

200839011A

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 20 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 21 ( 2009 ) 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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野 宏

平成 21( 2009 ) 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..... 27  
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 ..... 33  
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 ..... 39  
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：低用量エストロジェンの視床下部前腹側室周囲核の発達・分化への影響に関する研究..... 65  
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..... 75  
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 ..... 91  
武吉 正博

**3) 生殖器**

7. 内分泌かく乱化学物質の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..... 99  
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..... 107  
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 ..... 113  
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..... 117  
高木 篤也
- 委託研究(委託先;財団法人 化学物質評価研究機構) ERレポーター遺伝子測定  
-ER系へ作用する化学物質検出法の検証データの収集..... 119
11. 新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究..... 127  
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..... 131  
五十嵐 勝秀
- 委託研究(委託先;大塚製薬株式会社)
- 1) AhR、AR、TR系レポーター遺伝子測定 -ARを介する作用に関する研究..... 135
- 委託研究(委託先;株式会社 医薬分子設計研究所)
- 2) ホルモン活性予測計算 -高感受性集団への影響を及ぼす化学物質の電算検索-..... 219
13. AhRの生理機能と炎症応答・小児期個体における役割..... 243  
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 $\kappa$ B の相互作用の分子解明..... 247  
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. 253  
井上 達
16. 高感受性集団に対する有害性検出手法に関する国際動向調査研究..... 261  
小野 敦
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 265
- IV. 研究成果の刊行物・別刷..... 275

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

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、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、この指摘に答える為に、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注目し、(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。

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

菅野 純・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、部長

鈴木 勉・星薬科大学 薬学部薬品毒理学教室、教授

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、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 毒性部、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

小野 敦・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 総合評価研究室、主任研究官

## 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

### ●小野 宏

国内および国際的に進められている試験法策定の作業に関わり、これまでこの研究班等で行われた研究成果に基づいて作業に貢献した。(1)厚生労働省医薬品食品局の開催した「第20回内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」、(2)OECD試験法ガイドライン計画で行われている関連試験法ガイドライン案文の検討、(3)OECDではまた、既存の試験法「二世世代生殖毒性試験(TG416)」を改造し、「延長一世代生殖毒性試験 Extended One Generation Reproductive Toxicity Test」とする計画があり、その協議に参加している。

### 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・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

#### 3) 生殖器

- 胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生物学的解析研究

- 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 の生理機能と炎症応答・周産期小児期個体における役割
- 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 $\kappa$ B の相互作用の分子解明

### 【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
- 高感受性集団に対する有害性検出手法に関する国際動向調査研究

### ●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 Frame Work 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。

本研究分担者は、(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Bisphenol A (BPA)、Diethylstilbestrol (DES)に引き続き、(2) 低用量 Genistein (GEN)のラット経胎盤・経母乳暴露による雌性児動物の性ホルモン系に対する遅発性影響に関する動物実験を実施した(委託研究: 委託先:(財)食品薬品安全センター秦野研究所)。

#### (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、DES及びGEN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、BPAの5、50 $\mu$ 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  $\mu$ 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照物質の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った。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: パイオラボ株式会社)。

平成20年度は、GENの低用量影響の確認試験を行った。1000  $\mu$ g/kg/dayを高用量とし、以下200  $\mu$ g/kg/dayを中用量、及び40  $\mu$ g/kg/dayを低用量に設定した。DES 0.02  $\mu$ g/kgを陽性対照群に置く(委託研究: 委託先:(財)食品薬品安全センター秦野研究所)。

#### 【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

##### ●鈴木 勉

使用動物およびBPAの慢性曝露



実験には 雌雄C57BL/6J 系マウスを使用した。BPA の慢性曝露は薬物混入試料法に従い、BPA を胎児期および授乳期に曝露し (0、30ng、2 mg/g of food)、離乳後は通常飼料にて飼育した。また、胎児脳を用いた検討では、胎生 14 日目の全脳サンプルを採取した。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遂行した。

#### Methylation-specific PCR (MSP)

BPA 曝露による DNA メチル化の検討は、胎生 14 日目のマウス全脳より DNA を抽出し、パイサルファイト処理をした後、methylation-specific PCR (MSP) 法に従い GFAP 転写開始部位付近の DNA メチル化状態を検討した。

#### 免疫染色法

海馬領域を含む凍結脳切片をそれぞれ作成し、phosphorylated (Ser 498)-histone deacetylase 5 (p-HDAC5) 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。

#### ●宮川 宗之

**被験動物:** 9 週齢の交配確認済みラット (IGS-SD、日本チャールスリバー) を購入し、妊娠第 15 日 (GD15) から生後 20 日 (PND20) まで PTU を連日強制経口投与 (0、0.5、1.0、2.0 mg/kg/day、各群 8 匹) した。出産 2 日後 (PND2) に各腹の仔数を 8 匹に調整した (別の測定に使用する都合で、雄雌比を可能な限り 6:2 とした)。PTU 投与による仔の成長遅延を考慮し、対照群を含め全群で離乳を通常より 1 週間遅くし生後 28 日とした。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、離乳後は一般固形飼料 (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。ただし、対照群では未妊娠動物が 2 匹含まれていたため、同群 6 腹中 2 腹では同腹から 2 匹の雄性仔を行動実験に使用した。但し、結果の解析には同腹仔を除外し 1 腹 1 匹のデータを使用した。8 週齢からは、食餌強化によ

る SCOB 行動測定のための個体別飼育と給餌制限を開始した。以後、実験期間を通じての体重を 8 週齢時の 85% を目標に維持すべく給餌量を調整した。飲用水は実験セッション中を除き自由摂取とした。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。

**PTU 投与:** PTU (6-n-propyl-2-thiouracil, Sigma 社製, product # p3755, 純度 99% 以上、Lot.:99H2509) の用量 (0、0.5、1.0、2.0 mg/kg/day) は、先行研究において学習に影響が報告されている用量を参考に予備実験を行ない、以下を考慮して決定した。最高用量は産仔体重に明確な減少が認められるものの産仔数は減少せず (今回の本実験では、産仔数は 0、0.5、1.0、2.0 mg/kg 投与の各群に対して平均 11.2、13.0、11.8、11.1 匹) 離乳まで哺育が可能な最大量に近いレベルに設定した。また公比を 2 とし他の 2 用量を決定した。離乳時の仔の体重に明確な用量依存的変化 (減少) が認められる範囲である。コーン油に溶解し投与量は 10 ml/kg とした。

**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 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”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、12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なった。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 ratio:FR)スケジュール(FR2×2セッション、FR5×1セッション、FR10×10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(規定時間はすべて50分に設定)。なお、報酬には45mg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は常時点灯とした。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 10s)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（ $P[\text{HIT}]$ ）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（ $P[\text{FA}]$ ）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 それぞれに適応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。

以上、全ての実験は労働安全衛生総合研究所の動物実験に関する指針にしたがって実施された。

**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(PTU)、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。また、PTU 投与の影響が全体として有意かどうかに関わらず Dunnett 検定を行ない対照群と各群の差を解析した。薬理的負荷試験については、負荷薬物用量の効果(群内要因)と PTU 投与の効果(群間要因)について検定した。いずれも計算には SAS/GLM プロシージャーを使用した。

#### ●今井 清

下垂体の病理組織学的検査対象とした動物は、昨年度実施した経胎盤的に低用量の DES を暴露したのち、性成熟あるいは発情周期の変化を 29 週間に亘り観察した雌動物から選出した。すなわち、Sprague-Dawley 系ラット CrI: CD(SD)を用いて妊娠期に DES 0.2、2.0 あるいは 20 ng/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、発情周期に遅発性効果の認められた動物から下垂体および脳組織を採取し、ホルマリン固定後、下垂体は前葉、中間葉、後葉を含む全組織を、脳に関しては主に視床下部(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、いずれも HE 染色をしたほか、免疫組織化学的手法により ER $\alpha$  を染色し、さらに下垂体には FSH および prolactin (PRL) 染色を施した。免疫組織化学的染色に使用した主な試薬は以下の通りである。

- FSH:
  - 抗原賦活化: プレッシャークッカー 125°C 5min.
  - 1次抗体: Rabbit anti-rat FSH polyclonal antibody (AbD serotec 社 4561-7359) dilution: 1/100
  - 洗浄: TBST
  - ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用
  - 発色: DAB Reagent Set (KPL 社)
- PRL:
  - 抗原賦活化: なし
  - 1次抗体: Rabbit anti-rat PROLACTIN polyclonal antibody (AbD serotec 社 7770-5004G) dilution: 1/100
  - 洗浄: TBST
  - ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用
  - 発色: DAB Reagent Set (KPL 社)
- ER  $\alpha$ :
  - 抗原賦活化: プレッシャークッカー 125°C 5 min. (下垂体) あるいはマイクロウェーブ 90°C 10 min.  $\times$  2回 (視床下部)
  - 1次抗体: Mouse anti-estrogen receptor monoclonal antibody (NOVOCASTRA 社 NCL-ER-6F11) dilution: 1/80
  - 洗浄: TBST
  - 下垂体: ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用  
視床下部: ダコ LSAB2 System-HRP (Dako 社) 使用
  - 発色: DAB Reagent Set (KPL 社)

## 2) 免疫

### ●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。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(膈内プラーク確認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を用いた。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 $\mu$ 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Whiteらの分類に従って評価した。

#### 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 $\mu$ g/ml) 及び抗 CD28 抗体 (20 $\mu$ g/ml) を固相化した 96 穴培養プレートに、 $1 \times 10^5$  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- $\gamma$ ) 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 (×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。

#### 5)Real-time PCR 法

脾臓から Th1、Th2 抗体及びマグネットビーズを用いて T 細胞を分離し、トライゾールにて Total RNA を調整した。また、各組織に関してもトライゾール及びホモジナイザーによって total RNA を分離した。逆転写反応後、PTC-200 DNA Engine Cycler 装置 (MJ Research, Waltham, MA) を用い、下記プライマーにて各 mRNA を定量化した。

• T-bet;

F:5'-CCTGTTGTGGTCCAAGTTCAAC-3',  
R:CACAAACATCCTGTAATGGCTTGT-3',

• GATA-3;

F:5'-GACTTGCCAGAAAGGCAGAC-3',  
R:5'-AAAGAGGTCACCACCCACAG-3',

• NF- $\kappa$ B;

F:5'-ATGGCAGACGATGATCCCTA-3',  
R:5'-TAGGCAAGGTCAGAATGCAC-3',

• AIRE; :

5'-TCTGCTAGTCACGACCCTGTTC-3',  
R:5'-GGCGTGACATGCTCTGGAT-3',

• SP-1;F:GGCTCTGAAACTCAGGCAGA-3',  
R:TGCAAACATCCACGTTGT-5',

• GAD67;

F:TGCAACCTCCTCGAACGCGG-3',  
R:5'-CCAGGATCTGCTCCAGAGAC-3',

• Insulin;

F:AGACCATCAGCAAGCAGGTC-3',  
R:CTGGTGCAGCACTGATCCAC-3',

•  $\beta$ -actin;

F:5'-GTGGGCCGCTCTAGGCA-3',  
R:5'-  
GGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'

### ●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24 well plate に $1 \times 10^6$  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 $3 \mu\text{g/mL}$ 、軽度感作性物質Eugenol (EUG) 10及び $100 \mu\text{g/mL}$ 並びに非感作性物質Propylene glycol (PG) 100及び $1000 \mu\text{g/mL}$ 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発現を媒体対照群 (VC) 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. マイクロアレイによる遺伝子発現解析

各被験物質暴露後の THP-1 細胞からそれぞれ Total RNA を抽出し、同じ暴露条件の Total RNA (n=3) を等量混合した。等量混合した Total RNA を Template として Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent 社製) を使用して蛍光標識 (Cy3) cRNA を作製し、

Whole Human Genome Oligo Microarray 4x44K (Agilent 社製) を用いて 1 色法により網羅的に遺伝子発現解析を行った。媒体対照群に対する被験物質暴露群の発現比を算出し、2 倍以上または 1/2 倍以下に発現変動した遺伝子を抽出した後、ベン図解析を行い、感作性物質 DNCB 及び EUG で共通に発現変動し、かつ非感作性物質 PG で共通に発現変動しなかった感作性物質特異的遺伝子群を抽出した。なお、マイクロアレイによる遺伝子発現解析については、原則高用量群のみとした。

#### 4. 遺伝子機能及びネットワーク解析

遺伝子機能及びネットワーク解析を Ingenuity Pathways Analysis (IPA ; Ingenuity 社製) により行った。

### 3) 生殖器

#### ●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(膣栓=妊娠 0 日)あるいは妊娠 15-17 日の連日に、diethylstilbestrol (DES) 1.5-50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重を背部皮下注射し、妊娠 18 日に帝王切開して胎児を摘出した。雄胎児について体重および精巣重量を測定し、精巣-腎臓間距離を計測した。次いで精巣下降の制御に関連する遺伝子群 InsI3 (insulin-like factor3)、SF-1 (steroidogenic factor-1)あるいは P450 $\text{sc}$  (コレステロール側鎖切断酵素) について精巣を材料として mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。

さらに Flutamide (FLU) 40 mg/kg 体重を妊娠 15-17 日に強制的に経口投与し、胎齢 18 日胎児の精巣を摘出して上記遺伝子群について同様に調べた。

次いで低用量の BPA の 2-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重を妊娠 9-16 日あるいは 15-17 日に強制的に経口投与して上記と同様に調べた。なお、陽性対照として Ethynyl estradiol (EE) 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重を用いた。

##### ②DNAメチル化制御分子に関する実験

C57BL/6J マウスの妊娠 8-11 日の連日、DES 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重を背部皮下注射した。胎齢 13、14、15 あるいは 18 日の胎児精巣について、DNAメチル化酵素 (DNA methyltransferases: Dnmt) 1、3a、3a2、3b ならびに 3L 遺伝子 mRNA の発現パターンを real-time PCR により解析した。また、同時期の精巣におけるメチル化 DNA の定量 (Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit, Epigentek Inc.) を行った。さらに同時期の精巣精細管内の超微形態を電子顕微鏡により観察し、細胞傷害の程度を確認した。

なお、いずれの実験においても「近畿大学動物実験規程」に準拠して行い、使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用しないしは頸椎脱臼など苦痛の少ない方法を用いた。

#### ●太田 亮

DES の 0 (コーン油)、0.005、0.05、0.5 および 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を C57BL/6J マウスの生後 1 日から 5 日間、1 日 1 回強制経口投与し、以下の検査を行った。

【体重推移】生後 1 日から 54 週齢に至るまで体重を測定し、体重推移を観察した。

【性成熟】雌は膣開口、雄は陰茎包皮分離の完成日を指標にして、性成熟の時期を調べた。

【性周期】8 週齢から 54 週齢まで膣スミアを採取し、加齢に伴う性周期の変化を観察した。

【器官重量】15 週齢時に雄を解剖し、生殖器系を含む各器官の重量を測定した。

【免疫検査】20 週齢時にヒツジ赤血球に対する抗体産生能を検査した。

【行動試験】27 週齢時に複合 T 型水迷路学習試験を実施した。

全ての実験操作は、「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」に基づいて実施した。

## ●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)フジミ製薬所 LotNo.0040MR) に溶解し、0 (溶媒対照; オリーブ油)、5 及び 50 µg/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 日一分娩後 (PND) 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 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 で一晚同居させ、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。

収容匹数は、検疫・馴化期間は雌雄共 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、分娩後は翌日まで母動物 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/ケージとした。

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)に出産生児数、出産死亡児数、出産生児性を記録した。

離乳児全例について、21 日齢から膣開口を観察した。

雌性児については、離乳翌日 PND21、PND40、3 ヶ月齢及び 6 ヶ月齢に下記の項目の検査・検体採取を行った。PND40 以降は膣スメアにより発情前期にあることを確認した上で剖検に供した。

検査・検体採取項目;

- 1) 出産生児数、死産児数、出産児性比
- 2) 視床下部: RNAlater 保存 (Gene Chip 及び GnRH 定量 RT-PCR 用)
- 3) 下垂体: 重量測定、全解剖例の半数は RNAlater 保存、残りの半数は 10%ホルマリン固定 (定量 RT-PCR(LH、FSH) 及び免疫組織化学染色 (prolactin) 用)
- 4) 血清: prolactin、LH、FSH、E2 値測定用
- 5) 卵巣: 重量測定、メタカーン固定 (病理組織用)
- 6) 乳腺: whole mount preparation
- 7) 子宮: 重量測定、10%ホルマリン固定 (病理組織用)
- 8) 膣: スメアによる性周期判定:

全ての出生児について 6 ヶ月齢まで性周期の観察を行った。14 日間連続膣スメア採取後、2 週間休止した。膣スメアは午前 10:00 から 12:00 の間に採取し、ギムザ染色後、性周期を、発情前期、発情期、発情後期、休止期の 4 区分に分類した。Normal、persistent diestrus (休止期が 5-9 日継続)、constant diestrus (休止期が 10 日以上継続)、persistent estrus (発情期が 3-7 日継続)、constant estrus (発情期が 8 日以上継続) に分類した (委託試験における分類と同様に分類した)。

解剖例の半数は 10%ホルマリン固定、残りの半数は RNAlater 保存 (病理組織用及び RT-PCR 用)



(倫理面への配慮)

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。

### 【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。

#### ●高木 篤也

胎児発生毒性物質として BPA を対象に実験を実施した。BPA (1nM) を DMSO (final 0.1%) に溶解して、培地に添加した。ES 細胞は 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、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。

#### 委託研究:

ER レポーター遺伝子測定 -ER 系へ作用する化学物質検出法の検証データの収集-(委託先;財団法人 化学物質評価研究機構)

#### 対照物質

アゴニスト 陽性対照物質及びスパイク対照物質: 17 $\beta$ -Estradiol (E2、和光純薬工業)、アンタゴニスト 陽性対照物質: 4-Hydroxytamoxifen (OHT、Sigma-Aldrich)、細胞毒性対照物質: Digitonin (Dig、和光純薬工業)、媒体対照物質: Dimethylsulfoxide (DMSO、和光純薬工業)を使用した。

#### 細胞

HeLa-9903 細胞を住友化学株式会社よ

り入手し、実験に使用した。

HeLa-9903 細胞は、ヒト子宮頸がん由来細胞株にヒトエストロゲン受容体 $\alpha$  (hER $\alpha$ )を常時発現するプラスミド及びホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に hER $\alpha$  に対する応答配列が組み込まれたレポータープラスミドが同時に且つ安定的に組み込まれた安定形質細胞株である。

#### 試薬の調製

##### EMEM-10%FBS 培地

粉末培地(イーグル MEM ニュスイ、フェノールレッド 不含) 4.7 g、10% 炭酸水素ナトリウム 9 mL 及び 3% L-グルタミン 6 mL に精製水を加えて 500 mL とした(EMEM 基礎培地)後、Dextran coated charcoal (DCC)処理した牛胎児血清(FBS) 56 mL を加え、ろ過滅菌して使用した。

#### 化合物溶液の調製

各化合物は国立医薬品食品衛生研究所にて DMSO を媒体として 10 mM に調製された試料、あるいは DMSO に溶解しない場合は、水を媒体として 10 mM に調製された試料を用いた。

10 mM に調製された化合物をそれぞれの媒体にて 1/10 希釈を行い 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM 及び 10 nM とした。化合物は終濃度が 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM 及び 10 pM となるように培地に添加した(DMSO 終濃度: 0.1%)。媒体として水を用いた場合には、他の物質と同じ構成になるように同量の DMSO を同時添加した。

#### Steady-Glo Luciferase Assay Reagent の調製

Steady-Glo ルシフェラーゼ活性測定薬 (Steady-Glo Luciferase assay system, Promega) を使用した。Steady-Glo Luciferase Assay Substrate 1 vial に Steady-Glo Luciferase Assay buffer 1 vial 全量を直接加えて溶解した。

### ER $\alpha$ を介する転写活性化測定法(レポーター遺伝子アッセイ)アゴニスト検出系測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

細胞を測定用の 96 well プレートに播種 (10<sup>4</sup> cells/100  $\mu$ L/well)

↓ CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養 3 時間

↓ 化合物の添加

化合物終濃度: 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM [n=3]

媒体対照区: DMSO [n=6]

陽性対照区: 1 nM E2 [n=6]

↓ CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓ 各 well から培地を除去

↓ PBS (0.3 mM の MgCl<sub>2</sub> 含む)と Steady-Glo Luciferase Assay Reagent を 1: 1 で混和し、各 well に 50  $\mu$ L ずつ添加

↓ 10 分間室温で静置

化学発光測定装置 (TopCount NXT™, PerkinElmer)による発光測定(測定時間: 1 秒/well)

### Assay プレート上のサンプル配列

plate format に従い、被験物質、媒体対照区(DMSO)及び陽性対照区(1 nM E2)を配置した。

### データ解析

各濃度区で得られた発光強度(RLU)を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率(Fold induction)を求めた。同時に被験物質及び陽性対照区的全濃度区で得られた発光強度(RLU)から媒体対照区の平均値を差し引いた後、陽性対照区の平均値(通常、誘導活性がプラトーに達する 1 nM E2 を使用)で除し、相対転写活性化倍率(Relative transcriptional activity)を求めた。また、陽性対照区の最大転写活性化倍率(1 nM の E2)の 10%の値を与える濃度(PC10)及び 50%の値を与える濃度(PC50)

を 2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

PC10 が算出されない化合物は hE $\alpha$ アゴニスト 活性陰性(-)と判定した。

### ER $\alpha$ を介する転写活性化測定法(レポーター遺伝子アッセイ)アンタゴニスト検出系

#### 測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

細胞を測定用の 96 well プレートに播種 (10<sup>4</sup> cells/100  $\mu$ L/well)

↓ CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養 3 時間

↓ 化合物の添加

以下の培地中にはスパイク対照 E2 を終濃度 25 pM になるよう予め添加

化合物終濃度: 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM [n=3]

アンタゴニスト 陽性対照区: 1  $\mu$ M 4-Hydroxytamoxifen [n=3]

細胞毒性対照区: 100  $\mu$ M Digitonin [n=3]

スパイク対照区: DMSO (25 pM E2 のみ)[n=3]

以下の培地中にはスパイク対照 E2 を添加しない

媒体対照区: DMSO [n=6]

アゴニスト 陽性対照区: 1 nM E2 [n=6]

↓ CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓ 各 well から培地を除去

↓ PBS (0.3 mM の MgCl<sub>2</sub> 含む)と Steady-Glo Luciferase Assay Reagent を 1: 1 で混和し、各 well に 50  $\mu$ L ずつ添加

↓ 10 分間室温で静置

化学発光測定装置 (TopCount NXT™, PerkinElmer)による発光測定(測定時間: 1 秒/well)

### Assay プレート上のサンプル配列

plate format に従い、被験物質、アンタゴニスト 陽性対照区(1  $\mu$ M 4-

Hydroxytamoxifen)、細胞毒性対照区(100  $\mu$  M Digitonin)、スパイク対照区(DMSO (25 pM E2 のみ))、媒体対照区(DMSO)及びアゴニスト陽性対照区(1 nM E2)を配置した。

#### データ解析

被験物質及び各対照区的全濃度区で得られた発光強度(RLU)から媒体対照区の平均値を差し引いた後、スパイク対照区の平均値(25 nM E2)で除し、スパイク対照に対する相対転写活性化倍率(Relative transcriptional activity against Spike control)を求めた後、スパイク対照区の転写活性化倍率(25 nM E2)の 30%を阻害する値を与える濃度(IC30)及び 50%を阻害する値を与える濃度(IC50)を 2.5.3 同様に 2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

IC30 が算出されない化合物は hER  $\alpha$  アнтаゴニスト活性陰性(-)と判定した。

#### 細胞毒性試験

IC30 が算出された物質については、細胞毒性による False positive 反応を回避するため、水溶性ホルマザン WST-8 を用いた WST-8 assay により細胞毒性を観察し、細胞生存率が 80%未満になる細胞毒性が認められた濃度区は、hER  $\alpha$  アнтаゴニスト活性の IC30 及び IC50 の算出から除外した。

#### ●藤本 成明

1) 動物: 生後 5 日目の雄性 C57BL マウスを Charles River Japan より購入した。生後 6 日及び 16 日目で、TCDD を 10、1000 ng/kg b.w. 投与、6 週齢で屠殺し、前立腺組織を、腹葉 (VP)、背側葉(DLP)、前葉(AP)を解剖学的に区別して保存した。また、ラット分泌タンパク質同定のために、F344 雄ラットを Charles River Japan 購入し、11 週齢で屠殺、前立腺の腹葉(VP)、側葉(LP)、背葉(DP)、前葉(AP)を区別して取り出した。各葉に切り込みを

入れて内容物を遠心分離に抽出した。

2) mRNA 定量: 前立腺の各組織から 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  $\beta$  actin の mRNA を定量した。

3) ラット 前立腺分泌タンパク質の同定: ラット各葉からの分泌物を pI レンジ 3-11 で等電点電気泳動し、5-20%グラジエント SDS-PAGE で二次元目泳動を行った。Sypro Ruby 染色によりタンパク質を検出し、スポット部のゲルを切り出した。各ゲル片からタンパク質を抽出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF 質量分析機によりマスペクトルを測定し、peptide mass fingerprinting 法を適用してタンパク質を同定した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、苦痛の少ない方法を用いるなど、本大学の動物取り扱い倫理規定に沿って行った。

#### ●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、培養系に移した。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、プトレッシン、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、10cm シャーレ(ヌンク社)に  $10^6$  個/6ml の密度で生細胞を播種した。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した。

<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 を超音波処理にて破碎し、100-400bp の断片とし、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。詳細は本操作をキット化している 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は、Affymetrix 社の TAS(Tiling Analysis software)と IGB(Integrated genome browser)を用いた解析に加え、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。

#### 委託研究:

##### 1) AhR、AR、TR 系レポーター遺伝子測定-AR を介する作用に関する研究-(委託先; 大塚製薬株式会社)

##### AR レポーター遺伝子アッセイ(安定発現細胞株)

AR-EcoScreen™細胞<sup>(1)</sup>を  $1 \times 10^5$  cell/mL の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 90  $\mu$ L/well で撒いた。このときの培養液は Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL), 5% Charcoal/Dextran treated FBS (Hyclone) を用いた。翌日(約 20 時間後) サンプル及び標準物質をプレートフォーマットにしたがって各ウェルに 10  $\mu$ L 加え CO<sub>2</sub> インキュベーターでさらに培養した(約 20 時間)。翌日、ルシフェリン溶液 (Steady-Glo™: Promega) を加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、ルシフェラーゼ誘導活性を発光

強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。AR アンタゴニストアッセイでは、AR アゴニストである 5- $\alpha$ -dehydrotestosterone(DHT)をあらかじめ細胞培養液に加えておき(終濃度  $5 \times 10^{-10}$  M)、被験物質によるアンタゴニスト活性を評価した。サンプル調製プレートから AR-EcoScreen™細胞に各ウェル 10  $\mu$ L 加え CO<sub>2</sub> インキュベーターでさらに培養した(約 20 時間)。翌日、ホタルルシフェリンおよびウミシイタケルシフェリン基質溶液 (Dual-Glo™: Promega) を測定マニュアルに従って加えて約 10 分間振とう攪拌して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

##### AR、GR レポーター遺伝子アッセイ(一過性発現系)

CHO-K1 細胞( $1 \times 10^5$  cells/ml) を 96 ウェルプレートに 84  $\mu$ L/well で播種した。培養メディウムは、Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL), 5% Charcoal Dextran treated FCS(Hyclone)を用いた。翌日、プレート 1 枚あたり、AR レポーター遺伝子アッセイでは、pZeoSV2 AR 124ng、pIND ARE B10-luc 6.2  $\mu$ g、GR レポーター遺伝子アッセイにおいては、pcDNA GR 124 ng、pIND ARE B10-luc 6.2  $\mu$ g を希釈トランスフェクション試薬 (FuGene6 (ロッシュ) 18.6  $\mu$ L を Medium(血清無添加) 620  $\mu$ L で希釈したもの)に加えて、96 ウェルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6  $\mu$ L 添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。培養 6 時間後にサンプル、及び各コントロール物質を各ウェルに 10  $\mu$ L 添加して、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した(約 20 時間)。翌日、ホタルルシフェリン(Steady-Glo™)をマニュアル