示す弁別刺激が提示されない (どちらも同様に cue light が点灯) ため、スケジュール制御オペラント条件づけの用語では混合スケジュールという分類となる。ただし、FR か DRO を示す弁別刺激は提示されないものの、両スケジュールが強化毎に交代する (交替型) ので、どちらのコンポーネントスケジュールにしたがって前回報酬が与えられたかが手がかりとなり、これにしたがって被験体は適切な反応パターンを選択することが可能である。一種の遅延交替反応課題となり、遅延時間となるタイムアウト時間を変化させることで、短期記憶過程の測定に使用可能と考えられる。このスケジュールでは、FR-TO-DRO-TO-を 1 サイクルとして合計 51 サイクル 102 回の報酬提示が行われるか、50 分間経過した時点でセッションを終了した。

SCOB における反応の指標: 各スケジュール下での被験体の反応習得過程と、それに対して化学物質曝露が及ぼす影響を解析するための指標には、主として反応率 (1 分間当りのレバー押し反応頻度) を用いた。また、タイムアウト付交替型混合スケジュールに関しては、FR と DRO で各タイムアウト後の初発反応の潜時を求め、これらの潜時から両コンポーネントにおける反応切替えの正確さを示す指標「Accuracy」と全般的な反応性の指標「Bias」も算出した。すなわち、FR ではコンポーネント開始から 10 秒以内に反応があれば「HIT」とし、なければ「MISS」としてカウントし、「HIT」となる確率 (P[HIT]) を計算した。DRO ではコンポーネント開始から 10 秒経過する前に反

応があった場合に「FA (false alarm)」とし、無反応で 10 秒経過すれば「CR (correct rejection)」とカウントして、「FA」となる確率 (P[FA]) を計算した。その後、次式によって、「Accuracy」と「Bias」を求めた。

$$\text{Accuracy} = P[\text{ HIT}] - P[\text{ FA}]$$
$$\text{Bias} = P[\text{ HIT}] + P[\text{ FA}] - 1$$

両指標とも、-1 から +1 の範囲で変化する。両指標の計算は、被験体が反応を停止したり時間制限によりセッションが終了したりした場合以外は、各セッション最初の 1 サイクルを除き、原則として合計 50 サイクルの測定結果に基づいて行った。変動タイムアウト条件ではタイムアウト時間を 5 段階の長さで変化させたので、TO 長毎に 10 回の FR と DRO での初発反応潜時が得られた。

被験体は、条件づけ訓練の進行によって、各タイムアウトが終了し FR が開始されると数秒以内に高頻度でレバーを押す反応を示すようになり、また DRO では殆どレバー押し反応を抑制し 10 秒間待機するようになり、それぞれ高率で「HIT」あるいは「CR」に分類される反応パターンが得られるようになることを、これまでの研究で明らかにしている。この Accuracy は、FR と DRO それぞれに適したパターンで適切な反応が生じたかどうかを示すものとなる。セッション内でタイムアウト時間を変化させ、タイムアウト時間に対して Accuracy をプロットすると、遅延時間 (タイムアウト長) と反応切替えの正確さの関係を示す曲線 (Delay-Accuracy Curve) が得られる。被験体には、タイムアウトを挟んで適切に反応パターンを交替させること、すなわち遅延時間後に前回と異なる反応パターンを選択することが求められており、遅延時間の間は前回 FR であったか DRO であったか (あるいは次にどちらの反応パターンを選択すれば良いか) を記憶しておくことが求められる。したがって、タイムアウト長に対して Accuracy をプロットした曲線は、一種の短期記憶の保持曲線と考えられるものとなる。一方、Bias は FR と DRO を通じて、各タイムアウト

終了後 10 秒以内にレバー押し反応が生じた割合に対応するもので、「反応性」の全般的な指標となり、反応の適切な制御・抑制に対する影響を評価するための指標となる。

薬理学的負荷試験: 上述したようにタイムアウト付交替型混合スケジュール第 3 段階の訓練 25 セッション終了後、薬理学的負荷試験を実施した。負荷薬物としては、ドーパミン系に作用する 3 種類の薬物、methamphetamine、(-)quinpirole (D2 系アゴニスト)、(±)SKF38393 (D1 系アゴニスト) を使用した。負荷試験開始に先立ち生理食塩水投与 (i.p.) を毎日の SCOB 測定開始前に行ない、投与手技に順化させた後、週 1 回から 2 回の頻度で薬物負荷による測定を実施した。他の日は生理食塩水を投与した。投与はすべて腹腔内投与とし、行動測定開始の約 20 分前に実施した。当該薬物に関する測定期間中、生理食塩水投与で得られた値の中から、各用量での薬物投与の直前 (通常前日) に得られた測定値をベースラインとした。数回の生理食塩水投与で得られた測定値を個体毎に平均して各個体のベースラインとし、FR 反応率と DRO 反応率についてはベースラインに対するパーセント値を、また Accuracy と Bias についてはベースラインからの差の値を、それぞれ求めて、各薬物の量-影響曲線を描いた。

統計解析: SCOB の学習過程については、各スケジュールでの訓練過程毎に反復測定分散分析を実施した。すなわち、SCOB の測定で得られる 4 つの行動指標 (FR 反応率、DRO 反応率、Accuracy、Bias) について、群間 1 要因 (BPA)、群内 1 要因 (session または 5 session 毎にまとめた block) として解析した。曝露の影響が有意となった場合は、Dunnett 検定を行ない対照群との差を解析した。また薬理学的負荷試験については、負荷薬物用量の効果 (群内要因) と BPA 曝露の効果 (群間要因) について検定した。いずれも計算には SAS/GLM プロシージャを使用した。

新生児脳の性分化への化学物質高感受性 影響に関する研究 今井 清

1. 新生児期に低用量 DES を投与したラットの脳の性分化への影響

1.1 供試動物

CrI:CD(SD)ラット (SPF)

2007年9月26日に妊娠15日の雌12匹を購入した。妊娠動物は全例自然分娩させ、分娩終了を確認した日を生後0日とした。得られた新生児を各群に振り分けた。

1.2 投与物質

Diethylstilbestrol(DES: MPBiomedical) 媒体: 10vol% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)を含むコーンオイル

1.3 試験群の構成および投与量

Sprague - Dawley 系の妊娠ラット (CrjCD:SD) 12匹を購入し、自然分娩させて得られた新生児を、雌雄それぞれ一群雄12匹、雌15匹からなる4群に分け、雌雄ともに第1群は溶媒対照群として10%のDMSOを含むコーン油を、第2群、第3群および第4群には、上記溶媒に溶解したDESをそれぞれ0.2、2.0あるいは20ng/kgの割合で、生後1日(分娩終了を確認した日を生後0日とした)から5日間1日1回皮下投与した。その後投与を中止して生後6日目(投与終了翌日)、10日目(投与終了5日後)、21日目(投与終了16日後)に各群から雌雄各4匹を選出して剖検し、脳の形態学的観察に供した。さらに、各群残りの雌3匹を通常の飼育条件下で育成させ、後述のように性成熟の指標として膣開口までの日数を記録し、その後性周期を確認した。

1.4 投与方法および投与日

投与物質をDMSOに溶解し、DMSOの容量が10%となるようにコーンオイルで希釈した。

投与期間は生後1日から生後5日までとし、毎日1回、午前中に分娩が終了した母動物から得られた出生児には午前中に、午後4時までには分娩が終了した母動物から得られた出生児には午後投与した。投与液量は10 mL/kgとし、生後1日

の体重値を基に算出した。

1.5 観察、測定および検査

1.5.1 一般状態および体重測定

一般状態は、1日1回観察し、5日間の投与期間中は投与前および投与後に1日2回観察した。体重は、全ての出生児について出生翌日の生後1日に測定し、さらに、脳の形態学的観察に供した動物については、それぞれ生後6日、生後10日および生後21日の剖検日に測定した。また、後述の性成熟確認のため育成させた各群の雌3匹については、6週齢時から週1回および膣開口確認日に体重を測定した。

1.5.2 性成熟の確認

育成させた各群3匹の雌については、離乳後から膣開口が確認されるまで1日1回観察し、膣開口日翌日から膣スメア法により性周期を確認・記録した。

1.5.3 脳の形態学的観察

生後6日(最終投与24時間後)、生後10日、生後21日に安楽死させ剖検した。各動物から脳を採材し、ホルマリン固定後、主に視床下部(前腹側室周囲核、内側視索前野)を中心に組織片を切り出してパラフィン包埋後、連続切片作製をして、HE染色および免疫組織化学的に、ER α 染色、TUNEL染色を施した。なお、現在、各標本を病理組織学的に観察し、ER α およびTUNEL陽性細胞数を計測中である。

2. 妊娠期・授乳期に少量のDESを投与により、遅発性性周期異常が観察されたラットの脳性分化への影響

国立医薬品食品衛生研究所からDESの性成熟に及ぼす遅発性効果を明らかにする目的で委嘱された実験、即ちSprague-Dawley系ラットCrj:CD(IGS)を用いて妊娠期にDESの2あるいは20ng/kgを投与された母動物から出生し、長期飼育された雌動物の観察において、性周期に遅発性影響の認められた動物から脳組織を採取し、ホルマリン固定後、主に視床下部(前腹側室周囲核、内側視索前野)を中心に組織片を切り出してパラフィン包埋後、連続切片作製をして、HE染色お

よび免疫組織化学的手法による ER α 染色を施した。

2) 免疫

周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明

林 良夫

1) マウスおよび投与方法

雌NFS/*sld*マウスを使用(有効匹数雌49匹)。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。代表的なダイオキシン類として2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD、Cambridge Isotope Lab. Ins.) を各濃度(100、1000ng/kg体重)にて妊娠マウス(臍内プラーク確認3日目及び15日目)に腹腔内投与後、出産、授乳及び離乳後、6ヶ月齢での変化を非妊娠対照群と比較した。基剤としてコーンオイルが用いられた。各々のマウスにつき体重測定を実施した。なお、TCDDを用いた動物実験は国立医薬品食品衛生研究所毒性部(菅野純部長)との共同研究のもとで同研究所内特殊実験施設において実施した。

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、有機溶媒に浸染したのち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。唾液腺における炎症性病変の組織学的評価は以下の分類にて評価した。Slight:変化無し及びごく軽度のリンパ球浸潤、Moderate:中等度のリンパ球浸潤、Severe:著明なリンパ球浸潤及び腺組織破壊。

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頸部リンパ節、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(CD4、CD8; e-Biosciences)と反応させた後に3%パラホルムアルデヒドにて固定し、有機

溶媒に浸染したのち細胞自動解析装置(FACSCanto、BD)にて解析した。

4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

実験マウスにおける血清中の各種サイトカインの測定を実施した。TCDD投与マウスの脾細胞を用い、抗CD3抗体(1 μ g/ml)及び抗CD28抗体(20 μ g/ml)を固相化した96穴培養プレートに、 1×10^5 個のT細胞を24時間培養した。培養上清中の各種サイトカイン(IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ)の濃度をELISAにて定量化した。即ち、96穴マイクロタイタープレートに各抗サイトカイン抗体を固相化後、1%子牛血清アルブミン(BSA)でブロッキングし、希釈した培養上清($\times 5$)及び標準サイトカインを加え反応させた。洗浄後、ビオチン標識各サイトカイン抗体を添加反応させ、ストレプトアビジン標識ホースラディッシュペルオキシダーゼを加えた後、基質としてo-phenyldiamineを用い発色させ、マイクロプレートリーダー(BioRad)にて490nmにおける吸光度を検出した。

化学物質の周産期暴露及び *in vitro* 暴露の初期免疫応答に対する影響評価

武吉 正博

1. 被験物質暴露及びサンプリング

10%FBSを含むRPMI1640完全培地で継代培養したヒト単球系細胞株THP-1を24well plateに 1×10^6 cells/mL/wellで播種し、媒体DMSO、既知マーカー膜タンパク質CD86の発現がみられる濃度とその1/10濃度の各2用量で強度感作性物質Dinitrochlorobenzene (DNCB) 0.3及び3 μ g/mL、中程度感作性物質Eugenol (EUG) 10及び100 μ g/mL並びに非感作性物質Propylene glycol (PG) 100及び1000 μ g/mLをn=3で暴露し、3、6及び24時間後に経時的にサンプルを採取した。

2. フローサイトメトリーによるCD86の発現確認

サンプルの一部をPE標識した抗CD86抗体で染色し、フローサイトメーターEpics XL(ベックマン・コールター社製)にてCD86発現を媒体暴露群に対する相対蛍光

強度(Relative Fluorescence Intensity ; RFI)を指標として、RFI=120を境に感作性/非感作性を判定した。

3. 2D-DIGEによるディファレンシャル解析

プロテオミクス手法の一つである 2D-DIGE によるディファレンシャル解析を実施し、感作性物質暴露による変動スポットを抽出した。

4. 変動スポットのLC-Q-TOF-MSによる同定

変動スポットの同定を nanoLC-ESI- Q-TOF-MS にて実施した。

3) 生殖器

胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生生物学的解析研究

長尾 哲二

①精巣下降に関する実験

ICR マウスの妊娠 9-16 日(腔栓=妊娠 0 日)の連日に、合成エストロゲンの DES あるいはエチニルエストラジオール(17 α -Ethinylestradiol: EE)の 50 μ g/kg 体重を背部皮下注射し、胎齢 17 日、18 日および生後 1 日(養母哺育による)の雄マウスの精巣を摘出した。それらを 4%パラホルムアルデヒド(PFA)にて固定してパラフィン切片を作り、H・E 染色により組織観察を行った。次いで、アンドロゲンレセプター(AR)タンパクおよび P450scc タンパクの局在を免疫染色法(ABC 法)を用いて観察し、精巣発生・発達に関連する遺伝子群 SF-1 (Steroidogenic Factor-1)、Insl-3 (Insulin-like factor-3)および P450scc について mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて調べた。また、ICR マウスの妊娠 15-17 日の連日に、フルタミド(Flutamide: FLU)あるいはフィナスチライド(Finasteride: FIN)の 20 mg/kg 体重を強制的に経口投与し、胎齢 18 日の精巣を摘出して上記遺伝子群について同様に調べた。

②DNA メチル化制御分子に関する実験(継世代影響に関する実験)

ICR マウスの妊娠 9-16 日の連日、BPA 200 μ g/kg 体重を強制的に経口投与した。また、EE 50 μ g/kg 体重あるいは DES 50

μ g/kg 体重を背部皮下注射した。胎齢 17 日あるいは 18 日に帝王切開にて得られた胎児および養母哺育により得られた新生児から、それぞれ精巣を摘出して 4%PFA で固定後パラフィン切片とし免疫染色法(ABC 法)を用いて精巣における Dnmt1 あるいは Dnmt3a のタンパク局在を調べた。次いで、胎齢 18 日胎児の精巣については、RT-PCR 法を用いて、Dnmt3a mRNA あるいは Dnmt3b mRNA の発現を比較した。

周産期・小児期の化学物質暴露による生殖器系の発達および老化に及ぼす影響の研究

太田 亮

ラットに引き続き、げっ歯類を用いる一生涯試験の確立を目的として、DES を用いたマウス新生児投与による一生涯試験を実施した。一生涯試験では、内分泌かく乱化学物質の影響が、生殖器系のみならず行動及び免疫系にも及ぶことを考慮し、網羅的に検査するプロトコル案を考案し、発達、成熟、老化に至る全ての段階に於いて検索を試みた。以下に、その概略を示す。

使用動物: C57BL/6J マウス

群数: 5 群(新生児を各群雌雄各 25 匹以上)

飼料: 固型 CE-2(日本クレア(株))

飲料水: 水道水(秦野市水道局給水)

投与物質: Diethylstilbestrol (DES)

媒体: コーン油

投与経路: 強制経口投与

投与量: 0 (コーン油)、0.005、0.05、0.5、5 μ g/kg/day

投与量設定理由: ラットの生涯試験と同様に、子宮肥大試験の子宮重量の増加を来たす 5 μ g/kg を高用量に設定し、以下公比 10 で 0.5、0.05 および 0.005 μ g/kg を設定した。

投与期間: 生後 1 日-生後 5 日

観察項目および観察時期

1. 体重推移: 哺育 1 日-52 週齢まで測定

2. 性成熟(腔開口、陰茎包皮分離); 3-7 週齢まで観察

3. 性周期：8週齢～52週齢まで観察
4. 免疫検査（ヒツジ赤血球に対する抗体産生能）：18週齢で実施
5. 剖検：52週齢で実施
6. 生存性：哺育1日～52週齢まで観察

化学物質の齧歯類周産期暴露による雌性生殖器等の遅発性障害の研究

松島 裕子

被験物質及び投与方法；

BPA（関東化学（株）、CAS No. 80-50-7、Lot. No.807W2221）は、オリーブ油（（株）フヂミ製薬所 LotNo.0040MR）に溶解し、0（溶媒対照；オリーブ油）、5及び50µg/kg/day、投与容量5mL/kgを各群交尾が確認された雌に対し妊娠6日～分娩後20日（離乳前日）まで1日1回、毎日強制経口投与した。投与量は最新の体重値を基に算出した。

試験動物；

10週齢のCrl: CD (SD)IGSラット（日本チャールス・リバー・株）、雌42匹、雄21匹を平成20年1月21日に購入した。7日間の検疫、馴化期間終了後、健常である事が確認されたラットを雄1対雌2で一晩同居させ、翌朝膣栓及び膣垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠0日と定めた。

ラットは、床敷きとしてソフトチップ（三協ラボ株式会社；加熱乾燥済み）を入れたポリオレフィン樹脂ケージ（CL-0108-2 クリーン 200TPX 日本クレア株式会社、D420×W263×H199）に雌雄とも個別に収容し、温度25±1°C、湿度50±5%、換気回数12回/時、明暗サイクル12時間明（7:00-19:00）-12時間暗（19:00-7:00）に設定された動物室で飼育した。

飼料はMF（オリエンタル酵母株式会社）、飲料水は給水瓶に上水道水を入れ、いずれも自由摂取させた。

収容匹数収容匹数は、検疫・馴化期間中は雌雄共1匹/ケージ、交配は雄1対2雌とし、妊娠期間中は1匹/ケージ、分娩後は翌日まで雌1匹+全腹/ケージ、哺育2日目から離乳まで同腹児数を原則として雌性児8匹となるよう調整した。同腹児

数が8匹に満たない場合は個体数調整は行わないこととした。離乳以降は2匹以下/ケージとする。

母動物の体重は妊娠0、6、14、17及び20日、分娩後0、5、7、14及び21日（出生児の離乳日）に測定した。妊娠動物の全例を自然分娩させ、出生日（分娩日を分娩0日とした）に出産児数、出産死亡児数、出産児性を記録した。

雌性出生児（F1）について体重は0、5、7、14及び21日齢（出生児の離乳日）、以降週1回に加え、膣開口日及び剖検日に測定する。

生存する離乳児全例について、21日齢から膣開口を観察する。

生存する雌性出生児については、離乳翌日PND21、PND40、3ヶ月齢及び6ヶ月齢に下記検査項目を行う。PND40以降に剖検する動物は膣スメアにより発情前期の動物とする。

検査項目；1）出産日、産児数、出産児性比、母及び児の体重、2）視床下部；GnRHmRNAを定量RT-PCRにて測定。下垂体；重量測定；GeneChip及び免疫染色（prolactin）；血清；prolactin、LH、FSH及びE₂値を測定；卵巣重量測定、多卵性卵胞、黄体の有無；乳腺 whole mount preparation；子宮重量測定、病理組織学的解析；膣病理組織学的解析。

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

恒常性維持機構に対する影響の発現機序を分子・遺伝子レベルで解明し、評価試験の基礎を固める。

ES細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及びAhRを介する晩発影響の解析研究

高木 篤也

化合物の添加溶媒としてdimethyl sulfoxide (DMSO)のES/EB系に対する遺伝子発現影響について基礎的検討を行なった。実験は、DMSOを0.1%の濃度で培地に添加し、ES細胞をLIFを除いたES培地で、最初の2日間は天井培養法で、次の5日間は浮遊培養法で、計7日間培養

した。培養開始 1 日目から 7 日目まで毎日 EB を採取してプールし、サンプルとし、アフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法(細胞1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法)を適用した。また、既知情報に基づく pathway 解析を IPA5.5(Ingenuity Systems 社)を用いて実施した。次いで、内分泌かく乱化学物質として知られている Bisphenol-A (BPA) (1nM)を DMSO(final 0.1%) に溶解して、培地に添加し、ES/EB 系への影響を同様のプロトコールにて検索した。

新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究

藤本 成明

1) 動物: 生後 5 日目の C57BL 雄マウスを Charles River Japan より購入した。生後 6 日目で、テストステロンプロピオネイト (TP) 4 mg/kg bw、17 β estradiol(E2) 0.1、1 μ g/kg bw を i.p.投与した。前立腺組織については、腹葉(VP)、背側葉(DLP)、前葉(AP)を解剖学的に区別して保存した。

2) 器官培養: 生後 6 日目のマウスの前立腺を切り出し、MC フィルター上に置いて培養した。培地として、DME/F12/albumin / insulin/transferrin を用いた。

3) mRNA 定量: 前立腺の各組織および培養片から RNA 抽出キットにより全 RNA を精製し c DNA 化後、Sybr Green による real time PCR 法により mRNA の発現レベルを測定した。内部標準として β actin の mRNA を定量した。

4) *in vitro* プロモーター解析

新生児期のアンドロゲン応答遺伝子である PSP94、probasin、SPI-KT3、EAPA2、defensin b1 についてその遺伝子上流域を含む luc レポーターを作製した。これらを、CHO、DT3 細胞株にトランジェントに導入して、ジヒドロテストステロン (DHT)及び E2 を添加し、アンドロゲン応

答性とその修飾作用を解析した。またこのプロモーター領域の DNA と細胞内因子の相互作用をゲルシフトアッセイにより検討した。

神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する化学物質脳神経系影響の分子毒性学的解析

五十嵐 勝秀

<マウス胎児神経幹細胞培養(NS cell培養)>

C57BL/6 マウス妊娠 11.5 日もしくは 14.5 日の胎児より終脳を分離し、トリプシンもしくはピペットを用いて単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (シグマ社の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、ブトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) に、bFGF (10ng/ml)及び EGF (10 ng/ml)を添加したものを、10cm シャーレ(ヌンク社) に 10⁶個/6mlの密度で生細胞を播種する。翌日 bFGF を半量添加、翌々日培地交換のサイクルを繰り返し、未分化状態での細胞増殖を促す。

<メチル化 DNA の分離精製>

培養細胞、組織から抽出精製したゲノム DNA 5ug を超音波処理にて破碎し、100-400bp の断片とする。メチル化 DNA 結合蛋白質 MBD2 を用いたメチル化 DNA の分離精製を行う。詳細は、Methylcollector (Active motif社)のプロトコールに従った。

<Promoter array による解析>

Mouse Promoter 1.0R Array (Affymetrix 社)にてデータを取得した。Affymetrix 社のプロトコールに従い、DNA を増幅し、uracil-DNA-glycosylase を用い短鎖化し、3'末端をビオチンラベルしたターゲット液をハイブリさせ、ストレプトアビジン-phycoerythrin にて染色し、蛍光シグナルデータを得た。

<データ解析>

Promoter array から得られたデータを Genomatix 社の Chipinspector にて解析した。

Promoter 配列の *in silico* 解析は、Genomatix

Suite(Genomatix 社)にて行った。Pathway解析は Ingenuity pathway analysis(Ingenuity Systems Inc.)にて行った。

AhR の生理機能と炎症応答・小児期個体における役割

藤井 義明

AhR 欠失マウス及び野性型マウスの腸組織及びマクロファージや T 細胞などを用いて遺伝子発現の変化や形態学的変化などについて DNA-マイクロアレイ法、RT-PCR 法、抗体染色法及び生化学的・分子生物学的方法を用いて総合的に解析し、AhR 欠失と正常マウスの組織、細胞の比較を行う。

CYP 遺伝子発現を制御する SXR、CAR、AhR 等の薬物受容体と免疫系制御因子 NF κ B の相互作用の分子解明

西川 淳一

細菌感染モデルマウスでの CYP の発現

BALB/c 系雄マウスに LPS(1 mg/kg)を腹腔内投与して免疫系を活性化した後、3 時間後に化学物質として PCN (pregnenolon-16-carbonitrile)を 50 mg/kg の濃度で腹腔内投与した。さらに、21 時間後に LPS(1mg/kg)を再び投与して、その 3 時間後に肝臓から RNA を抽出し、CYP3A11 の発現量をリアルタイム PCR で調べた。

薬物代謝系活性化状態における免疫系遺伝子の発現

BALB/c 系雄マウスに LPS(1 mg/kg)を腹腔内投与した後、21 時間後に再び LPS(1 mg/kg)を腹腔内投与した。その後、3 時間後に PCN を投与して薬物代謝系を活性化し、24 時間後に肝臓を抽出し、IL1b、IL6、TNFa および ICAM-1 の発現量をリアルタイム PCR で調べた。

I 型アレルギーモデルマウスでの CYP の発現

BALB/c 系雄マウスに卵白アルブミン(OVA)とフロイント不完全アジュバンド(FIA)(2 mg/ml OVA 生理食塩水溶液: FIA=1:1 のエマルジョン)を 50 ml/mouse で腹腔内投与して感作し、二週間後に再度 OVA(0.1 mg/ml)を腹腔内投与すると

I 型アレルギーの典型症状である全身アナフィラキシーが誘導されることを確認した。そこで、OVA+FIA で感作後、14 日目に PCN(50 mg/kg)を腹腔内投与し、その 1 日後に OVA でアレルギーを惹起した後、肝臓から RNA を抽出して、CYP3A11 の発現量をリアルタイム PCR で調べた。

RNA の抽出と cDNA の合成

肝臓をセパゾール RNA I super(ナカライテスク)中でホモジナイズして、total RNA を抽出した。得られた total RNA を鋳型として、oligo dT プライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。

Real-time PCR

SYBER Primer Ex Taq(タカラバイオ株式会社)を用い、(95°C、10sec)で初期変性後、(95°C、5sec)→(62°C、32sec)を 40 サイクルで PCR 反応させ、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)を用いて解析した。

【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】

OECD、WHO 等の国際機関に於ける動向と同調するため、国際的な動向を調査し評価スキームの確立に資する。

形態形成期への影響を中心とした研究動向に関する OECD/WHO 関連等ハーマナイゼーション総括 井上 達

諸国際組織における現段階での研究動向を整理すると同時に、併せて、平成 18 年 11 月ヘルシンキで開催されたウェイブリッジ+10 国際会議(1996 にロンドン郊外のウェイブリッジで開催された「ヒトの健康と野生生物への内分泌かく乱化学物質問題のインパクトに関する欧州ワークショップ」の開催 10 年を記念して開催されたワークショップ)における討議事項に即して現状を検討し、内分泌かく乱化学物質問題の諸課題の到達点と今後の課題を抽出することを意図して整理した。

POPs を中心とした有害性評価手法における高感受性集団対応に関する国際動向調査研究

広瀬 明彦

2007年9月に東京で開催された第27回ハロゲン化有機環境汚染物質とPOPSに関する国際シンポジウムに参加し、POPを中心とした化学物質暴露に対して脆弱な集団に関しての特有な有害性発現メカニズムや高感度の新評価手法の開発に関する研究、あるいはリスクアセスメントに関する最新の国際動向を調査した。

(倫理面への配慮)

各施設の倫理規定に従い適切に動物実験を実施する。

星薬科大学は平成元年11月22日制定「星薬科大学動物実験指針」に従い、Refinement、Replacement、Reductionの3R原則に基づいて、さらに「星薬科大学動物センター使用規定(平成16年11月5日施行)」に従って動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行った。

独立行政法人 労働安全衛生総合研究所、産業医学総合研究所は、「独立行政法人労働安全衛生総合研究所、産業医学総合研究所動物実験に関する指針」に従って実施する。

財団法人 食品農医薬品安全性評価センターは、(財)食品農医薬品安全性評価センターの「動物実験倫理委員会規定」、「実験動物の管理基準(2003年4月1日改正)」および「動物実験に関する指針(2003年4月版)」を遵守し、適正に使用する。

徳島大学は、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徳島大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。

財団法人 化学物質評価研究機構は、当機構実験倫理審査委員会の制定する実験倫理審査委員会規程(平成17年4月制定)に従い、研究倫理委員会の厳格な審査、管理のもとに「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の使用及び保管等に関する基準」を遵守し適正に試験を実地した。

近畿大学は、近畿大学理工学部「動物実験に関する指針」に準拠して行い、使用した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など苦痛の少ない方法を用いる。

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所は、動物の愛護及び管理に関する法律、「実

験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」に基づいて実施する。

国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定する国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程に従い実験を行っている。

その他各所属研究機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。

C. 研究結果

先行研究班である、厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)「内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究(H16-化学-一般-001)及び、同「内分泌かく乱化学物質(ダイオキシン類を含む)の胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究(H16-化学-一般-003)」に於いて、受容体原性毒性のメカニズムに基づくと理解される低用量影響が神経-内分泌-免疫系にまたがること、それを含めた作用の検出の為の「確定試験」として一生涯(発生、発達、成熟、老化)の全ての段階に於いて懸念される毒性指標を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発とその支援基礎研究としての分子毒性メカニズム研究、催奇形性メカニズム研究についての所定の成果が得られたことから、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」の策定と実施、ダイオキシン行政への貢献等の行政対応への貢献が可能となった。

本研究は、先行研究班の構成の一部を継承しつつ、【総括、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究】を取り纏め部門として、以下、目的に沿って、【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】、【有害性発現分子メカニズムの解明研究】、および【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】の3部門を置き、研究を推進する。最終的には、各研究課題の展開を促進し、最終年度の21年度に向けての高

感受性有害性総合評価スキームの策定への成果の集約を図る。

以下に分担班員の研究結果の概要を記載する。

【総括】部門

総合評価スキーム策定のとりまとめ、低用量遅発影響の機序の解明

総括

小野 宏

OECD 対応を含む内分泌かく乱化学物質問題対応の厚労省試験スキームの方針・年次計画に沿った研究体制の維持・統率を行うとともに、2007年12月5～6日パリにおいて開催されたOECD/EDTA/VMG-mammalian 7(哺乳類試験検証運営委員会第7回会議)に厚労省代表として本研究班等の業績を携え参加し、今後の国際的試験法制定およびバリデーションに関する方向性の設定に大きな貢献を果たした。

総括補佐、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究(委託研究を含む)

菅野 純

齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を下記の如く(1)調整する際の取り纏めを行うと共に、更に、実際の試験への応用の1つの可能性を明らかにする為に、すでに実施し、低用量データを得ているBPAに引き続き、(2)Diethylstilbestrol (DES)をラット経胎盤・経母乳暴露した際の雌性F1動物の性ホルモン系に対する低用量影響を検出するための動物実験を実施した(委託研究委託先: バイオラボ株式会社)。

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項;

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】部門の神経・行動に関しては、BPA 妊娠期・授乳期暴露をモデルとし、dopamine 及び choline 神経系に着目した次世代の中枢神経系に及ぼす影響、マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価及び脳の性分化への影響解析を実施することとした。

免疫系に関しては、自己免疫疾患モデ

ルマウスを用いた化学物質暴露による自己免疫発症の有無、ヒト単球細胞株を用いたアレルギー反応のキーとなる初期免疫応答能を評価するためのマーカー蛋白質の検討を実施することとした。

内分泌系に関しては、周産期化学物質暴露の影響を従前の生殖毒性に限定せず、生殖関連臓器の形成、発達、機能、及びその加齢変化に対する影響を視野に入れた研究を実施することとした。

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

部門では実質的研究課題、及び評価法開発を前提とした研究課題を推進する。全分化能を持つES細胞を用いた化学物質の発生初期への影響、マウス新生時期前立腺形態形成に重要な役割を果たすアンドロゲン応答性遺伝子について転写活性化のメカニズムを明らかにすること、それに対する化学物質の修飾作用を解明すること、神経幹細胞の成熟に関与するDNAメチル化制御機構を網羅的に解析すること、AhRの大腸がん抑制と抗炎症作用の分子メカニズムを解析すること、免疫系の活性化と化学物質の体内薬物動態の誘導について検討すること、となった。

【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】部門では、子ども健康問題を中心としたOECD/WHO関連及び、PCBやダイオキシンなど、いわゆるPOPsを中心とした国際動向調査研究を推進する。

(2) BPAあるいはDESのラット経胎盤・経母乳暴露試験における低用量影響の検討

本研究では、EDCsのラット経胎盤・経母乳暴露による雌外部生殖器への奇形誘導と遅発性の性機能障害に焦点を当て、低用量のEDCs影響が次世代に及ぼす影響を検出する検査項目になり得るかを検討する。平成16年度の研究において、BPA低濃度(5、50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)の妊娠期・授乳期投与によって成熟期における性周期異常が誘導された。平成17年度は再現性を検討した結果、少なくとも50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で合致する結果が得られたことから、それが確認された。平成18年度は、DESの0.2、2及び20 $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ をラット経胎盤・経母乳暴露し、12ヶ月齢まで性周期を観察し

た(委託研究:委託先(財)食品農医薬品安全性評価センター)結果、5ヵ月齢までの観察で対照群では異常性周期を示す動物が認められなかったのに対し、被験物質投与群では persistent diestrus あるいは constant diestrus の連続休止期を示す動物が少数例ながら認められた。しかし、その発生数は月齢によって増減し、一定の傾向はみられなかった。Persistent estrus あるいは constant estrus の連続発情期を示す動物については、対照群で persistent estrus を示す動物の発生数が明らかに増加したのが 10ヵ月齢以降であるのに対し、被験物質投与群では 6ヵ月齢以降に認められ始め、2 および 20 ng/kg 群で 9ヵ月齢までその発生数が増加する傾向がみられた。9ヵ月齢以降は、特に 20 ng/kg 群で連続発情期を示す動物の明らかな発生数の増加が認められた。このことから、DES についても、BPA 同様の周産期暴露による遅発影響を惹起することが示された。また、DES の低用量によっても雌出生児で Cleft phallus の発生が認められ、雄出生児で肛門挙筋および球海綿体筋重量に影響を及ぼすことが示唆された。

平成 19 年度は、同様のプロトコールによる DES の性周期に対する遅発性影響を確認する目的で実験を実施し、現在解析中である。

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】部門

1) 神経・行動

胎児期及び授乳期の Bisphenol-A 暴露による中枢神経系の発達に及ぼす影響

鈴木 勉

これまでに、BPA を胎児期および授乳期に暴露された次世代マウスにおいて、記憶保持能力の低下および choline 作動性神経系の機能低下が引き起こされることを明らかにしている。さらには極めて低用量の BPA が、アストロサイトの肥大化、樹状突起の伸展といった典型的な活性化形態変化を引き起こし、グリア細胞共存下において神経の機能亢進をも引き起こすことを見いだした。

平成 19 年度は、胎児期・授乳期の BPA 暴露による、海馬領域におけるグリア細胞、並びに神経新生に対する影響について検討を行った。その結果、アストロサイト免疫活性の著明な増強が、また高用量 BPA 慢性暴露により、神経新生を促進する doublecortin (DCX) ならびに、神経細胞の成熟を促進する NeuroD 免疫活性の著明な減弱が認められ、BPA が神経新生を抑制する可能性が示唆された。さらに、BPA を培養神経幹細胞に処置することにより、アストロサイトへの分化誘導が促進されることを確認した。

また、ヒストンアセチル化レベルを調節するヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase、HDAC)の発現変化は、クロマチン活性を変化させ遺伝子発現異常を引き起こすと考えられる。そこで BPA の胎児期・授乳期暴露による HDAC の発現に及ぼす影響について検討した結果、HDAC 1、2、3、4、5、6、7、9 mRNA 量の有意な減少が認められた。この HDAC 発現異常が、成体期における変化を引き起こす可能性が示唆された。

発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究

発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究

宮川 宗之

これまでの研究で、「タイムアウト付交替型混合スケジュール」による SCOB 試験課題をマウス及びラットに学習・習得させ、認知機能への影響の指標となる学習曲線や短期記憶の保持曲線を得るためのプロトコールは完成している。

平成 19 年度は、ラットに BPA を妊娠・授乳期混餌暴露(0.33 ~ 33 ppm 混餌)による影響を SCOB により検討したところ、学習習得の遅延と考えられる影響が認められたが、短期記憶過程への影響は認められなかった。陽性対照としての非コプラナー型 PCB (PCB153 を予定) の設定については予備的検討を継続中である。

新生児脳の性分化への化学物質高感受性影響に関する研究

今井 清

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