

に従って添加後、10 分間振とう混和して細胞を溶解して、ルシフェラーゼ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。

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-(委託先; 株式会社 医薬分子設計研究所)

1. AR 結合強度予測システム

一般に蛋白構造は、リガンドの結合に伴って一部の側鎖コンフォメーションが変化する。Induced fit と呼ばれる現象で、リガンドとの相互作用をより安定化するための動きである。時には主鎖コンフォメーションまで変化する。同じ標的蛋白であっても、どのようなコンフォメーションをとった構造を用いるかで、in silico スクリーニングの精度・成果が左右される。AR 結晶構造に対して、幾つかのリガンド(いずれもアゴニスト) が結合した複合体構造が解明された現在では、in silico スクリーニングにより適した蛋白コンフォメーションを選んだり、リガンド結合部位周辺の動きに関する知見をもとに戦略を立てることがやりやすくなった。予測モデルには、昨年度の検討結果から公開されている AR 結晶構造のうち、dihydrotestosterone (DHT)、EM5744 が結合した2 つの複合体構造を利用した。これらの結晶構造におけるリガンド結合キャビティは他の構造に比べて比較的広く、多様な化学物質のドッキングが行ないやすいと考えられる。

次節に述べる方法で、それぞれの AR 立体構造の準備を行なった。また、3 節に述べる方法で、予測システム構築のためのトレーニングセット化合物(98 個) の立体構造準備も行なった。次に、4 節で述べる方法で、2 つの AR 構造に対する各化合物の自動ドッキング計算を実施して、それぞれの安定複合体モデルを生

成した。その後、蛋白構造の動きを考慮した複合体構造のエネルギー極小化と詳細なエネルギー解析を経て、結合性予測式導出のための重回帰分析に使用する各独立変数の値を、各々の AR 構造に対して得た。最後に、重回帰分析により各々の AR 構造に対する結合性予測式を得た。

2. 3 つの AR 構造の準備

2 つの AR 構造- DHT 結合、EM5744 結合- は、それぞれ分解能 2.07 Å、1.65 Å で解析され、Protein Data Bank (PDB) にて公開されている。PDB の ID は、順に 1t63, 2pnu である。PDB 中の蛋白質座標に水素を付加し、蛋白構造最適化プログラム Bluto で水素構造の最適化を行なった後、AMBER 原子タイプ・原子電荷の割り振りを行なった。さらに自動ドッキングプログラムを実行する際に必要な水素結合情報を割り振った。

各々の複合体結晶構造から、結合しているリガンド分子を取り除き、リガンド分子が結合していたポケット(結合ポケット) を、低分子化合物をドッキングさせる領域(ドッキング対象領域) として指定した。ドッキング対象領域内で、自動ドッキング計算の際にリガンドとの相互作用計算に用いる格子点データをプログラム CALGRID により計算した。

3. トレーニングセット化合物の立体構造の準備

AR 結合強度予測システム構築に用いるトレーニングセット化合物は、財団法人化学物質評価研究機構(CERI) により AR 相対結合強度(RBA) が測定され、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE) により一般に公開されている低分子化合物より選んだ。今回検討する AR 結晶構造のリガンド結合部位にドッキング可能なサイズ・構造(すなわち結晶構造とは大きく異なる induced fit を起こす可能性が低い構造) の中から、結

合強度や骨格のパリエーションに配慮して、98 化合物を選択した。一部、AR に結合しない物質 (non-binders) も含まれている。

これらの化合物の平面化学構造式を、低分子構造三次元化プログラム Key3D により、原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造に変換した。さらに自動ドッキングプログラム ADAM を実行するために必要な水素結合情報、コンフォメーション探索時の結合回転情報や芳香族環の位置情報などを付加した。

4. AR と各トレーニングセット化合物のドッキング計算

蛋白質-リガンド自動ドッキングプログラム ADAM を用いて、2 つの AR 構造について、計算対象化合物の安定な複合体構造モデルを生成した。続いて、複合体モデルが得られた化合物について蛋白質-リガンド複合体構造最適化プログラム Bluto を使用して、複合体のエネルギー極小化を行なった。最後に蛋白質-リガンド複合体における結合自由エネルギー解析プログラム GenB ならびに複合体形成に伴う水素結合・水和の変化を見積もるプログラム Desolv を用いて複合体安定化に寄与すると考えられる各種エネルギー項の計算を実行した。

5. AR 予測システムを利用した in silico スクリーニング

昨年度構築した AR 予測モデルを用いて、国立医薬品食品衛生研究所より供与された約 3000 件の化合物リストについて、昨年度の検討結果から 2 ステップモデルによる in silico スクリーニング計算を実施した。すなわち、まず 1t63 構造について安定複合体構造の計算を行い、安定複合体が得られたものについては予測計算を実施し、安定複合体が得られなかったものについてはさらに 2pnu 構造について予測計算を実施し

た。予測計算の方法は、予測式構築や検証計算の際と同様である。

●藤井 義明

APC^{min}/+、APC^{min}/+・AhR(+/-)、APC^{min}/+・AhR(-/-)マウスを用いて腸における癌の発生とβ-カテニン、cMyc、cyclinD1 の発現を定量 RT-PCR と免疫組織学的方法で調べて、癌の発生とこれら癌遺伝子の発現の神経系形成・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関係を明らかにする。Pai2 の発現と機能については、Pai2 遺伝子のプロモーター配列を Luc 遺伝子に結合したりポーター遺伝子を作製し、エンハンサー領域を決める。エンハンサー領域への転写因子の結合などは Chip 法などで検討する。

●西川 淳一

細菌感染モデルマウスでの CYP の発現

化学物質としては、AhR のリガンドとして Benzo[a]pyrene (100 mg/kg) を、CAR のリガンドとして TCPOBOR (3 mg/kg) を、PXR (SXR のマウスオルソログ) のリガンドとして Pregnenolone-16- carbonitrile (50 mg/kg) を用いた。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 時間後に化学物質を腹腔内投与した。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、各種 CYP 遺伝子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、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

Real-time PCR

SYBER Primer Ex Taq II (タカラバイオ) を用い、初期変性後 (95°C, 10sec)、各々のプライマーに応じたアニーリング温度で PCR

を行った。定量は ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)を用いて行った。

SXR、CAR、AhRの転写活性化能の測定

10%FBSを添加したEMEM培地中、37℃、5%CO₂の条件で培養した肝腫瘍細胞株HepG2を、遺伝子導入24時間前に、96穴細胞培養プレートに移した。

この細胞に、AhR、CAR又はSXR発現プラスミドをルシフェラーゼレポータープラスミドと共に、FuGENE6 (Roche)を用いて遺伝子導入した。24時間後に、Benzo[a]pyrene、TCPOBOP又はRifampicinを添加し、24時間後に細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、遺伝子導入効率を補正するために、β-galactosidase発現プラスミドも同時に遺伝子導入し、その活性を測定した。

【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。

●井上 達

経済協力開発機構 OECD と世界保健機関 WHO で進められている試験法の開発や基礎研究の推進の課題と、本邦における内分泌かく乱化学物質問題に関する調査・研究とが、スムーズな国際相互協調の下で推進せられるよう、当研究班を通じて必要な情報収集を行い、また、本邦としての独自の情報の発信や提案を行うことが当研究の課題である。

諸国際組織における現段階での研究動向を主として文献的に整理すると同時に、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。

●小野 敦

化学物質の有害作用である内分泌かく乱性の検出・評価手法について、検証・ガイドラインを進めるために OECD-EDTA のもと

に設置された検証管理グループのうち非動物試験を担当する VMG-NA (非動物試験検証管理グループ) の第6回会議および併せて開催された ED-QSAR グループ会議に参加し、我が国で開発・検証が進められている評価手法について報告を行うとともに、諸外国における試験・評価法開発に関する国際動向の調査および関連する各国専門家と今後の方向性について議論した。

(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う。

・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、財団法人 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重な審査、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施する。

・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

以下に分担班員の研究結果の概要を記載する。

【総括】部門

●小野 宏

OECD 対応を含む内分泌かく乱化学物質問題対応の国際及び国内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) 2008年3月に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」に参加し、本研究班において行われてきた齧歯類一生涯試験の開発の現状について述べた。この内容は、「内分泌かく乱化学物質問題の現状と今後の取組 中間報告書 追補その3」として文書にまとめられ、総合評価スキームの構築に用いられる。

(2) OECD の設置する EDTA (内分泌攪乱

物質試験法特別研究班) 及び、その下部に位置する VMG-Mammalian (哺乳類試験検証班) に参加し、先行研究班の成果である子宮肥大試験が OECD 試験法ガイドラインに採択され(2007年10月、TG440) 本邦がリードラボラトリーをになった。成果を提供した Hershberger 試験(去勢動物法、未成熟動物法)についてもガイドラインの最終案が提案され、2009年4月の National Coordinators Meeting (WNT 21) で承認される見込みである。

(3) OECD において、既存の試験法である「二世世代生殖毒性試験(TG416)」を改造して、「延長一世代生殖毒性試験 Extended One Generation Reproductive Toxicity Test」とする策定に関わり 2008年10月15~17日パリにおいて開催された専門家会議及び、事後の電話会議に参加した。この試験系は、当班が目指している「齧歯類一生涯試験法」と近い物となる可能性がある。

●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 及び DES に引き続き、(2) GEN 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(委託先: 財団法人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;

【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 のマウス妊娠期・授乳期暴露をモデルとし、記憶保持能力の責任部位である海馬領域に着目した次世代の中枢神経系に及ぼす影響、マウス及びラットの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（シェーグレン症候群）モデルマウスを用いての、化学物質暴露による自己免疫発症の有無、及び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及び遺伝子の検討を実施することとした。

内分泌系に関しては、齧歯類の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。ES細胞及び胚様体(EB)を用いたBPAの発生初期への影響、マウス新生児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の抗炎症作用と大腸発がん抑制作用の分子メカニズムを解析すること、化学物質による免疫系活性化が、薬物受容体の転写活性化能と体内薬物動態に及ぼす影響について検討すること、とした。

【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】部門では、子ども健康問題を中心としたOECD/WHO関連及び、化学物質の有害性検出手法に関する国際動向調査研究を推進する。

（2）委託試験；ラットを用いたBPA、DESおよび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

前年度実施したDES追加確認実験の結果の集計・解析を実施中である（委託先：パイオラボ株式会社）。

本年度の研究は、同様のプロトコールによるGENの性周期に対する遅発性影響を確認する目的で現在解析中である。

【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

●鈴木 勉

BPAのマウス周産期暴露が次世代の脳高次機能に及ぼす影響を記憶保持能力及びエピジェネティック制御の関与を含め、多角的に検討した。

平成20年度は、1) BPAをマウス胎生期に曝露し、胎生14日目の全脳からDNAを抽出しGFAP転写開始部位付近のメチル化を検討した結果、対照群との間に差は認められなかった。2) BPAの胎児期および授乳期曝露が成熟マウスの海馬におけるリン酸化HDAC5の発現の著明な増強を誘発した。

●宮川 宗之

ラット及びマウスの経胎盤・経母乳EDCs暴露による次世代認知機能への影響を「タイムアウト付交替型混合FR DROスケジュール」によるスケジュール制御オペラント行動(SCOB)を用いて検討し、試験法の有効性及び妥当性の検討・確認を行う。

平成20年度は、陽性対照候補物質6-n-propyl-2-thiouracil (PTU)をラット経胎盤・経母乳暴露した結果、雄性児の学習習得曲線及び短期記憶の保持曲線に明確な用量依存的影響が示された。現在、薬理学的負荷試験を実施中で終了は年末予定。一方、マウスの実験は、現在学習訓練を実施中であり、終了は次年度5月頃となる予定。また、早期老化により認知機能に異常が生じるとされるSAMPマウスを用いた行動測定を実施したが、老化による短期記憶への影響を本試験法により明確に示すことはできなかった。

●今井 清

ラットの周産期DES暴露による雌性児の遅発性周期異常の誘発と視床下部前腹側室周囲核との関連を明らかにする。

平成20年度は、低用量DESをラット経胎盤・経母乳暴露し性周期検査を、雌性児

の生後 7 週目及び 29 週目の脳及び下垂体を病理組織学的に検査した。その結果、早期より持続発情を呈した動物の下垂体前葉において I 型細胞の減少がみられ、ER α 及び FSH 免疫組織化学染色において I 及び II 型細胞ともに陽性反応の減弱がみられた。一方、前腹側室周囲核の形態学的変化及び ER α 陽性細胞数は溶媒対照群との間に差はみられなかった。

2) 免疫

●林 良夫

シェーグレン症候群疾患モデル 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、EDCs 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。

平成20年度は、生体内で女性ホルモンが著しく変動する妊娠期にダイオキシン (TCDD) を NFS/sld マウスに暴露し、母体側の免疫学的影響及び自己免疫病変の発症との関係を経時的に検討した。その結果、妊娠後期の投与により 6ヶ月齢で、唾液腺に限局した炎症性病変が観察された。胸腺組織において自己抗原発現に重要とされる転写因子 Autoimmune regulator (AIRE)mRNA の発現低下、末梢 T 細胞におけるサイトカイン分泌異常がみられた。

●武吉正博

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有効な分子候補を培養細胞を用いて探索する。

平成 20 年度は、ヒト単球系細胞株に非感受性物質、軽度及び強度感受性物質を暴露した実験系における遺伝子発現解析を行った。その結果、昨年度探索した初期免疫応答能を評価するための有効なタンパク質と共通の発現変動を示す遺伝子は 3 種であり、更に、新たに免疫機能に係わる 23 遺伝子を取得した。

3) 生殖器

●長尾哲二

EDCs のマウス胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響を発生生物学的に検討する。

平成 20 年度は、1) DES、Flutamide (FLU) 及び BPA のマウス胎生期暴露による胎児期の精巣下降の制御に関連する遺伝子および胎児精巣生殖細胞における DNA メチル化酵素遺伝子の発現を解析した。その結果、DES は精巣導帯の発生・発達に重要な役割を担う Insl-3 の、BPA は P450scc の mRNA の発現を抑制した。2) DES のマウス胎児期投与は胎児の精巣における DNA メチル化酵素遺伝子 mRNA の発現パターンに変化を及ぼした。

●太田 亮

EDCs の影響を、生殖器系の老化現象のみならず、神経・行動や免疫系についても網羅的に検出可能な方法を考案し、それを基にラット及びマウスを用いた一生涯試験のプロトコル案を作成した。

平成 20 年度は、DES をマウス新生児期に強制経口した。雌では、遅発性に体重の増加、膣開口時期の遅延及び性周期異常が、雄では、遅延性に精囊及び凝固線の臓器重量の低値、及び抗体産生能の低下がみられた。

●松島裕子

低用量 BPA のラット経胎盤・経母乳暴露により雌性児に遅発性に性周期異常が誘導されるメカニズムを明らかにする。

平成 20 年度は、BPA を暴露した雌性児において、遅発性に膣開口日の遅延、卵巣の黄体形成不全、乳腺の terminal end buds の膨大がみられた。

引き続き、経時的に採取した視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣、血清について検査を実施する。

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】 部門

●高木篤也

ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等への分化誘導が可能な事から、細胞分化の解析に用いられ、*in vivo* 解析の難しい発生初期への内分泌かく乱化学物質による発生・分化への影響を検討する試験系として有用である。

平成 20 年度は、BPA の ES/EB 系の遺伝子発現に及ぼす影響を同様にマイクロアレイにて検索したところ、神経幹細胞のマーカーの増加傾向が認められた。また、心筋分化マーカーの発現が対照群に比較して 1 日程遅れて発現した。核内受容体の *androgen receptor* が培養 1-2 日目で、有意に高かった。また、アンドロゲン・エストロゲン代謝にかかわる遺伝子の増加が初期に認められた。その他、BPA により影響を受ける遺伝子を同定した。

委託研究:

ER レポーター遺伝子測定(委託先; 財団法人 化学物質評価研究機構)

[OECD テストガイドライン化に係わるバリデーション研究] ヒトエストロゲン受容体 α (hER α) を組み込んだヒト由来細胞株(HeLa-9903 細胞)を用いて、50 化合物について hER α アゴニスト及びアンタゴニスト活性を測定した。その結果、hER α アゴニスト活性として PC10 が算出されたもの 11 物質、さらに PC50 も算出されたもの 3 物質、hER α アンタゴニスト活性として IC30 が算出されたもの 7 物質、さらに IC50 も算出されたもの 1 物質をそれぞれ同定した。

●藤本成明

平成 20 年度は、TCDD 及び DES のマウス新生児期投与の成熟後の前立腺のアンドロゲン応答性遺伝子への影響について検索し、PSP94、*defensin β* 、PCP4 遺伝子の異常亢進を認めた。また、ラット前立腺の分泌タンパ

ク質を同定し、ラット、マウス及びヒトとの相同性について検討した結果、PSP94、*immunoglobulin binding protein* 類似タンパク質、*preroxiredoxin 6* 等が共通に発現していることが確認された。

●五十嵐勝秀

神経幹細胞の成熟における DNA メチル化制御機構を解析する。

平成 20 年度は、神経幹細胞には転写因子 Sox2 タンパク質が特異的に発現することからその遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、胎生 10 日及び 14 日の終脳から神経幹細胞及びアストロサイトを採取し、ゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に解析した。その結果、胎生 14 日の神経幹細胞及びアストロサイトでは 10 日に比べ DNA メチル化領域の増加がみられた。

委託研究:

1) AhR、AR、TR 系レポーター遺伝子測定(委託先; 大塚製薬株式会社)

[OECD テストガイドライン化に係わるバリデーション研究] ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイ法を開発して、核内受容体に作用する化合物の評価を行っている。70 化学物質について、アンドロゲン受容体(AR)に作用する化合物の評価を行った結果、6 化合物(prednisolone、piperine、4-aminoazobenzene、resveratrol、mifpristone (RU486)、dibenzoylmethane) に弱い AR アゴニスト活性を見出した。

2) ホルモン活性予測計算(委託先; 株式会社 医薬分子設計研究所)

[OECD QSAR バリデーション研究関連] 核内受容体結合活性を有する化合物の高速スクリーニング手法として、自動ドッキング法 ADAM を核とした *in silico* スクリーニングにより標的核内受容体の三次元構造情報に基づく、化学物質の結合様式の推定ならびに結合性

予測を行なった。AR への結合強度の予測計算を実施する化学物質として、約 3,000 化合物の予測計算を実施した結果、2132 化合物について結合予測値が計算された。

●藤井義明

AhR の大腸癌抑制と抗炎症作用の分子メカニズムについて検討した。

平成 20 年度は、1) APC と AhR の各々の欠失マウスを用いて、腸における癌の発症と b-カテニンの発現を検討した。その結果、APC 及び AhR の各々の単独遺伝子欠損マウスに較べて、2 重遺伝子欠損では安定化・蓄積した b-カテニンが癌の発生に加算的に働くことが明らかにされた。また、2) AhR 欠失による易炎症性は、IL-1b の分泌抑制に関与する Pai2 と Bcl2 遺伝子発現の低下によることが明らかとなり、即ち、AhR は Pai2 遺伝子の転写活性化因子として働いていることが示唆された。

●西川淳一

微生物感染やアレルギーにより免疫系が活性化された状態と平常時との化学物質の体内動態の違いを明らかにすることを目的とする。

平成 20 年度は、細菌感染のモデルとしてリポ多糖類(LPS)を投与したマウスを用い、薬物受容体 SXR、CAR、AhR の標的遺伝子の発現誘導を検討した結果、Benzo[a]pyrene による CYP1A1 と CYP1A2 の発現誘導、及び TCPOBOP による CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55 の発現誘導が LPS 投与により顕著に抑制された。更に、培養細胞系で免疫系制御因子 NFkB を過剰発現させたところ、薬物受容体の転写活性化能が抑制されることが示された。

【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

●井上 達

平成 20 年度は、欧州委員会(EC)、世界保

健機関・化学品安全計画 WHO/IPCS、経済協力開発機構 OECD (環境・健康・安全性部門)などを中心に、それらから報告されている EDCs 研究活動の現状をまとめた。これにより、あらたに明らかになった低用量問題での今後の研究の必要性を中心に、諸情報をさらに整理し、本邦として取るべき立場を考察した。

●小野 敦

OECD では、化学物質による内分泌かく乱性の問題に対応するため、内分泌かく乱物質の試験・評価プログラムタスクフォース(EDTA)のもとに 3 つの検証グループ(VMG)を設置し、国際的な枠組みでの試験法のガイドライン化が進めている。本研究では、高感受性集団に対する有害性検出手法について、関連する国際動向の調査を行い、今後の開発方針を検討する目的で、OECD-EDTA における第 6 回 VMG-NA(非動物試験検証管理グループ)会議および ED-QSAR グループ会議に参加し、我が国で開発・検証が進められている手法について報告を行うとともに、諸外国における試験・評価法開発に関する国際動向の調査を行った。

D. 考察

本研究の特色は、先行実施された「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」の策定、受容体原性毒性に基づくと理解される低用量影響の確認、「確定試験」としての「齧歯類一生涯試験法」の開発、受容体原性毒性メカニズム研究、催奇形性メカニズム研究の成果と方法の一部を継承し、また、平成 17 年度より実施された「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究-恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究-(H17-化学一般-001)」の成果を最大限に利用し、当記目的達成のために、特に受容体原性毒性に関わる分子生物学的検討を通しての研究を実施し、統合する点にある。

本研究班は、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、【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部門を置き研究を開始した。

【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】では、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価するための手法を確立する。

神経・行動試験系については、神経障害性に関して必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定されたため、本研究班では、高次行動異常を当面の焦点として、齧歯類胎生期・新生児期暴露をモデルとして、記憶保持能力の責任部位である海馬領域に着目した次世代の中樞神経系に及ぼす影響とイピジェネティクス制御の関係を含め多角的に検討したこと、認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響を検査する行動試験の導入を進めた。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル（人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル）の改良、初期免疫応答、特に抗原提示過程に係わるタンパク質と共通の発現変動を示す遺伝子の同定、により化学物質による自己免疫及び初期免疫応答能の修飾を解析した。

内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、齧歯類周産期のEDCs暴露により早発閉経、内分泌系腫瘍発生率の増加等、成熟後の遅発性影響の解析を行った。本研究により、一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於ける内分泌かく乱作用を考慮する必要性が示されたと同時に、この方向性に沿って引き続き網羅的な確認を加えつつ研究を進めることで、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対

応可能な確定試験を確立することが出来る見通しが立ったと考える。

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】では、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。

胎生期初期影響のメカニズム情報提供支援体制としての胚性幹細胞（ES細胞）の*in vitro*での多分化能に対する影響解析研究としてES細胞及び胚様体のBPA影響遺伝子を同定、マウス新生児期前立腺のアンドロゲン応答性とエストロゲン受容体の交絡解析、マウス神経幹細胞のアストロサイト遺伝子プロモーターの脱メチル化、AhRの大腸ガン抑制及び抗炎症作用を確認した。免疫系活性化による薬物代謝酵素誘導の抑制を確認した。

【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】では、OECD及びWHO等の国際機関に於ける動向と同調するため、OECDとWHOで進められている基礎研究情報収集及び化学物質暴露における高感受性集団に対応した応有害性評価手法研究の国際動向調査を行うことより評価スキームの確立に資する。

本研究により最先端の分子生命科学の成果と、新評価法開発の成果から高感受性集団に対する有害性評価のための総合的大綱の策定が見込まれる。

少子高齢化が進み、次世代の担い手の確保と、クオリティ・オブ・ライフ（QOL）の向上、社会保障上の負担軽減の一助として、子どもと老人からなる高感受性集団の保護の重要性の認識が今後更に増すものと考えられる。他方、高度先進工業化による新規高性能マテリアルの開発と実用化は、多種少量生産化合物による国民の暴露の機会を増加させると考えられる。暴露事故の未然防止は産業経済活動の健全成長に大きく貢献するものであるが、特に低用量問題を含む高感受性集団への配慮は厚生労働のみならず経済の重要課題となる。本研究の

目標とする高感受性有害性総合評価大綱の策定は、暴露を受ける側と暴露する物質の側の両者の多様化という近未来特性に照らし、国民の安全性確保及び経済活動の健全な発展に大きく貢献すると期待される。

E. 結論

最先端分子生命科学研究及び評価法開発の成果から、高感受性有害性総合的大綱の策定の方向性と基盤が形成され、本研究の継続が今後の国民の安全性確保及び経済活動の健全な発展に貢献するものと期待される。

F. 健康危険情報

平成 20 年 4 月 28 日付で厚生労働省健康危機管理調整官宛健康危機情報の通報を行った（グレード B 情報）。

「研究対象としているホルモン様作用性化学物質のうち、低用量の Bisphenol A (BPA) において、妊娠母ラットに対する周産期経口曝露（妊娠 6 日目～離乳（生後 20 日目）まで）が、雌性児動物の成長後に遅発影響としての有害性を発揮することが示唆された。」

これは、次の研究結果を基にして行った。
（1）菅野分担研究者による委託研究（財・化学物質評価研究機構）：母ラットに BPA を投与、5～50 µg/ka/day 群で、出生雌ラットの性周期の乱れが生後 7 ヶ月より観察された。
（2）その再試験による確認。
（3）宮川分担研究員による、スケジュール制御オペラント行動試験において、BPA を混餌投与（0.33～33 ppm；25～250 µg/kg 相当）した母ラットから生まれた児では、短期記憶過程への影響は認められなかったが、学習習得の遅延が認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shirota M, Seki T, Tago K, Katoh H, Marumo H., Furuya M, Shindo T, Ono H: Screening of toxicological properties of 4-methylbenzoic acid by oral administration to rats. Journal of Toxicological Sciences (2008), 33: 431 – 445

2. 学会発表

1) 太田 亮、永田伴子、丸茂秀樹、大向英夫、宮原 敬、小野 宏：Sprague-Dawley ラットの生存日数と腫瘍発生に及ぼす新生児期 diethylstilbestrol (DES) 曝露の影響。日本内分泌攪乱化学物質学会第 11 回研究発表会、2008 年 12 月（東京）要旨集 131 ページ

2) 太田 亮、宮原 敬、又吉 健、大向英夫、小野 宏：新生児の低用量 DES 曝露が及ぼす加齢雌ラットの生殖系への長期的影響。日本内分泌攪乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006 年 11 月（東京）要旨集 174 ページ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

Non-RI LLNA法の感度上昇法

出願番号：特許出願2004-230151

公開番号：特許公開2006-42702

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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

研究分担者 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

研究要旨

先行する2つの研究班、即ち、【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【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）】の成果を基盤とし、それら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3部門を置く。第1の【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】は、恒常性維持機構の内容に沿い、更に「神経・行動」、「免疫」、「生殖器」の3要素について、先行研究班の成果である一個体の受精、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」の強化拡大を図る。第二の【有害性発現分子メカニズムの解明研究】では、平行して実施中の「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」の基礎研究とは重複しない実質的研究課題、及び評価法開発を前提とした研究課題を推進する。第三の【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】に於いては、子ども健康問題を中心としたOECD/WHO関連及び、化学物質の有害性検出手法に関する国際調査研究を推進する。

低用量影響研究については、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良を含む「齧歯類一生涯試験法」の開発を進めるにあたり、BisphenolA (BPA)、Diethylstilbestrol (DES)の低用量影響の確認試験に続き、エストロゲン受容体に対する部分作動物質の代表として Genistein (GEN)についての低用量影響の試験を実施した。また、これらの成果の一部をOECDの改良一世代試験の検討資料として提供した。

A. 研究目的

厚生労働省の内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会に於いて策定された試験スキーム（スクリーニング試験系及び詳細試験）に則り、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（内分泌かく乱化学物質；EDCs）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確

定試験法を開発する。

その一環として、未だ確立されていない低用量域の EDCs の生体影響を評価する検出指標、試験方法のひとつの可能性として、EDCs のラット子宮内・経乳汁暴露によって誘導される雌出生仔の遅発性の性周期異常に焦点を当て、これが低用量影響を検出する検査項目になり得るかを検討する。

B. 研究方法

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(Fig. 1)。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組みを行うと共に、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 及び DES に引き続き、(2) GEN 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の追加確認実験を実施した(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

【 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
- 化学物質の周産期暴露及び in vitro 暴露による初期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の遅発性障害の研究

【 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 κ 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

(2) ラットを用いた GEN の子宮内・経乳汁暴露による晩発影響についての確認試験

平成 16 年度の研究において、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仔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唆された。

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、得られた雌出生仔の性周期を最長 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の DES の暴露によっても認められるかを確かめる試験を行った。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)。その結果、器官重量では、雄の 0.2、2 および 20 ng/kg 群で肛門挙筋および球海綿体筋の絶対重量が低下した。相対重量では変化は認められないもののこれらの骨格筋はホルモンの蛋白質同化作用の指標であり、DES 投与の影響を示唆するものと考えられた。3 ヶ月齢時の雌の解剖で Cleft phallus が 0.2、2 および 20 ng/kg 群でそれぞれ 2、1 および 2 例に認められ DES 投与の影響が示唆された。性周期の観察では、連続発情を示す異常性周期の発生が DES の 2 および 20 ng/kg 群の雌出生仔で早まる傾向が認められ、特に 20 ng/kg 群で顕著であった。更に、DES の追加確認試験を実施した(委託先:バイオラボ株式会社)。

本年度は、GEN の低用量影響の確認試験を行った。1000 μ g/kg/day を高用量とし、以下 200 μ g/kg/day を中用量、及び 40 μ g/kg/day を低用量に設定した。DES 0.02 μ 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)。

C. 研究結果

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

については、所定の成果を各研究分担者から得て、内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会等への適切な反映を行う。

(2) ラットを用いた BPA、DES および 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

前年度実施した DES 追加確認実験の結果の集計・解析を実施中である(委託先:バイオラボ株式会社)。

本年度の研究は、同様のプロトコールによる GEN の性周期に対する遅発性影響を確認す

る目的で現在解析中である(委託先:(財)食品薬品安全センター秦野研究所)。

D. 考察

少子高齢化社会が進む中、子供と老人が高感受性集団であるとの認識から、それらの保護の重要性の認識が今後更に増すものと考えられる。高感受性集団に対する配慮は厚生労働上のみならず経済上の重要な課題となる。本研究の目標とする高感受性有害性総合評価大綱の策定は、暴露を受ける側と日々生み出される新規物質を含む暴露する側の両面の近未来特性から、要求度の高いものと考えられ、今後の国民の安全性確保及び経済活動の健全な発展にも貢献するものと見込まれる。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質問題の本質的問題である受容体原性毒性メカニズムに基づく考察されるところの低用量影響が、幾つかのエンドポイントに対して、明確に再現性を以って示されることが改めて確認された。このような影響が確認可能な *in vivo* 試験系を取り揃え、吟味の上、広範に実施可能な試験プロトコールとして一般化し、ガイドライン化することが可能であることと結論される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sanosaka, T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K., Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells., *Neuroscience*. 2008 Aug 26;155:780-8

John Peterson Myers, Frederick S. vom Saal, Benson T. Akingbemi, Koji Arizono, Scott Belcher, Theo Colborn, Ibrahim Chahoud, D. Andrew Crain, Francesca Farabollini, Louis J. Guillette, Jr., Terry Hassold, Shuk-mei Ho, Patricia A. Hunt, Taisen Iguchi, Susan Jobling, Jun Kanno, Hans Laufer, Michele Marcus, John A. McLachlan, Angel Nadal, Jörg Oehlmann, Nicolás Olea, Paola Palanza, Stefano Parmigiani, Beverly S. Rubin, Gilbert Schoenfelder, Carlos Sonnenschein, Ana M. Soto, Chris E. Talsness, Julia A. Taylor, Laura N. Vandenberg, John G. Vandenberg, Sarah Vogel, Cheryl S. Watson, Wade V. Welshons, and R. Thomas Zoeller, Why Public Health Agencies Cannot Depend upon 'Good Laboratory Practices' as a Criterion for Selecting Data: The Case of Bisphenol A doi: 10.1289/ehp.0800173 (available at <http://dx.doi.org/>) Online 23 October 2008

vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, LeBlanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT., Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human ~~Reprod Toxicol (2007) 24:178-98.~~

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM., In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. (2007) 24:178-98.

bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* (2007) 24:178-98.

2. 学会発表

荒瀬 栄樹、石井 健一朗、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、萱野 純、杉村 芳樹、ビスフェノールA 経胎盤投与によるマウス泌尿生殖洞での SF1 発現誘導、第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008 年 4 月 25-27 日、横浜

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、萱野 純、エストロゲン受容体(α型)ノッ

クダウンマウスの神経行動解析、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京、ポスター

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

【 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

研究分担者 鈴木 勉 星薬科大学 薬品毒性学教室 教授

研究協力者 成田 年 星薬科大学 薬品毒性学教室 准教授

研究要旨

Bisphenol-A (BPA) の慢性暴露により海馬歯状回において神経新生の低下、及び海馬組織においてアストロサイトの活性化が認められた。また、神経幹細胞への BPA 処置により神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導促進が認められた。一方、エピジェネティックな影響として、成体期海馬組織における HDAC5 の機能低下が認められた。これらのことから、BPA の慢性暴露により海馬神経新生の低下ならびにグリア細胞の発現異常が引き起こされることが明らかとなった。こうした検討には、エピジェネティックな遺伝子修飾も考慮する必要性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では、BPA の胎児期および授乳期慢性暴露による記憶保持能力を始めとした脳高次機能に及ぼす影響を、海馬神経新生および細胞分化決定、さらにはエピジェネティクス制御の関与も含め、多角的に検討した。

B. 研究方法

使用動物および BPA の慢性暴露

実験には雌雄 C57BL/6J 系マウスを使用した。BPA の慢性暴露は薬物混入試料法に従い、胎児期および授乳期に暴露し (0, 30ng, 2 mg /g of food)、離乳後は通常飼料にて飼育した。また、BPA を妊娠期に暴露し、胎生 14 日目の全脳を採取した。

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、Refinement、Replacement、Reduction の 3R 原則に基づいて遂行した。

Methylation-specific PCR (MSP)

BPA 暴露による 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 (Ser498)- 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。

C. 研究結果

1. BPA の胎児期慢性暴露による GFAP 遺伝子の DNA メチル化状態に及ぼす影響

BPA の慢性暴露による脳内グリア細胞分化に対する影響を詳細に検討する目的で、BPA を慢性暴露した胎生 14 日の全脳より DNA を採取し、MSP 法に従い、アストロサイト構成タンパク遺伝子である GFAP の転写開始部位付近の DNA メチル化状態について検討した。その結果、GFAP 遺伝子は、control 群、BPA 慢性暴露群共に高度にメチル化されており、両群間で差は認められなかった。しかしながら、BPA 慢性暴露により恒常的なグリア細胞の分化異常が引き起こされていることを考慮すると、BPA 慢性暴露は、グリア細胞分化に不可欠な因子群の DNA メチル化状態を非メチル化状態に移行する、いわゆる脱メチル化の時期に影響を及ぼす可能性が想定されるため、今後さらなる経時的な実験が必要である (Figure 1)。

2. BPA 胎児期および授乳期慢性暴露による海馬 p-HDAC5 免疫活性に及ぼす影響

一方、ヒストン修飾に関係するヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) の中でも、特に脳内に多く存在し、遺伝子の発現調節に関与するリン酸化 HDAC5 の発現について検討したところ、BPA 慢性暴露により、海馬全域においてリン酸化 HDAC5 免疫活性の著明な増強が認められた (Figure 2)。

D. 考察

これまでに研究者らは、BPA の胎児期および授乳期慢性暴露により、海馬 choline 作動性神経の発現異常に伴う記憶保持能力の低下や、dopamine D3 受容体機能低下に伴う依存性薬物への反応性の亢進といった中枢神経系の異常が引き起こされることを明らかにしている。そこで、BPA の胎児期および授乳期慢性暴露による記憶保持能力を始めとした脳高次機能に及ぼす影響を、特に記憶の責任部位である海馬領域に焦点をあて、神経新生および細胞分化決定、さらにはエピジェネティクス制御の関与も含め、多角的に検討した。

近年、成体中枢神経系においても、主に側脳室下帯と海馬歯状回の 2 カ所で神経が新生していることが明らかにされている。新生した神経は神経回路網に組み込まれて機能し、また学習や環境によって神経新生の効率が変化することが報告されている。そこで、成体期の神経新生が BPA 慢性暴露による記憶保持能力の低下に関連する可能性を考慮し、海馬神経新生の変化について検討を行った。その結果、BPA の慢性暴露により、神経芽細胞や移動前駆細胞に特異的に発現し、その発現量が神経新生レベルの変化を反映する doublecortin 免疫活性の減弱ならびに、海馬歯状回顆粒細胞層下層において、神経への分化に促進的に働き、かつ海馬顆粒細胞の成熟に重要な役割を果たす basic Helix-Loop-Helix 型転写因子である NeuroD 陽性細胞数の有意な減少が認められた。以前、BPA 慢性暴露により、海馬領域において choline 作動性神経の発現低下が引き起こされていることを確認していることから、BPA 慢性暴露群で認められた海馬神経新生の低下が、choline 作動性神経などの成熟神経の

発現異常に一部関与している可能性が考えられる。

一方、中枢神経系は神経幹細胞から分化する神経細胞、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞などの多様な細胞集団により構築されている。BPA の胎児期および授乳期慢性暴露により神経新生の低下が認められたことから、BPA は中枢神経系を構築する細胞の発現変化、すなわち神経幹細胞からの分化誘導に影響を及ぼす可能性が想定される。そこで次に、培養細胞を用い、BPA 処置による神経幹細胞からの分化誘導に対する影響について検討した。その結果、神経幹細胞に BPA を処置することにより、神経幹細胞から GFAP 陽性アストロサイトへの分化誘導の促進が認められた。そこで、培養細胞上のみならず、実際 BPA を暴露した成体組織においてもグリア細胞の発現異常が引き起こされているか否かについて、BPA を慢性暴露した成体期海馬におけるグリア細胞の発現を免疫染色法に従い検討した。その結果、BPA 慢性暴露マウスの CA1、2、3 および歯状回といった海馬全域において、アストロサイトのマーカーである GFAP 免疫活性の著明な増強が認められた。これまでに、初代培養アストロサイトおよび神経-グリア共培養細胞に対し、BPA を処置することにより GFAP 陽性アストロサイトの活性化が引き起こされることを明らかにしていることから、BPA は直接的にアストロサイトを活性化させる作用を有する可能性が考えられる。しかしながら、成体期において BPA の暴露を中止していること、さらに成体期においては BPA の代謝、排泄が非常に速やかに行われることが報告されていることから、成体組織内において BPA が残存し、直接アストロサイトの活性化を引き起こすことは考えにくい。従って、本研究によって認められた成体期におけるグリア細胞の発現異常は、恒常的な神経幹細胞からの分化異常に起因している可能性が考えられる。さらに、特にグリア細胞分化異常に対するエピジェネティックな影響を検討する目的で、中枢神経系の発達に非常に重要な時期である胎児期における GFAP の DNA のメチル化状態について MSP 法に従い検討した。その結果、胎生 14 日

目のマウス全脳における GFAP メチル化状態は、control 群、BPA 慢性暴露群共に高度にメチル化されており、両群間で差は認められなかった。しかしながら、先に述べたように、BPA 慢性暴露により恒常的なグリア細胞の発現異常が引き起こされていることを考慮すると、BPA 慢性暴露は、GFAP や Sox 10、Sirt1 などをはじめとしたグリア細胞分化に不可欠な因子群の DNA メチル化状態を非メチル化状態に移行する、いわゆる脱メチル化の時期に影響を及ぼす可能性が想定され、今後さらなる実験が必要であると考えられる。また、DNA の化学修飾に加え、ヒストンタンパク質の化学修飾によるエピジェネティックな影響についても検討を行った。ヒストン修飾には、ヒストンテールのアセチル化が知られており、この反応は、ヒストンアセチル化酵素 (histone acetylase, HAT) や、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) の活性変化により調節され、遺伝子の転写調節に関わっている。HDAC の中でも、特に脳内に多く存在する HDAC5 は、通常核内に存在し、転写を抑制的に調節していることが知られているが、この HDAC5 は依存性薬物であるコカインの投与やストレス負荷により Ca^{2+} /カルモジュリンキナーゼ II (CaMK II) 依存的にリン酸化を受け、核外に移行することで関連遺伝子の転写抑制が解除されるという報告がなされており、HDAC5 は、環境ストレスなどの外的刺激による遺伝子発現をダイナミックに調節していることが想定される。そこで、このリン酸化 HDAC5 に焦点をあて、BPA 慢性暴露による海馬領域における発現を免疫染色法に従い検討した結果、BPA 慢性暴露により、歯状回を始めとした海馬全域において、リン酸化 HDAC5 免疫活性の著明な増強が認められた。この結果は、HDAC5 による抑制性転写調節の抑制を反映するものと考えられる。現時点において、どのような遺伝子の発現がかく乱されているかについては明確ではなく、また、こうした異常が今回認められたような海馬領域における神経新生低下やグリア細胞発現異常などに直接関わってくるような知見は得られてはいないものの、HDAC の活性変化は細胞分化決定にも影響を及ぼすといった報告もある

ことから、今後 HDAC5 のみならず他のサブタイプについても詳細な検討が必要である。さらに、エピジェネティクス機構の一つとしてのヒストンのメチル化やクロマチンリモデリングなどに関しても、網羅的に検討していく必要があると考えられる。また、BPA 慢性暴露により発達期において大脳皮質層形成異常を引き起こすことも報告されており、さらには内分泌・免疫系に対する影響なども考慮すると、BPA の発達期における暴露により、おそらく複合的な因子に起因する神経系の恒常性破綻が引き起こされていることが懸念される。

E. 結論

- ・ BPA の慢性暴露により、海馬神経新生の低下ならびにグリア細胞分化異常を伴う記憶保持能力の低下が引き起こされた。
- ・ BPA の慢性暴露により、海馬領域において p-HDAC5 免疫活性の著明な増強が認められたことから、BPA の作用メカニズムを解明していく上で、エピジェネティクス異常を伴う遺伝子発現のかく乱が引き起こされている可能性を考慮する必要があることを明らかにした。

F. 健康危険情報

生命発生以来存在しなかった何万種類もの化学物質が環境中に放出されている。本研究の結果から、発達期に BPA を含む環境化学物質を飲食物とともに摂取した母親から生まれた現代人が、正常な神経系の構築がなされていない可能性を示唆するものであり、BPA の発達期暴露は出来る限り避けることが望ましい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyagawa K, Narita M, Narita M, Niikura K, Akama H, Tsurukawa Y, and Suzuki T. Changes in central dopaminergic systems with the expression of Shh or GDNF in mice perinatally exposed to bisphenol-A. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* 27 69-75 (2007)

Miyagawa K, Narita M, Narita M, Akama H, and Suzuki T. Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol-A. *Neuroscience Letters* 418 236-241

(2007)

Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, and Suzuki T. Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: evidence for the importance of exposure period. *Addict Biol* 12 167-172 (2007)

Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, and Suzuki T.: Role of δ -opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J. Neurochem.*, 97, 1494-1505 (2006)

Miyatake M, Miyagawa K, Mizuo K, Narita M, and Suzuki T.: Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *J. Neuroendocrinol.*, 18, 434-444 (2006)

Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, and Suzuki T.: Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neurosci. Lett.*, 402, 249-252 (2006)

2. 学会発表

池上大悟、成田 年、葛巻直子、今井哲司、新倉慶一、水尾圭祐、鶴川百合、鈴木 勉、環境ホルモンの胎児期および授乳期曝露によるエピジェネティックな脳神経機能発達の制御、第 18 回日本臨床精神神経薬理学会 第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会、2008 年 10 月 1 - 3 日、品川

水尾圭祐、成田 年、成田道子、鶴川百合、宮川和也、宮竹真由美、鈴木 勉、Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による海馬におけるアストロサイトの活性化、第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 9-11 日、千代田区

宮川和也^{1,2)}、成田 年¹⁾、鶴川百合¹⁾、水尾圭祐¹⁾、今井哲司¹⁾、成田道子¹⁾、武田弘志²⁾、鈴木 勉¹⁾(¹星薬科大学、²国際医療福祉大学)、Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による dopamine 神経発達に及ぼす影響、第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 9-11 日、千代田区

池上大悟、成田 年、鶴川百合、水尾圭輔、今井哲司、新倉慶一、鈴木雅美、鈴木 勉、

Bisphenol-A 曝露によるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の発現に及ぼす影響; Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A affects histone deacetylase (HDAC) expression、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26 - 28 日、代々木

鶴川百合、成田 年、成田道子、宮川和也、赤間久彦、新倉慶一、宮下和彦、鈴木 勉、Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による海馬 choline 作動性神経発達に及ぼす影響、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月 27 - 29 日、船堀

宮川和也、成田 年、成田道子、新倉慶一、赤間久彦、鶴川百合、鈴木 勉、Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による Shh および GDNF 発現と中枢 dopamine 神経発達に及ぼす影響、第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 - 16 日、神奈川

成田 年、宮川和也、宮竹真由美、赤間久彦、鈴木 勉、Bisphenol-A 曝露により惹起される dopamine 神経障害におけるグリア細胞の役割、第 29 回日本神経科学大会年会、2006 年 7 月 19 - 21 日、京都

宮川和也、成田 年、宮竹真由美、赤間久彦、富田真理子、鈴木 勉、Bisphenol-A 曝露による dopamine 関連行動に及ぼす影響と astrocyte の活性化、第 79 回日本薬理学会年会、2006 年 3 月 8 - 10 日、神奈川

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し