

3)生殖器

7. 内分泌かく乱化学物質の胎生期曝露が雄性生殖器に及ぼす影響の 発生生物学的解析研究

研究分担者 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

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDs)の胎生期曝露が雄性生殖器に及ぼす影響を発生生物学的に検討し、EDsの有害性の検出可能な新評価手法の確立のために、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についてマウスを用いて調べた。その結果、合成エストロゲンの胎生期曝露は精巣導帯の発生・発達に重要な役割を担うInsl-3 mRNA発現を著しく抑制し、低用量Bisphenol A(BPA)の曝露はP450scc mRNA発現を抑制したことから、精巣下降の制御に関連する遺伝子群の発現変化はEDs影響の指標の一つになり得ると考えられた。また、EDsの胎生期曝露によるエピジェネティックな変異が次世代の不可逆的影響に関与すると考え、Diethylstilbestrol(DES)を用いた胎児精巣曝露実験を行った。その結果、DES胎児期曝露は胎児精巣における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ことから、合成エストロゲンの胎児期曝露は胎児雄性生殖細胞におけるDNAメチル化制御分子を攪乱することが示唆された。

A. 研究目的

高次恒常性維持機構のアンバランス状態にあると考えられる小児を含む高感受性集団に対する有害性の新評価手法の開発研究を行う。胎児・小児は化学物質曝露に対して脆弱な集団であるため、有害性の検出可能な新評価手法の確立は緊急性を要する重要課題である。

今回、生殖機能障害の原因の一つとしての尿道下裂(hypospadias)あるいは停留精巣(cryptorchidism、精巣下降不全)などヒト先天性泌尿生殖器奇形のEDsを含む環境化学物質の子宮内曝露による発症機序についてマウスを実験材料として解析し、成熟後の個体にみられる生殖機能障害と関連して考察することを目的とした。さらにはEDsなど性ホルモン受容体と結合する化学物質、たとえばBPAの低用量曝露影響を検出することが可能な評価手法の確立も併せて検討することも本研究の目的とした。そこで今年度は、合成エストロゲンを含むEDsをマウス胎児の

性腺発生あるいは精巣下降の臨界期と考えられる時期に投与し、末期胎児における停留精巣の有無について解剖学的に観察し、用量反応性を調べて閾値の有無を確認するとともに、精巣導帯の発生・発達あるいは上体靱帯の退縮に重要な役割を担う遺伝子群の胎児 testicular mRNAあるいはタンパク局在について検討した。さらに、上方靱帯に作用するテストステロンの作用を阻害する抗アンドロゲン作用をもつFlutamide(FLU)が胎児の精巣下降にどのような影響を及ぼすかを昨年度に引き続き、用量を変えて調べた。次いでヒト曝露量に近い用量のBPAについても用量反応性の有無について検討した。

近年、胎生期のEDsを含む環境化学物質曝露におけるエピジェネティックな変異が、次世代へ不可逆的影響(transgenerational effects: 継世代影響)に関与することを示唆する報告がなされている。¹⁻³⁾ DESに子宮内曝露された雄マウスの精巣あるいは精巣上体における数多くの遺伝

子の発現レベルの上昇あるいは低下が報告されている。DES は non-genotoxic(あるいは非変異原)である⁴⁾ことから、これら遺伝子発現レベルの上昇・低下にはエピジェネティックな機構の関与が考えられる。そこで本研究では、マウス胎児の雄性生殖細胞におけるDNAメチル化制御分子として DNA methyltransferases 遺伝子の発現を EDs がかく乱するか否かを検討した。

1)Nagao et al., Male-mediated teratogenesis, Academic Press,2003.

2)Anway et al., Science 308, 1466-1469, 2005.

3)Crews et al., Proc Natl Acad Sci USA 104, 5942-5946, 2007

4)Cunningham et al., Arch Toxicol 70, 356-361, 1996

B. 研究方法

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)あるいは妊娠 15~17 日の連日に、合成エストロゲンの DES 1.5~50 µg/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 Ins13 (insulin-like factor3)、SF-1 (steroidogenic factor-1)あるいは P450scc (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 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 µg/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 µg/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 µg/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、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼など苦痛の少ない方法を用いた。

C. 研究結果

①精巣下降への影響

DES 曝露の影響(図 1、2)

妊娠 9~16 日投与群:DES 25 µg/kg 以上の群において肉眼的に精巣下降不全が観察され、精巣-腎臓間距離は DES の用量に依存して減少し、6 µg/kg 以上の群において統計学的有意差が認められた。しかし、胎児体重、精巣重量ならびに精巣比体重値には群間に差はみられなかった。このことから、精巣-腎臓間距離短縮(左右いずれも)と胎児発育との間に明瞭な関連はないと考えられた。肉眼的に精巣下降不全が観察された 25 あるいは 50 µg/kg 群において、Ins13 mRNA の発現が有意に抑制された。精巣-腎臓間距離が有意に短縮した 6 µg/kg 群では、いずれの遺

伝子 mRNA の発現も対照レベルであった。

妊娠 15~17 日投与群:いずれの投与群においても肉眼的に精巣下降不全は確認されず、精巣-腎臓間距離および精巣重量にも群間に差はみられなかった。さらに、Insl3、SF-1 あるいは P450scc のいずれの mRNA 発現にも DES 投与の影響は認められなかった。

FLU 曝露の影響

妊娠 15~17 日投与群:P450scc mRNA の発現を抑制して上方韌帯の退縮を障害し、精巣下降不全を誘発することが推察された抗アンドロゲン FLU の 40 mg/kg の投与は、解剖学的にも精巣下降関連遺伝子 mRNA 発現においても影響を及ぼさなかった。

BPA 曝露の影響(図 1、2)

妊娠 9~16 日投与群:いずれの投与群においても肉眼的に精巣下降不全は観察されず、また精巣-腎臓間距離および精巣重量にも群間に差はみられなかった。いずれの投与群の Insl3 mRNA も対照レベルであったが、200 µg/kg 群の SF-1 mRNA 発現は有意に抑制された。さらに P450scc mRNA については BPA の投与量に依存して発現は抑制され、対照群と 200 µg/kg 群との間に統計学的有意差が認められた。

妊娠 15~17 日投与群:いずれの投与群においても肉眼的に精巣下降不全は観察されず、また精巣-腎臓間距離および精巣重量にも統計学的有意差はみられなかった。さらに、いずれの投与群の精巣下降関連遺伝子 mRNA も対照レベルであった。

陽性対照として用いた EE の妊娠 9~16 日の曝露により、精巣下降不全が観察されたが、胎児体重および精巣重量はいずれも対照群と同等であった。Insl3 mRNA の発現は対照群と比較して著しく減少したが、SF-1 あるいは P450scc については影響は明らかではなかった。

②DNA メチル化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

投与後の胎齢 13、15 あるいは 18 日胎児の精巣について電子顕微鏡による超微形態観察を行ったところ、生殖細胞のアポトーシス像、暗調セルトリ細胞あるいは間質細胞の肥大が観察されたが、いずれの変化もその発現頻度は低率であり、傷害の程度も軽度であった。さらにこれらの変化は対照群の精巣の精細管でも低率に観察された。DES は胎児精巣の生殖細胞における Dnmts mRNA の発現パターンに影響を及ぼした。また、同時期の精巣におけるメチル化 DNA の定量では、統計学的に有意な差は認められなかったが、胎齢 13 日の DES 投与群において高メチル化傾向がみられた。

D. 考察

ヒト出生時にはほとんどの例において両側の精巣は陰嚢まで下降しているが、片側あるいは両側性に精巣が腹腔内に留まる停留精巣は、満期産成熟児の約 3%、未熟児の約 30%にみられ、1 歳で 2%、思春期でおおよそ 1%に減じるが成人の約 0.3%にみられる先天性生殖器奇形である。思春期を過ぎると精細管の基底膜肥厚や硝子化、精子形成能力の障害を伴うが、それは腹腔内の高温のためと考えられている。

我々のこれまでの研究から、フタル酸エステルをマウス胎児期に曝露すると、雄ではテストステロン合成を抑制し、胎児の精巣下降の制御に関連する遺伝子(Insl-3、Hoxa10 など)に干渉することが明らかになった。発生学的には上方韌帯と精巣導帯により腎臓近位にその位置を保つ生殖原基は、胎児発生の進行とともに、雄ではアンドロゲンにより上方韌帯が退化し、逆に精巣導帯が発達して下方に精巣を引き寄せることにより精巣

下降が進む。このように精巣下降の機構については組織から分子のレベルまで解析が試みられている。しかし EDs を含む環境化学物質の胎児期曝露による精巣下降不全(停留精巣)誘発に関しては、これまで解剖学的側面からの検討が主になされてきた。近年、合成エストロゲンにより誘発されるマウス停留精巣の分子機構について解明が進んでいる。P450scc はライディッヒ細胞で産生され、ステロイドホルモン合成・分解により、テストステロンを産生し、上方靱帯を退縮させて、精巣下降を促す。

本研究では、DES の胎生期曝露による精巣下降不全について検討を加えた。胎児の性腺発生・発達期に相当する妊娠 9~16 日の投与では、精巣-腎臓間距離は DES の用量に依存して減少したが、この変化は胎児の発育遅延あるいは精巣発生抑制と関連する変化ではなかった。また精巣-腎臓間距離は 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群において統計学的有意差が認められたが精巣下降不全は同群では肉眼的には観察されなかった。Ins13 mRNA の発現の著しい低下がみられた用量群と精巣下降不全が観察された用量群は一致した。胎児の精巣下降期に相当する妊娠 15~17 日の投与では精巣下降に関するいずれの指標にも変化はみられなかったことから、DES のマウス精巣下降不全に関する臨界期は妊娠 9~16 日の間に存在すると考えられた。

次いで BPA の低用量曝露影響の有無についても検討した。BPA の妊娠 9~16 日投与では、いずれの用量においても精巣-腎臓間距離の短縮および肉眼的に観察される精巣下降不全は認められなかったが、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の SF-1 および P450scc mRNA 発現が抑制されたことから、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までの用量の BPA は胎児の精巣下降に解剖学的変化を及ぼさないが、制御因子に何らかの影響を及ぼすと考えられた。今後、さらに詳

細な検討が必要と思われる。妊娠 15~17 日の BPA 投与は DES と同様、胎児精巣下降に関するいずれの指標にも変化がみられなかったことから、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までの用量の BPA の胎児精巣下降期曝露は影響を及ぼさないと考えられた。

FLU の 40 mg/kg 体重の妊娠 15~17 日経口投与の精巣下降への影響については昨年度(20 mg/kg 体重)と同様に明らかにならなかった。今後さらに、用量・効果関係の有無について検討することが必要であると思われる。

子宮内で DES などの合成エストロゲンに曝露された雄マウスは、成熟後に精巣の部分的雌化や精細管萎縮などの生殖器発生障害を示し、これら雄マウスの次世代では先天異常の発生率が上昇するという継世代影響(催奇形効果)がみられることを我々は報告した。¹⁾ この継(経)世代催奇形効果は、生殖細胞に生じた DNA のメチル化などエピジェネティックな変化による遺伝子発現の恒久的変化に起因するのではないかという仮説を我々は提唱している。

近年、DES のマウス新生児期曝露が Dnmts 発現パターンおよびゲノム DNA のメチル化に変化を及ぼして、これら変化が成熟後の生殖器官の器質的異常を引き起こしたとする報告が示された。⁵⁾

本研究においては、胎児精巣の組織には重篤な傷害を引き起こさない(電顕観察結果参照)用量の DES を胎児期に適用した。その結果、胎児精巣 DNA のメチル化レベルには明らかな変化は認められなかったが、Dnmts mRNA 発現のパターンに影響を及ぼした。ゲノム DNA のメチル化レベルについては Sp1、Sp3 の関与およびインプリンティング遺伝子の影響について詳細に検討する必要があると思われる。

5)Sato et al., Endocrine J 53, 331-337, 2006

E. 結論

精巣下降に関する研究では、精巣下降の病理解剖学的観察による影響評価のみならず、精巣下降の制御に関連する遺伝子群の発現についても検討し、EDs を含む多くの環境化学物質について低用量曝露も含め用量・効果関係を詳細に検討することにより、「精巣下降の制御に関連する遺伝子群の発現変動」が、胎児、小児など高感受性集団に対する有害性の検出可能な新評価手法を確立するための鋭敏な指標の一つになると考えられる。また、DNA メチル化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響の研究では、化学物質によるゲノム DNA メチル化パターンの変動がどのようなメカニズムで起きるかの詳細は定かではないが、胎児期のゲノムメチル化パターンの変動は環境化学物質に感受性が高いように思われる。したがって今後、環境化学物質の生体影響についてもエピジェネティクス研究の展開が必要であると考える。

F. 健康危険情報

得られた研究成果に健康危惧に関する情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

Okuda H., Nagao T. Cardiovascular defects induced by prenatal exposure to phenobarbital in rats. *Cong. Anom.*, 46: 97-104 (2006).

Shirota M., Saito Y., Imai K., Horiuchi S., Yoshimura S., Sato M., Nagao T., Ono H., Katoh M. Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats. *J. Toxicol. Sci.*, 30: 175-194 (2005).

2. 学会発表

駒田到和、藤山総子、長尾哲二、塩田浩平：ニトロソ尿素によって誘発されるマウス小頭症の発症機序 第 48 回日本先天異常学会(東京)、抄録集 p.73、2008

三島裕子、中野紗綾香、斉藤義明、長尾哲二：プロモデオキシウリジン投与マウスの指列誘導異常発生機序 第 48 回日本先天異常学会(東京)、抄録集 p.86、2008

高田尚実、城山朋佳、長尾哲二：DES 胎生期曝露マウスの性腺における DNA メチル化酵素遺伝子の発現 第 48 回日本先天異常学会(東京)、抄録集 p.84、2008

小野田訓子、長尾哲二、松野義晴、森千里：合成エストロゲンに曝露されたマウス雄胎児の精巣生殖細胞における DNA メチル化酵素遺伝子の発現 第 37 回日本環境変異原学会(沖縄)、抄録集 p.120、2008

小野田訓子、斉藤義明、長尾哲二：合成エストロゲンのマウスにおける継世代催奇形効果 第 47 回日本先天異常学会(名古屋)、抄録集 p.66、2007

松田圭子、斉藤義明、長尾哲二：レチノイン酸により誘発されたマウス口蓋裂の成立機構 第 47 回日本先天異常学会(名古屋)、抄録集 p.75、2007

藤山総子、斉藤義明、長尾哲二：ニトロソ尿素胎生期投与がマウス脳の発生および発達・行動に及ぼす影響 第 47 回日本先天異常学会(名古屋)

屋)、抄録集 p.80、2007

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

なし

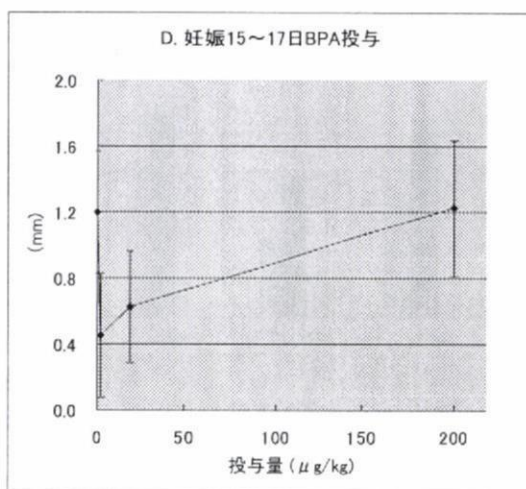
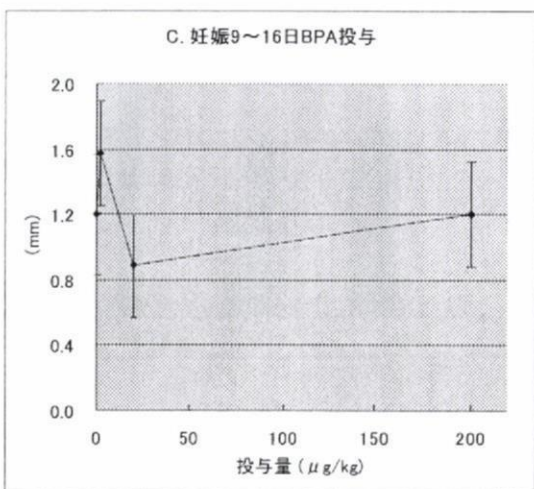
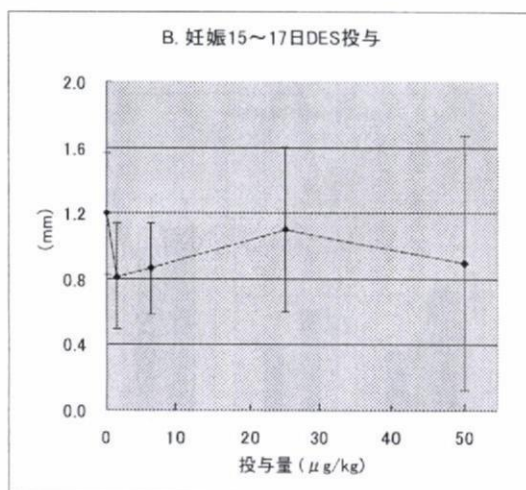
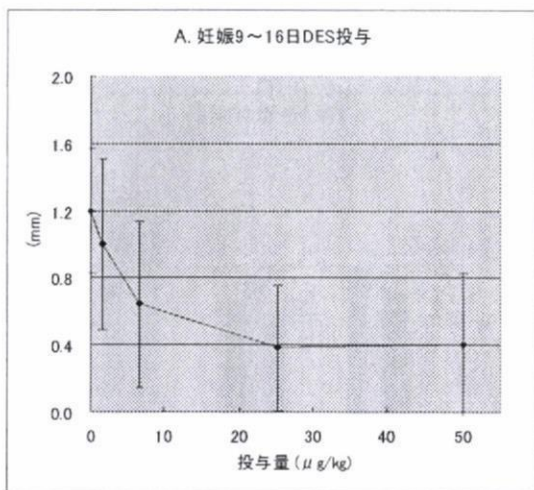


図1. 胎齢18日胎児における精巣-腎臓間距離

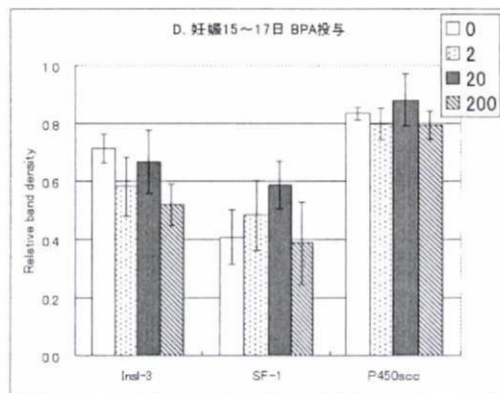
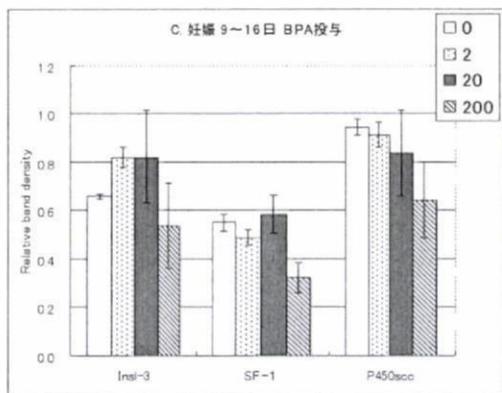
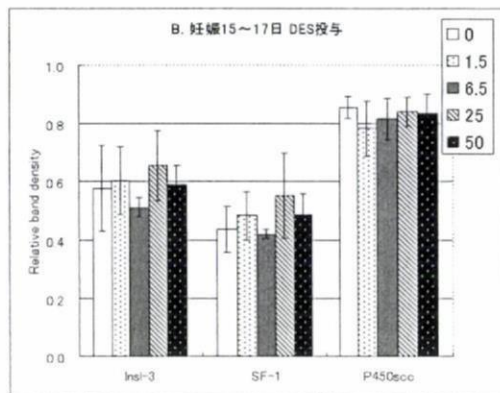
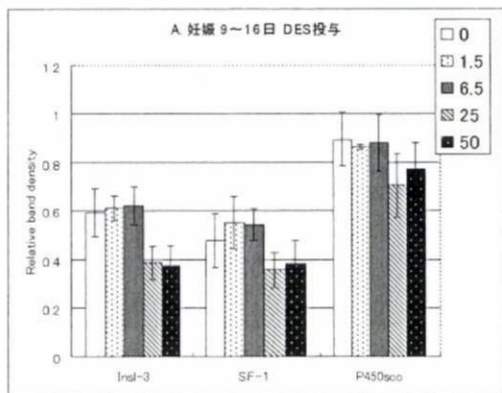


図2. 胎齢18日胎児精巣におけるmRNA発現

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

研究分担者 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
研究協力者 大向英夫 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者 豊泉友康 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者 宮原 敬 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

Diethylstilbestrol (DES) の C57BL/6J マウス新生児投与による一生涯試験を実施し、Sprague-Dawley ラットを用いた一生涯試験の結果と比較した。その結果、マウス一生涯試験においても、遅発性の性周期異常や抗体産生能の低下といったラット一生涯試験と類似の変化が観察され、DES の内分泌攪乱作用がマウスにおいても再現された。しかし、マウスでは、性成熟の遅延や体重増加など、ラットとは明らかに異なる DES 投与の影響も観察された。

A. 研究目的

化学物質等のヒトへの影響を調べる上で、薬物に対する感受性の高い新生児期に被験物質を投与し、成熟後の変化を確認することは、重要と考えられる。特に、生殖器系の発達と老化に関しては、春機発動、卵巣周期、精子数、更年期などの異常と化学物質暴露との関連が危惧されていることから、より重要と考えられる。そこで、化学物質の内分泌攪乱性の確定試験として期待されている「げっ歯類を用いた一生涯試験」の確立を目的に、本研究ではエストロゲン活性を有する化学物質をマウスの新生児期に投与し、発達、成熟、老化に至る全ての段階において、生殖器系、さらには行動や免疫系を検索する試験を試みた。

B. 研究方法

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 週齢まで膣スメアを採取し、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。

C. 研究結果

生後 1 日から 10 週齢までの体重推移には、DES 投与の影響はみられなかったが、10 週齢以降の雌の体重は、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で対照群より明らかな高値を示した (Fig. 1A)。

雌の膣開口時期は、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で対照群と比較して有意に遅延した (Fig. 2A)。しかし、雄の陰茎包皮分離時期には、対照群と DES 投与群との間で差は認められなかった。

性周期については、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 80% 以上の動物が観察初期から異常周期を示した他、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 80% 以上の動物が 28 週齢までに遅発性の異常周期を示した (Fig. 3A)。

雄の器官重量のうち、精嚢が 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、凝固腺が 0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で対照群より有意に低下した。

ヒツジ赤血球に対する抗体産生能は、雄で用量依存的に低下する傾向がみられ、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意差が認められたが (Fig. 4A)、雌では対照群と DES 投与群との間に有意差はみられなかった。

水迷路学習試験では、ゴール到達までの時間が、雌雄とも用量依存的に延長する傾向が認められたが (Fig. 5)、統計学的有意差はなかった。

D. 考察

マウスを用いた一生涯試験においても、ラッ

ト一生涯試験と同様(Fig. 3B), 5 µg/kg 投与群で androgenization によると考えられる性周期異常がみられた他, 0.5 µg/kg 投与群で遅発性の性周期異常も観察された. したがって, DES 投与による内分泌攪乱作用はマウスにおいても再現されることが明かとなった.

ラット一生涯試験の雄で観察された DES 投与による抗体産生能の低下(Fig. 4B)がマウスの雄においても観察された. このことから, DES 投与による内分泌攪乱作用は, 免疫機能にも及んでいると考えられるが, その作用には性差が存在すると推察された.

一方, ラット一生涯試験では認められなかった DES 投与による体重増加(Fig. 1B)が, マウスを用いた実験で明かとなったことから, 脂肪代謝等に係わる内分泌攪乱作用が存在し, それらはラット-マウス間で異なる可能性が示唆された.

また, DES 投与により腔開口時期がラットでは早まり(Fig. 2B), マウスでは遅延したことから, DES の新生児期投与による性発達への影響は, 動物種によって異なる可能性も示された.

DES 投与群の雄で, 精囊および凝固腺重量が対照群より低下したが, これらの変化については背景データや受胎率などの機能面を考慮して総合的判断する必要がある.

E. 結論

本研究ではエストロゲン活性を有する DES をマウスの新生児期に投与し, 発達, 成熟, 老化に至る全ての段階において, 生殖器系, さらには行動や免疫系を検索した結果, 雌における性成熟の遅延, 遅発性の体重増加および性周期異常, 雄における抗体産生能の低下などが観察され, 内分泌攪乱性を確定する上でマウス一生涯試験は有効であることが示されたが, 明らかな行動異常を検出することはできなかった.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

太田 亮, 宮原 敬, 又吉 健, 大向英夫, 小野 宏: 内分泌攪乱性確定試験としてのラット一生涯試験の試み. 秦野研究所年報 30, 17-24 (2007)

2. 学会発表

太田 亮, 宮原 敬, 又吉 健, 大向英夫, 小野 宏: 新生児の低用量 DES 暴露が及ぼす加齢雌ラットの生殖系への長期的影響. 環境ホルモン学会第9回研究発表会(要旨集 p.174, 2006)

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)暴露の影響. 環境ホルモン学会第11回研究発表会(要旨集 p.131, 2008)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

なし

Fig. 1 Body weight

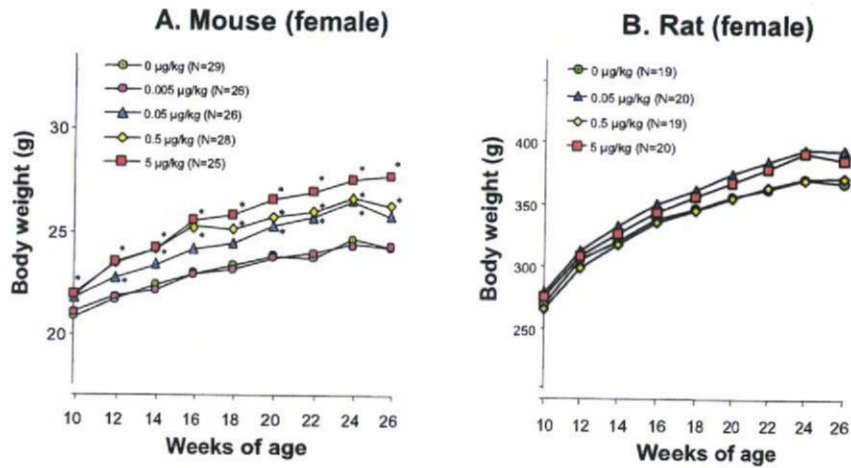


Fig. 2 Vaginal opening

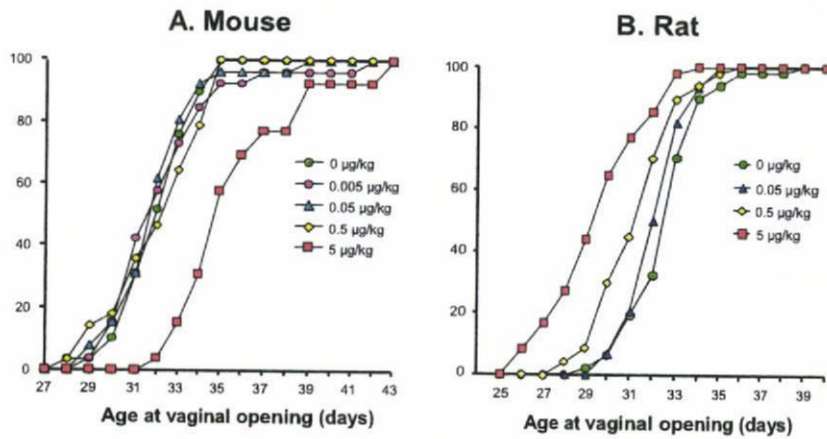


Fig. 3 Estrous cycles

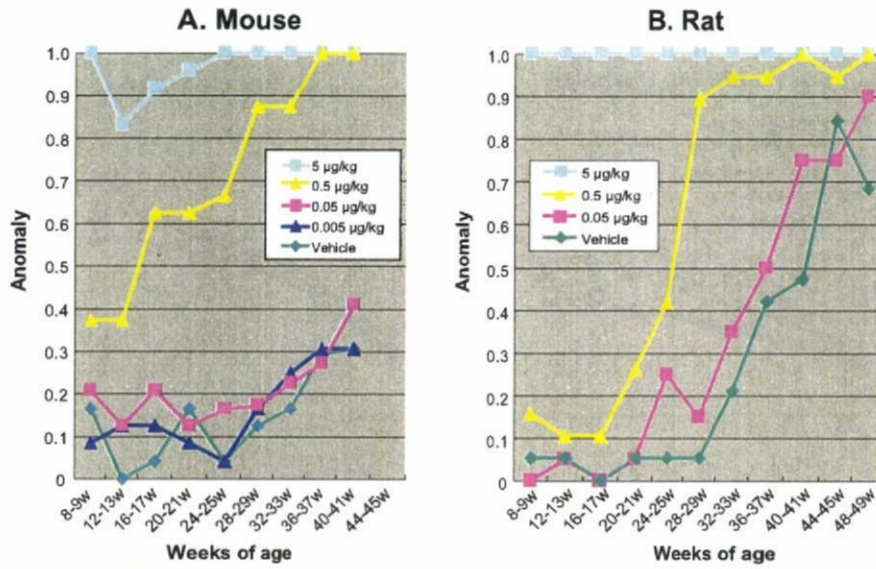
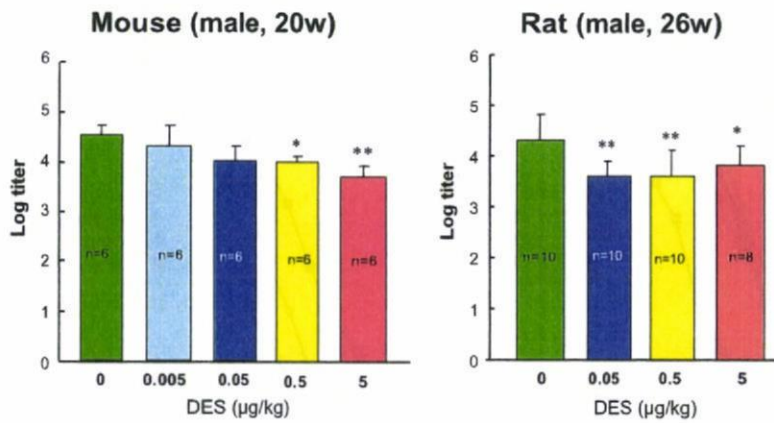
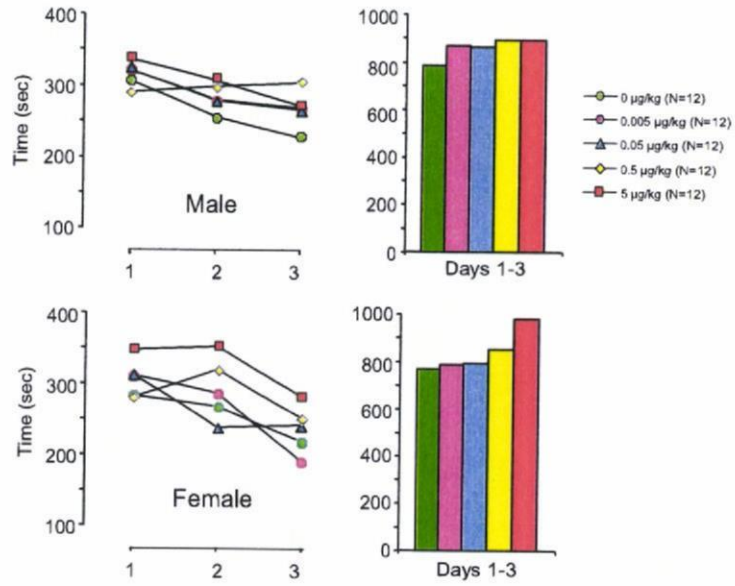


Fig. 4 Anti-SRBC-IgM



*P<0.05, **P<0.01 as compared with 0 µg/kg group
Bar, S.D.

Fig. 5 Water T-maze



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

研究分担者 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

研究要旨

前小野班で実施された委託研究において、低用量 Bisphenol A (BPA; 0.5、5、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を SD ラットの妊娠期～授乳期に投与し、得た雌性児 (F1) の性周期が 6 ヶ月齢において溶媒対照群には異常は見られないところ、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群において異常性周期を呈する動物数が有意に増加すること、更に月齢が進むに従い溶媒対照群にも異常が出現し始めるが全ての BPA 投与群の性周期異常がそれを上回ることが示された。

本研究は、上記試験と同様のプロトコール (BPA 0、5、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を踏襲した実験を行い、6 ヶ月齢までの経時的な視床下部、下垂体、卵巣等の遺伝子発現の解析及び病理組織等を詳細に検査することにより性周期異常が誘導されるメカニズムを明らかにする事を目的とする。

A. 研究目的

本研究は、低用量 BPA の齧歯類への周産期暴露により性周期異常が誘導されるメカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法

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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、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 (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 で一晩同居させ、翌朝腔栓及び腔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) に出生児数、出生死亡児数、出生児性を記録した。

離乳児全例について、21 日齢から腔開口を観察した。

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 以降は腔スミアにより発

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。

C. 研究結果

妊娠期間中、溶媒対照群及び BPA 投与群とも母動物の一般状態、体重に異常は見られなかった。

分娩時の平均出産数は、溶媒対照群、BPA 5 μ

g/kg 及び BPA 50 μ g/kg 群、各々 14.8 ± 1.0 (母動物数 $n=9$)、 13.4 ± 4.0 ($n=11$) 及び 14.1 ± 2.10 ($n=11$)、平均雄児数(F1)は、各々 6.9 ± 1.1 、 6.9 ± 3.7 及び 7.4 ± 2.5 、平均雌児数(F1)は、各々 7.9 ± 1.2 、 6.3 ± 3.3 及び 6.5 ± 2.6 であり、溶媒対照群と BPA 投与群との間に有意な差はみられなかった。

膣開口検査において、溶媒対照群、5 及び 50 μ g/kg 群の平均膣開口齢は各々 33.1 ± 1.2 ($n=53$)、 $34.1 \pm 2.1^{**}$ ($n=47$)、 33.3 ± 1.9 ($n=48$) であり、5 μ g/kg 群において溶媒対照群との間に有意 (**; $p < 0.01$) な遅延がみられた。平均膣開口日の体重(g)は各々 121.3 ± 11.9 、 $127.2 \pm 15.2^*$ 、 125.5 ± 13.1 であり、5 μ g/kg 群において有意 (*; $p < 0.05$) に高値であった。

3 ヶ月齢時の性周期検査では、5 μ g/kg 群の 1/19 例で persistent diestrus がみられた。

4 ヶ月齢時の性周期検査では、5 μ g/kg 群の 1/19 例で persistent diestrus、1/19 例で persistent estrus、1/19 例で constant estrus、50 μ g/kg 群の 2/17 例で persistent diestrus がみられた。

5 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群の 1/23 例で persistent diestrus、5 μ g/kg 群の 1/19 例で persistent diestrus、1/19 例で persistent estrus、2/19 例で constant estrus、50 μ g/kg 群の 1/17 例で persistent estrus がみられた。

6 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群の 1/23 例に constant estrus、5 μ g/kg 群の 2/19 例に persistent diestrus、2/19 例に constant diestrus、1/19 例に persistent estrus、5/19 例に constant estrus、50 μ g/kg 群の 2/17 例に persistent diestrus、1/17 例に persistent estrus、2/17 例に constant estrus がみられた。

統計学的には、5 μ g/kg 群の 6 ヶ月齢時の総異常性周期動物数が有意な増加を示した。

臓器重量

PND21 時の臓器重量 (各群 14 例) では、5 μ g/kg 群で卵巣の絶対及び相対重量の低値がみられた。

PND40 時の臓器重量 (各群 14 例) では、測定した全ての臓器において絶対及び相対重量とも溶媒対照群と BPA 投与群との間に差はみられなかった。

3ヶ月齢時の臓器重量(各群14例)では、5 μ g/kg群で卵巣の絶対及び相対重量の高値、50 μ g/kg群で卵巣の相対重量の高値がみられた。

6ヶ月齢時の臓器重量(対照群17例、5 μ g/kg群17例、50 μ g/kg群15例)では、測定した全ての臓器において絶対及び相対重量とも溶媒対照群とBPA投与群との間に差はみられなかった。

一方、卵巣の相対重量について、正常な性周期を示す動物と連続発情を示した動物について検討した。溶媒対照群及びBPA投与群で正常な性周期を示した動物については差はみられなかった。各群とも連続発情を示した動物では正常な性周期を示す動物に比し、低値がみられた。

卵巣の病理組織学的検査

6ヶ月齢時では、5 μ g/kg群でconstant estrusを呈した動物の卵巣に黄体形成不全がみられた。

下垂体のプロラクチン免疫組織学染色

PND21では溶媒対照群を含む全投与群においてPRL産生細胞は散在性に分布していた。

PND40以降は、溶媒対照群及びBPA投与群ともにPRL陽性細胞は慢性に分布しており、両群に差はみられなかった。

乳腺のwhole mount preparation 検査

6ヶ月齢時では、対照群に比しBPA投与群においてconstant diestrusを呈した動物のterminal end budsの拡張がみられた。

D. 考察

先の委託試験において、BPAを0、0.5、5及び50 μ g/kg/dayの用量でラットの妊娠期～授乳期に投与し得られた雌出生児(F1)の性周期異常が有意に増加したことから、BPAの低濃度の妊娠期～授乳期投与がpremiddle ageにおける性周期異常を誘導することが示された。

本研究においても、6ヶ月齢時の性周期検査において、性周期異常を示す動物が溶媒対照群では1/23例(4.3%)に対して、5 μ g/kg群では10/19例(52.6%)であり統計学的に有意な発生頻度の増加を示し、再現性のある変化であることが示

された。

周産期の低用量BPA暴露により、雌性児に性周期異常、卵巣重量の低値及び黄体形成不全、陰開口遅延、乳腺terminal end budsの拡張等、遅延性影響が誘発されることが示唆された。

現在、経時的に採取した視床下部、下垂体、卵巣、子宮、陰、乳腺及び血清について引き続き検査を実施し、低用量BPAの齧歯類への周産期暴露による性周期異常の誘導メカニズムの解析を進める。

E. 結論

BPAの5及び50 μ g/kg/dayをSDラットの妊娠6日から分娩後20日まで母動物に強制経口投与し、低用量域暴露時の雌性出生児への性周期異常の誘発等について検討した。その結果、いずれのBPA投与群においてもpre-middle ageにおける性周期異常が誘発される可能性が示唆されたことから、内分泌かく乱化学物質暴露においては長期間に渡る性機能への影響に関する評価が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

松島 裕子、菅野 純、基礎飼料CRF-1とPhytoestrogen low dietのマウス妊娠期・授乳期摂取による雌雄児への影響の比較検討、環境ホルモン学会第10回研究発表、2007年12月9-11日、大宮

松倉 寛、五十嵐 勝秀、松島 裕子、相崎 健一、菅野 純、村松 正明、佐藤 憲子、SF-1遺伝子発現のエピジェネティック制御に与える内分泌攪乱物質の影響、エピジェネティクス研究会、2008 5月、三島

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

【 有害性発現分子メカニズムの解析研究 】

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

研究分担者 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

研究要旨

ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、内分泌かく乱化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用である。平成 20 年度は Bisphenol-A 添加後の ES 細胞及び ES 細胞から形成される胚様体(EB)の形成開始後 7 日間の遺伝子発現の Percellome 法による定量的なマイクロアレイデータの詳細な解析を進め、影響を受ける遺伝子を同定した。

A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞で、遺伝子欠失マウス作製に用いられている。一方、ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析によく用いられている。また、数百個の ES 細胞を天井培養することにより形成される胚様体 (Embryoid body; EB)は、胎児の三胚葉形成過程を模倣することが知られることから、特に、化学物質の影響を解析することが難しい発生初期への影響を調べるモデル試験系として有用であると思われる。そこで、この『ES/EB 系』を用いて TCDD を含む胎児発生毒性物質の有害性発現メカニズムの解明を行う。

B. 研究方法

胎児発生毒性物質として Bisphenol-A(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、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。(倫理面への配慮) 該当無し。

C. 研究結果

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、中胚葉、臓側内胚葉マーカーに明らかな影響は観られなかったが、神経幹細胞のマーカーである Nestin の増加傾向が認められた。また、心筋分化マーカーの Mlx2.5、Mei2c 等の発現が対照群に比較して 1 日程遅れて発現した。また、核内受容体の発現について検索したところ、androgen receptor (AR) が培養 1-2 日目で、有意に高かった。また、アンドロジェン・エストロジェン代謝にかかわる遺伝子の増加が初期に認められた。また、malat1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)の発現増加が認められた。また、脳に発現することが知られている GPR27 の発現が BPA により遅延した。その他、いくつかの BPA により影響を受けるとされる遺伝子を同定した。

D. 考察

BPA の ES/EB 系に対する遺伝子発現影響解析の結果、培養 1 日後から、androgen receptor(AR)

の発現増加やアンドロジェン、エストロジェン代謝酵素の増加が見られ、BPA が初期胚においてアンドロジェンやエストロジェンを介したシグナルに影響を及ぼすことが示唆された。分化関連遺伝子の解析から、内胚葉、中胚葉への影響は認められなかったが、神経幹細胞のマーカーである nestin の増加傾向が認められ、BPA が神経幹細胞の分化を促進させる可能性が示唆された。また、BPA は心筋分化マーカーの発現を軽度ではあるが遅らせ、心筋分化に影響を及ぼした。また、この原因として、血管や心筋分化に関与することが知られている遺伝子の EphB4 が減少したことから、この EphB4 の関与が示唆された。一方、脳に発現することが知られている GPR27 の発現の遅れや Npas1 の発現増加抑制が見られ、神経の分化にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後は、さらに得られたデータの解析を継続するとともに TCDD 等の影響についても検討していく予定である。

E. 結論

ES 細胞及び EB の分化に対する BPA の影響を定量的マイクロアレイ解析手法を用いて明らかにし、それぞれ、標的遺伝子に関する新知見を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 雑誌

Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio Ogata, Norio Ohashi, Satoshi Kitajima and Jun Kanno, J. Toxicol. Sci., 33, 105-116, 2008.

トキシコゲノミクスの新展開 Percellome Project による 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF 比較、菅野純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之、

児玉幸夫、高木篤也、細胞工学、26、1391-1396、2007

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、細胞工学、26、71-77、2007

2. 学会発表

Quantitative microarray analysis by "Percellome" method on murine embryonic stem cells and embryoid bodies, TAKAGI A, KITAJIMA S, NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K, EMA M AND KANNO J, 47th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2008年3月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子の Percellome 手法を用いた定量的マイクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純第 30 回日本分子生物学会年会、2007年12月、横浜

マウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子発現パターンの解析(その2)、高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月、東京

Quantitative microarray analysis with "Percellome" method in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated murine fetal palate, TAKAGI A, NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K, EMA M AND KANNO J 46th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2007年3月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

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 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
宮浦英樹 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究員

研究要旨

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部より供与された 50 化合物について、ヒトエストロゲン受容体 α (hER α)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 α 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ヒト由来細胞株(HeLa-9903 細胞)を用いて、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 が算出されたものは 11 物質であり、さらに PC50 も算出されたものは 3 物質であり、hER α アンタゴニスト活性として IC30 が算出されたものは 7 物質であり、さらに IC50 も算出されたものは 1 物質であった。

A. 研究目的

我々の現代社会においては、膨大な種類の化学物質が利用されており、これらの化学物質について内分泌かく乱性の観点から特に高感受性集団へ影響を及ぼす可能性があり、緊急に再評価する必要がある。本研究ではそれら有害物質の評価スキームにおけるスクリーニング系確立のため培養細胞を用いたハイスループットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析法を用いた検証データの収集を進めると共に、順位付けの科学的根拠に関わる基礎的研究を進め、メカニズム研究への有効応用を目指している。本研究では、特に化学物質のエストロゲン受容体 α サブタイプに対応するアゴニスト作用及びアンタゴニスト作用をレポーター遺伝子アッセイによって測定し、基礎データを収集した。

B. 研究方法

供試化合物

表 1 に示した。

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 β -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 α (hER α)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 α 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 ニススイ、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。