

2009 4100 2A

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 21 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 22(2010) 年 3 月

別添 1

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野 宏

平成 22(2010)年 3月

目 次

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	35
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. 胎児期および授乳期の bisphenol-A 曝露による中枢神経系の発達に及ぼす影響	45
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	49
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 —	87
今井 清	
2) 免疫	
5. 周産期化学物質曝露による免疫異常発現メカニズムの解明	95
林 良夫	
6. 化学物質の周産期曝露及び in vitro 曝露の初期免疫応答に対する影響評価	115
武吉 正博	
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物学的解析研 究	123
長尾 哲二	
8. 周産期・小児期の化学物質曝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	131
太田 亮	
9. 化学物質の齧歯類周産期曝露による雌性生殖器等の遅発性障害の研究	141
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	147
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.....	163
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	167
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	173
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. 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	187
小野 敦	
委託研究(委託先;株式会社 医薬分子設計研究所) 高感受性集団へ影響を及ぼす化学物質の電算検索	195
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	207
IV. 研究成果の刊行物・別刷	217

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、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 薬品毒性学教室、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 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 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 放射線再生医学研究部門 組織再生制御研究分野、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・東京大学 分子細胞生物学研究所 核内情報研究分野、非常勤講師

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)発生発達期の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的研究、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、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。

●小野 宏

内分泌かく乱化学物質問題に対応する厚生労働省の試験スキーム策定に資するために総合的な研究体制を維持し、班員および協力者の協力を得ながら、(1)この問題の国際協力の重要性を考慮し、OECD 試験法ガイドライン事業で催された専門家会議に参加して研究の方向と各国の動向について調査した。(2)同事業で行われている内分泌攪乱関連試験法ガイドライン案の検討に参加して試験法策定にあたった。

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
- 周産期化学物質暴露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及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

●菅野 純: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)

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、既に行実施し、低用量影響データを得ているBPA及びDESに引き続き、(2)マウスを用いた低用量化学物質(BPA、DES、GEN)の子宮内・経乳汁曝露による免疫毒性試験を実施した(委託研究: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

同上

(2)子宮内・経乳汁曝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、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4/16、13/19、9/19、13/24、12/17匹で観察され、大量投与時のみならず、低用量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(委託研究:委託先:財団法人 化学物質評価研究機構)。

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:財団法人 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(飼料:MF, オリエンタル酵母工業)(委託研究:委託先:財団法人 食品農医薬品安全性評価センター)。その結果、12 ヶ月解剖時の器官重量では、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、連続発情を示す性周期異常の発生が DES の 2 および 20 ng/kg 群の雌出生児で早まる傾向が認められ、特に 20 ng/kg 群で顕著であった。

平成 19 年度は、更に、低用量の DES (0.2、2 及び 20 ng/kg/day) をラットの妊娠 6 日から分娩後 20 日まで強制経口投与し、得られた出生児の 6 ヶ月齢までの短期追加確認試験を実施した(飼料:MF, オリエンタル酵母工業)(委託先:バイオラボ株式会社)。

平成 20 年度は、Genistein の低用量影響の確認試験を行った。1000 µg/kg/day を高用量とし、以下 200 µg/kg/day を中用量、及び 40 µg/kg/day を低用量に、DES 0.02 µg/kg を陽性対照群に置いて実施した(飼

料:Phytoestrogen low diet (PLD)、オリエンタル酵母工業)(委託研究:委託先:財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)。

本年度は、マウスを用いた低用量化学物質の子宮内・経乳汁曝露による免疫毒性試験を実施した(飼料:Phytoestrogen-low diet (PLD)、オリエンタル酵母工業)(委託研究:委託先:財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)。群構成を示す。

群	投与物質	投与量 (µg/kg)	動物数
1	媒体(オリブ)	0	24 匹
2	BPA	5	15 匹
3	BPA	50	15 匹
4	DES	0.002	26 匹
5	DES	0.02	26 匹
6	GEN	100	24 匹
7	GEN	1000	24 匹

【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系の変動による化学物質の有害性を評価するための手法を確立する。

1) 神経・行動

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

使用動物および bisphenol-A 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。Bisphenol-A の慢性曝露は薬物混入試料法に従い、bisphenol-A(0、2 mg/g of food、約 120-240mg/kg)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。また、胎児脳を用いた検討では、胎生 14 日目の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、Refinement、Replacement、Reduction の 3R 原則に基づいて遂行した。

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、doublecortin (DCX)、NeuroD、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、myelin associated glycoprotein (MAG)、Olig2 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。

また、BrdU を用いた検討では、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスに BrdU (50 mg/kg)を2時間おきに6回腹腔内投与し、BrdU 最終投与4週間後に全身灌流固定した。

●宮川 宗之: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

1. BPA経胎盤・経母乳曝露がラットの次世代認知機能におよぼす影響について

被験動物: 9週齢の交配済み雌ラット(IGS-SD・日本チャールスリバー)を52匹購入し、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13匹)した。出産5日後(PND5)に各腹の児数を8匹(可能な範囲で雌雄同数)に調整した。離乳時に、行動試験に使用するための雄性児を各腹から1匹ランダムに選び(行動試験には合計48匹を使用するが、各群1腹多く準備して雄性児がとれない場合に備えるとともに、全腹から雄性児がとれたときには13腹から1腹をランダムに除外して使用することとしている)、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。給餌制限下での食餌強化によるSCOB行動

測定のため、8週齢で個体別飼育を開始した。給餌制限では体重300gを目標に給餌量を調整し実験期間を通じて体重を維持した。飲料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。

なお離乳時の雌雄判定において、対照群で誤判定が1例あり、集団飼育時に1ケージで雌が混入したため、このケージの4匹は行動解析に使用せず、対照群では8匹を用いることとなった。また、3.3 ppm群では1匹が未妊娠、1匹が未出産の理由により使用できなくなったため、これらの個体を除く11個体から得た雄児11匹(各腹1匹)を実験に使用した。他の2群は予定どおり12匹を使用した。

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、33 ppmの濃度となるよう混入し、混入後に市販の固型飼料サイズに成形したものを使用した。なお、動物の入荷から混餌曝露開始までは、混餌飼料と同じ銘柄(オリエンタル酵母MF)の固形飼料で飼育した。

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。報酬の提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。

なお、特定の測定装置が特定の群に偏らないよう、各装置に各群の個体を割りつけて使用した。

SCOB の測定手続き：食餌を報酬とした SCOB 測定のための制限給餌で体重が安定した 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。装置 8 台で 48 匹の測定を実施するため、1 日 6 回の測定が必要であり、日内の実施時刻にずれが生じるが、実施時刻が群によって偏らないようバランスをとり各時刻に各群を割り振った。

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 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。

自動反応形成スケジュールは一連の SCOB 条件付け学習訓練の初めの段階となるもので、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”という報酬提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）を含むもので

ある。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 ($P[\text{HIT}]$) 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[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。

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 プロシーチャーを使用した。

2. BPA 経胎盤・経母乳曝露がマウスの次世代認知機能におよぼす影響について

被験動物：13 週齢の交配済み雌マウス (C57BL/6J・日本クレア) を 64 匹購入し、1 群 16 匹の 4 群に分け、GD6 から PND22 まで BPA の混餌投与を行なった。出生児マウスの成長後に行動測定に使用した。出生翌日 (PND1) に同腹児数を 8 匹に調整 (可能な範囲で雄 4 匹・雌 4 匹、総出生児数 8 匹未満の場合はそのまま) した。離乳時 (PND22) に、各腹から雄性児 1 匹をランダムに選び、通常飼料 (オリエンタル酵母 MF) を与えて 12 週齢まで集団飼育 (4~5 匹) した。行動試験には、最終的に雄性児を 1 群 (各曝露濃度) 当たり 12 匹で計 48 匹を使用予定であったが、0.33 ppm 群では 9 匹しか雄児が取れなかった (未出産が 3 匹、出産後全児死亡が 3 腹、全児雌が 1 腹) ため、この群は 9 匹、他の群では 13 匹の合計 48 匹を測定に使用した。各腹から雄性児 1 匹とするとともに、雄の産児が得られた母動物から測定対象とする腹がランダムに選ばれるようにした。

雄性児は 12 週齢で行動試験に使用する個体を確定し、食餌強化による SCOB 行動

測定のため給餌制限と個別飼育を開始した。SCOB の測定では、食餌を報酬とするため、個体別に飼育して給餌量を制限・調整することが必要となるが、これまでの結果に基づき、給餌制限開始前の体重の 85% 体重 (目標体重) を維持するよう調整した。飲料水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。給水瓶にはガラス製を使用した。

実験に用いたマウスは、すべて温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の清浄環境下で飼育され、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施された。飼育にはポリカーボネート製ケージを使用した。

BPA 曝露：購入した交配済動物は上述したように、母マウスを各群 16 匹の 4 群に分け、GD6 から PND22 まで BPA の混餌投与を行なった。使用した混餌飼料は、ラット用と同時に調整したもので、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、33 ppm の濃度で混入し、混入後に市販の固型飼料サイズに成形したものを、それぞれの群に与えた。

SCOB 測定装置：マウスのスケジュール制御オペラント行動 (SCOB) の測定には 8 台のマウス用 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。マウス用オペラントチャンバーは幅×奥行×高さが 160×134×127 mm で cue light は黄色の LED 製、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: 基本的にラットと同様である。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、レバー押し反応の条件づけ訓練を 16 週齢で開始した。以後、1 日 1 セッションで週 5 日行い実験終了まで継続した。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 (FR2×2 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、報酬にはマウスでは 20 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はラットと同様とした。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もラットと同様で、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) を含むもので、ラットと基本的に同様であるが、1) 訓練当初の固定長タイムアウト時間、2) 訓練第 2 段階のセッション数、3) 訓練第 3 段階のセッション数が異なる。以前の研究結果をベースにマウスで訓練が適切に進行するよう設定したもので、再試験対象となる以前の実験と同じものとした。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 8s) では、タイムアウト時間を 8 秒に固定 (ラットでは 4 秒に固定) し 25 セッションの訓練・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、40 セッションの訓練・測定を実施 (ラットでは 25 セッション) 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、50 セッションの訓練・測定を実施 (ラットでは 25 セッション) した。その

後、薬理的負荷試験を実施した。

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 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 粒が餌皿上に与えられる(報酬の提示・強化)。その後はタイムアウトとなって、cue light は消灯し暗転する。ラットではハウスライトを暗転中も含め常時点灯としたが、マウスでは暗転時は完全に消灯した。他はラットと同様である。

SCOB における反応の指標:ラットと同様の指標を用いた。すなわち、FR 及び DRO 反応率(1 分間当りのレバー押し反応頻度)、「Accuracy」、「Bias」である。

薬理的負荷試験:方法はラットと同様とした。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 50 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 アゴニスト)、(±) SKF38393(D1 アゴニスト)を使用するが、methamphetamine 以外については報告書作成段階で測定未終了である。

統計解析:ラットと同様の方法で行なった。母マウスの摂餌量、児マウスの体重については、群間 1 要因(BPA)群内1要因(測定日)として反復測定分散分析を実施した。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。また、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。いずれも計算には SAS/GLM プロシーチャーを使用した。ま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 BPA 曝露の効果(群間要因)について検定予定。

3. プロピルチオウラシル(PTU)経胎盤・経母乳曝露がマウスの次世代認知機能におよぼす影響について

被験動物:交配済み雌マウス(C57BL/6J・日本クレア)を 50 匹購入し、1 群 10 匹の 5 群に分け、GD13 から PND20 まで PTU の強制経口投与(1日1回・出産後も母動物にのみ投与)を行なった。出生児マウスの成長後に行動測定に使用した。出生翌日(PND1)に同腹児数を 8 匹に調整(可能な範囲で雄 4 匹・雌 4 匹、総出生児数 8 匹未満の場合はそのまま)した。離乳(PND21)後は、通常飼料(オリエンタル酵母 MF)を与えて 24 週齢まで集団飼育(4 匹/ケージ)した。行動試験には、雄の産児が得られた母動物から、測定対象に各群 8 腹がランダムに選ばれるようにするとともに、各腹から雄性児 1 匹をランダムに選び用いたが、この条件では雄性児が得られない場合があり、対照群 6 匹、10 mg/kg 曝露群 6 匹、20 mg/kg 曝露群 6 匹、40 mg/kg 曝露群 8 匹、80 mg/kg 曝露群 7 匹、合計 33 匹の雄性児を最終的に解析に使用した(同腹児をいれて合計 40 匹を訓練したが、同腹児データは解析に使用しなかった)。

雄性児は 24 週齢で行動試験に使用する個体を確定し、食餌強化による SCOB 行動測定のため給餌制限と個別飼育を開始した。SCOB の測定では、食餌を報酬とするため、個体別に飼育して給餌量を制限・調整することが必要となるが、これまでの結果に基づ

き、給餌制限開始前の体重の 85%体重(目標体重)を維持するよう調整した。飲料水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。給水瓶にはガラス製を使用した。

実験に用いたマウスは、すべて温度 23 ± 1°C、湿度 55 ± 5%の清浄環境下で飼育され、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施された。飼育にはポリカーボネート製ケージを使用した。

プロピルチオウレア投与：PTU (6-n-propyl-2-thiouracil, Sigma 社、純度 99%以上)の用量は 0 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kgとした。用量は、予備実験により産児数が極端に少なくなる範囲の上限を最大用量とした。また公比を 2 とし、他の 2 用量を決定した。コーン油を溶媒とし、投与量は 10 ml/kgとした。

SCOB 測定装置：上述の2.ビスフェノール A に関するマウスの実験と同じ装置を使用した。

SCOB の測定手続き：基本的に上述の2.ビスフェノール A に関するマウスの実験と同じ手続きを使用した。タイムアウト付交替型混合スケジュールの訓練では、訓練第 3 段階のセッション数を合計 60 セッションとした。その後、薬理的負荷試験を実施した。

SCOB における反応の指標：2.ビスフェノール A に関するマウスの実験と同様の指標を用いた。すなわち、FR 及び DRO 反応率(1 分間当りのレバー押し反応頻度)、「Accuracy」、「Bias」である。

薬理的負荷試験：2.ビスフェノール A に関するマウスの実験と同様の方法とした。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 アゴニスト)、(±) SKF38393 (D1 アゴニスト)を使用した。

統計解析：2. BPA に関するマウスの実験と同様の方法とした。母マウスの摂餌量、児マウスの体重については、群間 1 要因(BPA) 群内1要因(測定日)として反復測定分散分析を実施した。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。以上では、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 プロシージャーを使用した。

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。

●今井 清：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

Sprague-Dawley 系ラット Crl: CD(SD)妊娠 7 日目～分娩後 20 日に亘り DES 0.2、2.0 あるいは 20 ng/kg を強制経口投与した。出生児動物のうち、7 か月の観察期間中に性周期異常が認められた対照群の 1 例、0.2 ng/kg 投与群の 5 例、2.0 ng/kg 投与群の 4 例、20 ng/kg 投与群の 3 例に加え、各群から正常な性周期を示す 5 例を追加して、組

織学的な検索対象動物とした。これらの動物を安楽死させたのち剖検して、脳組織を採取した。脳はホルマリン固定後、主に視床下部(前腹側室周囲核および内側視索前野)を中心に組織片を切り出してパラフィン包埋し、いずれも HE 染色をしたほか、免疫組織化学的手法により GnRH および ER α を染色した。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。

<GnRH>

- ・抗原賦活化:プレッシャークッカー 125°C 5min. Tris-EDTA buffer pH9.0
- ・1次抗体:Mouse anti-GnRH monoclonal antibody (HU11B) (SANTA CRUZ BIO-TECHNOLOGY 社 sc-32292) dilution : 1/50
- ・洗浄:TBST
- ・EnVisionTM+ Dual Link (Dako 社)
- ・発色:DAB Reagent Set (KPL 社)

<ER α >

- ・抗原賦活化:プレッシャークッカー125°C 5 min. Tris-EDTA buffer pH9.0
- ・1次抗体:Mouse anti-estrogen receptor monoclonal antibody (NOVOCASTRA 社 NCL-ER-6F11) dilution : 1/80
- ・洗浄:TBST
- ・EnVisionTM+ Dual Link (Dako 社)
- ・発色:DAB Reagent Set (KPL 社)

(倫理面への配慮)

動物の飼育および取り扱いに際しては「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「財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」に従い適正に使用した。

2)免疫

●林 良夫: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

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 26 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。卵巣摘出は、6 週齢の雌マウスを用い、麻酔下にて背部より切開することにより両側の卵巣を摘出後、腹膜および皮膚を適切に縫合した。対照マウスには切開縫合のみを施した。ダイオキシン投与に関しては、2,3,7,8-Tetra-chlorodibenzo-p-dioxin (TCDD、Cambridge Isotope Lab. Ins.)を各濃度(100 及び 1000 ng/kg 体重)にて卵巣摘出マウス及び対照マウスに腹腔内投与後、2、4ヶ月(4、6ヶ月齢)にて末梢血を採取し、6ヶ月後(8ヶ月齢)にて屠殺、解析を行った。基剤としてコーンオイルを用いた。

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、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 m 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らの分類及び Kohashiらの報告した分類に従って評価した。

3)フローサイトメトリー解析

501mL の末梢血を採取し、0.83%塩化アン

モニウム水溶液にて溶血後、T 細胞分画あるいは活性化マーカー (CD44、CD25、CD69、CD62L) に対する抗体を反応させ、固定、有機溶媒処理、洗浄後にフローサイトメーターにて解析した。また、各群における全てのマウスから胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後、各種抗体と反応させ、3%パラホルムアルデヒドにて固定、有機溶媒に浸染した後に、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イムノグロブリン分画、各種サイトカインの濃度を 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

各組織に関して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 Engin Cyler 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。

<AhR>

F:5'-CAA AGG GCA GCA GCT TAT TAT TCT GGG-3',
R:5'-AAG CGT GCA TTG GAC TGG AC-3',

<CYP1A1>

F:5'-CCA TGA CCG GGA ACT GTG G-3',
R:5'-TCT GGT GAG CAT CCT GGA CA-3',

<T-bet>

F:5'-CCT GTT GTG GTC CAA GTT CAAC-3',
R:5'-CAC AAA CAT CCT GTA ATG GCT TGT-3',

<GATA-3>

F:5'-GAC TTG CCA GAA AGG CAG AC-3',
R:5'-AAA GAG GTC ACC ACC CAC AG-3',

<RORrt>

F: 5'-GCG GAG CAG ACA CAC TTA CA-3',
R:5'-TTG GCA AAC TCC ACC ACA TA-3',

<NF-κB>

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

<SP-1>

F:5'-GGC TCT GAA ACT CAG GCA GA-3',
R:5'-TGC AAA CTC ATC CAC GTT GT-3',

<AIRE>

F:5'-TCT GCT AGT CAC GAC CCT GTT C-3',
R:5'-GGC GTG ACA TGC TCT GGA T-3',

<SP-1>

F:5'-GGC TCT GAA ACT CAG GCA GA-3',
R:5'-TGC AAA CTC ATC CAC GTT GT-3',

<GAD67>

F:5'-TGC AAC CTC CTC GAA CGC GG-3',
R:5'-CCA GGA TCT GCT CCA GAGAC-3',

< b-actin >

F:5'-GTG GGC CGC TCT AGG CA-3',

R:5'-CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3',

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所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。

●武吉 正博：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

1. 交配

CBA/JN Crj(日本チャールスリバー株式会社)を雌雄 7 週齢で購入し、5 日以上検疫を行った後、雄 1 匹、雌 2 匹を一晩同居させ交配させた。交尾確認はプラグが確認できた雌について交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日(P0)とした。

2. 被験物質、投与期間および投与経路

Bisphenol A (BisA, Lot No. ALP4850、和光純薬工業株式会社)を用い、媒体としてコーン油(Lot No. PEG0519、株式会社フヂミ製作所)を用いた。

投与は妊娠 5 日から BisA を高用量群 50 mg/kg/day、低用量群 50 µg/kg/day にて母動物に経口投与し、媒体対照群(VC)としてオリーブ油を投与する群を設けた。各群の母動物数は 12 匹とし、投与は毎日午前中に、離乳日(分娩 21 日)まで行った。

3. 離乳

仔動物は分娩後 21 日に離乳を行った。

4. 検査

1) 母動物

一般状態および哺育状態は投与開始日から解剖日まで毎日 1 回以上観察した。体重は P0、5、12、19 日、分娩後 0、4、7、14、21 日に測定した。妊娠動物は全例を自然分娩させ出産率、妊娠期間を求めた。

2) 仔動物

出生日に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、性別の検査を行った。一般状態については離乳日まで毎日 1 回以上観察した。体重は出生日から 1 週間に 1 回測定した。

5. LLNA

仔動物 8~10 週齢時に雌雄それぞれ同一投与群の仔動物を乱数による無作為抽出から群分けを行い、LLNA における媒体としてアセトン/オリーブ油混液(AOO)及び感作性陽性対照物質として 0.5% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)を動物の両耳介に 25 µL ずつ 3 日間連続塗布を行った。最終感作の約 48 時間後に 10 mg/mL の 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を腹腔内投与した後、その約 24 時間後に解剖し、耳介リンパ節を採取した。ELISA 法により採取したリンパ節における BrdU 取り込み量の測定を行った。

各個体の BrdU 測定値を算出した後、媒体対照群、BisA 低用量群及び BisA 高用量群の各 AOO 群の平均値を算出した。各個体の BrdU 測定値を同一母動物投与群の AOO 群の平均値で除した数値(Stimulation Index, SI)を算出した後、0.5%DNCB 群の平均 SI 値及び標準誤差を算出し、母動物に対する BisA 投与量を要因とした一元配置分散分析(One-way ANOVA)を実施し有意差の有無を検討した。