

3) 生殖器

●長尾 哲二: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

1. 精巣下降に関する実験

ICR マウスの妊娠 9~17 日(膣栓=妊娠 0 日)の連日に、低用量のビスフェノール A (bisphenol A: BPA)の 2~200 µg/kg 体重、Nonylphenol (NP) 12.5~50 mg/kg 体重、Butylbenzylphthalate (BBP) 25~100 mg/kg 体重あるいは陽性対照として Ethinylestradiol (EE) 50 µg/kg 体重を強制的に経口投与して、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た。左右の腎臓~膀胱間距離(100 U)および精巣~膀胱間距離(The degree of testicular ascent: DTA)を計測して DTA/100 U を求めた。次いで精巣下降の制御に関連する遺伝子群 Insl-3、SF-1 あるいは P450scc について胎児精巣を材料として mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。さらに抗アンドロゲン剤であるフルタミド(flutamide: Flu) 2.5~5 mg/kg 体重を同様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 mRNA 発現について調べた。

2. DNA 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 あるいは EE 1.0 µg/kg 体重を背部皮下注射した。胎齢 13 日の胎児性腺について、DNA メチル化酵素(Dnmt) 1、3a、3a2、3b ならびに 3L 遺伝子 mRNA の発現を real-time PCR により解析した。また、DNA メチル化レベルを Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit (Epigentek Inc.)を用いて測定した。さらにバイサルファイトシーケンス法を用いてインプリント遺伝子 H19

プロモーター領域の DNA メチル化パターンの解析を行った。

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、麻酔薬の使用など苦痛の少ない方法を用いた。

●太田 亮: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

Diethylstilbestrol (DES) の 0 (コーン油)、0.005、0.05、0.5 および 5 µg/kg/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 74 週齢まで体重を測定した。

【性成熟】雌は膣開口、雄は陰茎包皮分離を指標にして各完成日を調べた。

【性周期】8 週齢から 54 週齢まで膣スミアを採取し、性周期を観察した。

【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。

【生存率】生後 1 日から 110 週齢まで生死および一般状態を観察し、生存日数を調べた。

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: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

1) 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

デミ製薬所 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～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。

2) 試験動物及び飼育環境

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。

3) 母動物

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

4) 児動物

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 ヶ月齢時に解剖し、下記の項目の検査・検体採取を行った。PND40 以降は膣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血清: prolactin、LH、FSH、E2 値測定用
- ②視床下部: RNAlater 保存 (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 及び prolactin 免疫組織化学染色用)
- ④卵巣: 重量測定、メタカーン固定 (病理組織用)
- ⑤乳腺: whole mount preparation
- ⑥子宮: 重量測定、10%ホルマリン固定 (病理組織用)
- ⑦膣: 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)

5) スミアによる性周期判定:

全ての出生児について 3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢まで性周期の観察を行った。14 日間連続膣スミア採取後、2 週間休止した。膣スミアは午前 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(発情期及び発情前期が3~7日継続)、constant estrus(発情期及び発情前期が8日以上継続)に分類した。2週間の観察期間の中で休止期の継続と発情期の継続が認められた場合には、発情期の継続を分類として採用した。また、いずれの分類区分にもあてはまらないが、不定期な性周期を示した個体についてはirregular estrusとした。

6)下垂体のGnRH受容体 mRNAの発現全RNAの抽出とcDNAの合成

下垂体を分離後すみやかにRNAlater(Ambion社)に浸漬し、RNaseを不活化し、RNA抽出操作まで-80℃にて保存した。RNAlaterを除いた後、RNeasy kit(キアゲン社)添付のRLT bufferを用いて組織破砕液を調製し、DNA定量用蛍光試薬であるPicogreenを用いて、破砕液中のDNA量を測定した。DNA量に応じて(Spike factor=0.003µL/ng DNA)、Spike RNA cocktail(Bacillus RNA 5種類のmix)を添加し、TRIzolを用いて粗抽出した液をRNeasy kitを用いて全RNA精製した。得た全RNAの0.5µgを電気泳動し品質を確認した。

全RNA 1 µgをオリゴdTプライマーを用いて逆転写しcDNAを作製した。

定量RT-PCR

96 well プレート、サンプル量 25µL とし、SYBR Green 試薬を用い、初期変性後(95℃、10sec)、ニーリング温度 60℃1sec でPCRを行った。定量は ABI PRISM 7900HT

(Applied Biosystems)を用いて行った。

Dissociation Stage により融解曲線分析を行い、primer dimer の無いことを確認した。

(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】部門

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、評価試験の基盤を固める。

●高木 篤也: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

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、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。

AhRを介した晩発影響解析に資するため、マウス肝の遺伝子発現解析実験を実施した。すなわち、雄C57BL/6マウス(10週齢)に2,3,7,8-TCDDを

1.0 μ g/kg の用量にて経口投与した。さらに、TCDD 誘発口蓋裂を DMSO が阻害することを以前、見いだしていたので、DMSO の影響についても調べるため、DMSO を TCDD 投与 24 時間後に 5ml/kg の用量にて単回経口投与した。DMSO 投与、2、4、8 及び 24 時間後に肝を採取、上記と同様に Percellome 手法によるマイクロアレイ解析を実施した。なお、動物への投与実験は(株)イナリサーチにて委託して実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、当該施設の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用など苦痛の少ない方法を用いる。

●藤本 成明:新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究

1) 動物

生後 5 日目および 8 週齢の C57BL 雄マウスを Charles River Japan より購入した。生後 6 日目で、Testosteronpropionate (TP) 4 mg/kg bw (body weight) および 17 β -estradiol (E2) 0.5 及び 10 μ g/kg bw を i.p. 投与した。8 週齢マウスは去勢し、1 週間後に TP 4 mg/kg bw および E2 を 10 μ g/kg bw で i.p. 投与した。投与後 24 時間で屠殺し、前立腺組織については、実体顕微鏡下で、腹葉(VP)、背側葉(DLP)、前葉(AP)を解剖学的に区別して保存した。

2) mRNA 定量

RNAlater 中に保存した前立腺の各葉の組織をホモジナイズし、RNA 抽出ミニキットに

より全 RNA を精製した後、MMLV-RT による逆転写で、cDNA 化した。SYBR Green 法による real time PCR 法により、mRNA 発現を定量した。内部標準として β actin の mRNA を定量した。

3) レポータープラスミド

PSP94、EAPA2 の遺伝子上流域を、高正確性 Taq を用いて PCR クローニングし、それを luc 遺伝子 (pGL3-B) 上流に挿入した。作成した luc レポータープラスミドに対し、site-directed mutagenesis 法を適用して、目的遺伝子領域に点変異、欠失変異をもつレポーターを作成した。ヒト型エストロゲン受容体 α 、 β およびアンドロゲン受容体の発現プラスミド (pSG5-hER α 、pSG5-hER β 、pSG5-hAR) については既報である。

4) 細胞培養

CHO、NIH3T3 細胞株は、dextran-charcoal treated FBS 5% を含むフェノールレッド不含の DMEM で培養した。プラスミド DNA は、リポフェクション法によりトランジェントに導入した。ジヒドロテストステロン (DHT) 及び 17 β -estradiol (E2) を添加 24 時間後に細胞を溶解し luc 活性を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、苦痛の少ない方法に留意する等、広島大学の動物取り扱い倫理規定に沿っておこなった。

●五十嵐 勝秀: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

<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)を添加したものを、10cm シャーレ(ヌンク社)に10⁶個/6ml の密度で生細胞を播種する。翌日 bFGF を半量添加、翌々日培地交換のサイクルを繰り返し、未分化状態での細胞増殖を促した。

<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 の分離精製を行った。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。

<Promoter array data 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。

<Bisulfite sequencing>

ゲノム DNA 1µg を Methyl Easy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit(タカラバイオ)を用い bisulfite 処理し非メチル化シトシンをウラシルに変換した。変換後の DNA を鋳型に PCR によって解析対象領域を特異的に増幅し、T vector に組み込んだ。得られたクローンを各 12クローンずつシークエンスし、メチル化状況を QUMA (Quantification tool for Methylation Analysis:理化学研究所公開ツール)を用いて解析した。

●藤井 義明: AhR の生理機能と炎症応答・小児期個体における役割

APCmin/+、APCmin/+AhR-/+ 及び APCmin/+AhR-/-マウスを用いて腸に癌を発症させる。この実験系で AhR のリガンドである indole 3-carbinol (I3C)、dimethyl-indolyl methane(DIM)を食餌に混入して離乳期より与え、腸における癌の発症が AhR のリガンドの投与によって抑制されるかを検討する。また、β-カテニンの発現を免疫組織学的方法で調べて、AhR のリガンドによって β-カテニンの発現の減少が起こるかを検証し、β-カテニンの AhR によるユビキチン化、分解系が働くかを明らかにし、AhR のリガンドによって癌の発症が抑制されるかを検証する。また、AhR によって発現が促進され、AhR の転写活性を阻害する AhRR の作用メカニズムについて COS 細胞や HeLa 細胞を用いて、DNA トランフェクション法あるいはトランスフォーマントを作成する事によって行い、AhRR の SUMO 化が AhR の転写活性にどのような影響を及ぼすかについて検討する。

●西川 淳一 淳一: 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 NFκB の相互作用の分子解

細菌感染モデルマウスでの CYP の発現

8 週齢の BALB/c 系雄マウス(n=5)に LPS (1 mg/kg)を腹腔内投与して免疫系を活性化した後、27 時間後に肝臓を摘出し、CYP3A11、CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 の mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。

I 型アレルギーモデルマウスでの CYP の発現

8 週齢の BALB/c 系雄マウス(n=5)に ovalbumin (OVA) 2 mg/mL と Freud's incomplete adjuvant (FIA) を等量混ぜたエマルジョンを 50 μ L 投与し感作させた後、2 週間後に 0.1mg/mL の OVA を 100 μ L 投与してアナフィラキシーを惹起させた。OVA 投与 3 時間後に肝臓を摘出し、CYP3A11、CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 の mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。

炎症性サイトカインの発現変動

感染症と I 型アレルギーの動物実験系において、免疫系の活性化が正常に起きていることを確認するために、炎症性サイトカインの TNF α と IL-1 β について mRNA 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

SYBR Primer Ex Taq II (タカラバイオ) を用い、初期変性後(95 $^{\circ}$ 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。

肝代謝能の測定

感染症モデルマウス及より摘出した肝臓のミクロゾーム分画を調整した。ここにテストステロン及びニフェジピンを加え、NADPH 存在下でインキュベートし、有機溶媒で抽出後、HPLC による分析を行った。

【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】

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: 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

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、そこから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、分析することとした。

●小野 敦: 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研究

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・ガイドライン化を進めるために 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 7 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を調査し、さらに関連する各国専門家と今後の方向性について議論した。

委託研究

高感受性集団へ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. ER、AR 結合強度予測計算

国立医薬品食品衛生研究所より供与された約 1,500 件の化合物リストについて、計算対象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。

蛋白質-リガンド自動ドッキングプログラム ADAM を用いて、計算対象化合物と標的受容体と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。

2. ER 予測システムを利用した *in silico* スクリーニング

ER 結合強度予測のため、平成 15 年度に構築・検証した以下の式を使用し logRBA の推算をした。

$$\log RBA(ER\alpha) = -1.668GBelc - 0.448GBrep - 0.229GBcnf - 0.148Desolv - 4.749(1)$$

GBelc, GBrep, GBcnf, Desolv: 結合自由エ

ネルギー計算で算出される各エネルギー項
GBelc : GenB で計算される分子間静電相互作用エネルギー

GBrep : GenB で計算される分子間立体相互作用エネルギー

GBcnf : GenB で計算されるリガンドの結合に伴う回転結合自由度の束縛効果

Desolv : Desolv で計算されるリガンド、蛋白双方の複合体形成に伴う脱溶媒和

3. AR 予測システムを利用した *in silico* スクリーニング

AR 結合強度予測には、これまでの検討結果から 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。AR 予測モデルにおいて logRBA 推算のために用いた式を以下に示す。

1t63:

$$\log RBA(AR-1t63) = -2.213 GBelc - 0.418 GBrep - 0.021 GBcnf - 0.106 Dlig - 0.203 Desolv + 0.125 GBsole + 0.091 GBsolb - 5.523(1)$$

2pnu:

$$\log RBA(AR-2pnu) = -2.381 GBelc - 0.479 GBrep - 0.238 GBcnf - 0.122 Dlig - 0.133 Desolv + 0.066 GBsole - 5.880(2)$$

GBelc, GBrep, GBcnf, Dlig, Desolv, GBsole, GBsolb: 結合自由エネルギー計算で算出される各エネルギー項

GBelc : GenB で計算される分子間静電相互

作用エネルギー

GBrep : GenB で計算される分子間立体相互作用エネルギー

GBcnf : GenB で計算されるリガンドの結合に伴う回転結合自由度の束縛効果

Dlig: Bluto で計算されるリガンド分子内エネルギー変化(単独存在時と蛋白結合時とのエネルギー差)

Desolv : Desolv で計算されるリガンド、蛋白双方の複合体形成に伴う水素結合変化

GBsole: GenB で計算されるリガンド脱溶媒和エネルギー

GBsolb: GenB で計算される蛋白脱溶媒和エネルギー

(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、麻酔薬の使用し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

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:総括

OECD 対応を含む内分泌かく乱化学物質(EDCs)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)2009年9月OECDのEDTA(内分泌攪乱物質試験法特別研究班)が開催した内分泌かく乱物質の対策に関するワークショップ(Copenhagen, Denmark)に参加し、研究の現状と今後の展望に関する討議を行った。EDCs試験法の概念的枠組み“Conceptual Framework”は、試験法のToolboxであり、このまま修正せず使用することとされたが、EDCsの確定試験法の確立を急ぐことが強く要望された。動物実験でこれまであまり注目されてこなかった指標として、雄の乳腺、グルココルチコイド系が指摘され、AhR、PPAR、内分泌関連核内受容体、そして生殖機能の早期老化の問題も注目を集めた。

(2)OECDではまた、「拡大一世代生殖毒性試験 Extended One Generation Reproductive Toxicity Test」のガイドライン策定が進められており、その作業に参加した。これは、主として農薬等に要求されてきた繁殖能に対する影響の試験を改良し、使用動物数を削減しようとするものであるが、発生早期からの化学物質の曝露が、内分泌・生殖系、神経系、免疫系の発達に及ぼす影響を試験するものであるから、われわれの目指している高次調節系のかく乱性の試験と近いものとなる可能性がある。ガイドライン案は最終に近づいており、2010年3月のWNT(代表者会議)に提案された。

●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)

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、ラットで低用量データを得ている Bisphenol A (BPA)、Diethylstilbestrol (DES)及び Genistein(GEN)に引き続き、(2)マウス子宮内・経乳汁低用量化学物質(BPA、DES及びGEN)曝露により誘発される出生児の免疫機能異常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・授乳期曝露をモデルとし、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樞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曝露による自己免疫発症の有無、及びマウス経胎盤・経母乳 BPA 投与による出生児の免疫系への影響を Local Lymph Node Assay を用いて検討することとした。

内分泌系に関しては、周産期化学物質曝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 TCDD 及び DMSO 投与による肝臓遺伝子の網羅的解析、マウス新生児期の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)マウスを用いた低用量化学物質(BPA、DES 及び GEN)の子宮内・経乳汁暴露による免疫毒性試験(委託先:財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)。

BPA、DES あるいは GEN をマウス妊娠6日目から離乳 20 日目まで強制経口投与した。出生児の哺育期間中及び離乳後の一般状態に被験物質投与の影響は認められなかった。体重の変化は、雄性児では BPA 50 µg/kg 投与群の生後 35 及び 42 日、雌性児では BPA 50 µg/kg 投与群の生後 42 日体重に有意な低下、DES 0.02µg/kg 投与群の生後 28 日体重に有意な増加が認められた。性成熟観察において、包皮分離では BPA 50 µg/kg 投与群の完成日体重に有意な低下、膈開口では BPA 50 µg/kg 投与群の完成日数に有意な遅延が認められた。

免疫学検査では、9 周齢時に実施した

SRBC に対する抗体価、胸腺及び脾臓重量に、被験物質投与の影響は認められなかった。10 周齢時に実施した胸腺及び脾臓重量、細胞増殖の活性には対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。イムノフェノタイピングでは、雄性児の DES 0.02 µg/kg 投与群において、脾臓で CD4 抗体陽性/CD8 抗体陰性細胞の有意な増加が認められた。白血球分類では、雄性児の DES 0.02 µg/kg 投与群及び GEN 100 µg/kg 投与群において、単球の有意な減少が認められた。サイトカイン測定では、雌性児の DES 0.002 µg/kg 投与群において、コンカナバリン A 2.5 µg/mL 添加時の胸腺で IL-4 濃度の有意な低下が認められた。何れの有意所見もその生物学的意義については更なる確認が必要であると結論された。

【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】部門

神経系-内分泌系-免疫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 暴露による中枢神経系の発達に及ぼす影響

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 21 年度は、マウス経胎盤・経母乳 BPA 暴露により雄性児の海馬歯状回において、doublecortin(DCX)及び NeuroD 陽性細胞の減少がみられた。そこで、BrdU 投与により新生細胞を同定したところ、BrdU 及びオリゴデンドロサイトのマーカーである Olig 2 陽性細胞の共局在が認められた。これらのこと

から、海馬歯状回においては神経新生の抑制ならびにグリア細胞新生の亢進が示唆された。

●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

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・確認を行った。

平成 21 年度は、ラット及びマウス経胎盤・経母乳低用量 BPA 暴露の次世代認知機能への影響を SCOB 法により調べた結果、前回ラットで示された学習過程への影響(反応抑制の遅延)は今回示されなかったが、マウスでは学習習得過程で有意に高い反応率(前回は有意とならなかったものと同様の傾向)が観察された。また陽性対照物質 propylthiouracil (PTU) の影響をみる実験をマウスで実施し、学習習得過程での影響が認められたものの、昨年度ラットで認められた短期記憶の保持過程に対する影響を示すことはできなかった。

●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

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から下垂体に至る制御機構との関連を明らかにする。

平成 21 年度は、低用量 DES をラット経胎盤・経母乳暴露し、7ヶ月齢の雌性児の視床下部前腹側室周囲核、性的二型核及び弓状核における ER α 陽性細胞及び GnRH 陽性神経線維を免疫組織化学的手法を用いて検索した。その結果、ER α 陽性細胞数は、

視床下部前腹側室周囲核、性的二型核及び弓状核において対照群に比較し DES 投与群との間で有意な差は認められなかった。しかし、解剖時に性周期異常がみられた動物では、前腹側室周囲核において減少する傾向が認められ、性的二型核においては増加する傾向にあった。一方 GnRH 陽性神経線維は、視床下部前腹側室周囲核、性的二型核及び弓状核において対照群と DES 投与群の間で差は認められなかった。

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

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。昨年度までは、NFS/sld マウスに、その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ところ妊娠後期の投与により6ヶ月齢で、唾液腺に局限した炎症性病変が観察された。

平成 21 年度は、妊娠期に低下するエストロゲンに着目し、卵巣摘出 NFS/sld マウスに TCDD を暴露し、免疫系への影響を検討した。その結果、TCDD 投与後4ヶ月後の末梢血単核球における CD4 及び CD8 の陽性細胞数(%)は、Ovx 群、Sham 群に差はみられなかった。唾液腺(顎下腺)の病理組織学的所見は、卵巣摘出(Ovx)群及び対照(Sham)群及び TCDD 100 ng/kg 投与では差はみられなかったが、TCDD 1000 ng/kg 投与では重篤な炎症性病変が認められ、その機序として胸腺での T 細胞分化の異常及

び末梢のT細胞のIFN-g産生の亢進が認められた。

●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

マウス周産期EDCs暴露による免疫系に対する影響評価法としてマウス局所リンパ節増殖試験(Local Lymph Node Assay, LLNA)を用いた検証実験を実施した。

平成21年度は、マウス経胎盤・経乳汁低用量BPA暴露により、雄性児に2,4-dinitrochlorobenzeneに対する感作性応答の亢進が認められた。

3)生殖器

●長尾 哲二：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物学的解析研究

マウス胎生期EDCs暴露が雄性生殖器に及ぼす影響を検出する評価手法の確立を目的とする。

平成21年度は、1)精巣下降に関しては、マウス胎児期に低用量BPA、Nonylphenol (NP)、Butylbenzylphthalate(BBP)あるいはFlutamide(Flu)を曝露した結果、BPA投与群ではDTA/100Uが増加する傾向がみられた。またInsl-3 mRNA発現は対照群と比較し差はみられなかったが、SF-1及びP450scc mRNAは減少傾向にあった。NP投与群は、DTA/100Uが増加する傾向にあり、Insl-3 mRNA、SF-1 mRNA及びP450scc mRNA発現は減少した。BBP投与群では、DTA/100Uが有意に増加した。Insl-3及びSF-1 mRNA発現は対照群と比較し変わらなかったが、P450scc mRNA発現は減少傾向にあった。Flu投与群では、DTA/100Uが有意に増加した。Insl-3 mRNA発現は対照群と比

較し変わらなかったが、SF-1 mRNA及びP450scc mRNA発現は減少した。2)胎児性腺のDNAメチル化制御に関しては、DES及びEEの胎児期曝露は胎児精巣のDnmt mRNA発現を増加した。DES投与群ではDnmt 3b mRNAに有意差が認められた。さらに胎齢13日の生殖細胞(前精原細胞)におけるゲノムDNAを用いてゲノムワイドなDNAメチル化レベルを測定したところ、対照群と比較して高メチル化状態であった。EE投与群では、H19遺伝子プロモーター領域における12箇所のCpG部位のメチル化率の増加がみられた。

●太田 亮：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

齧歯類の周産期EDCs暴露による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評価法の確立を目的とし、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21年度は、マウス新生児期にDESの0.005~5 µg/kgを強制経口した。その結果、体重推移は、生後1日から10週齢までDES投与の影響は認められなかったが、10週齢以降に雌の体重が0.05 µg/kg以上の投与群で対照群と比較して有意な高値を示した。膣開口時期は、DES 5 µg/kg投与群で対照群に比較し有意に遅延した。包皮分離時期はDES投与の影響は認められなかった。性周期観察では、DES 5 µg/kg投与群の全動物が観察初期から連続発情を示した。DES 0.5 µg/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。15週齢時の雄の器官重量測定では、凝固腺がDES 0.005、0.5及び5 µg/kg投与群で、

精囊がDES 5 µg/kg 投与群で対照群に比較し有意に低下した。ヒツジ赤血球に対するIgM抗体産生能は、雄ではDES用量依存的に低下する傾向がみられ、DES 0.5 µg/kg以上の投与群で有意差が認められたが、雌では対照群とDES投与群との間に有意差は認められなかった。生存率は、雌のDES 0.05 µg/kg以上の投与群において生存日数が短縮する傾向がみられた。

●松島 裕子: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

ラット経胎盤・経母乳低用量BPAの暴露により性周期異常が誘発するメカニズムを解明することを目的とする。

平成21年度は、得られたサンプルについて6ヶ月齢の卵巢の病理組織学的検査、下垂体のGnRH受容体mRNAの測定、血清のprolactin、LH、FSH及びE₂値を測定した。

6ヶ月齢時に持続発情期を示した動物の卵巢の絶対及び相対重量は溶媒対照群に比し有意に低値であり、病理組織学的検査では卵胞(濾胞)嚢胞の形成と黄体形成不全がみられ、下垂体のGnRH受容体mRNAの発現が有意に低値であった。また、BPA投与群では血清prolactin、LH、及びE₂値に変動がみられた。

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】部門

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、評価試験の基盤を固める。

●高木 篤也: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

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EDCs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21年度は、1)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手法を用いて解析した結果、アンドロジェン受容体、コレステロール、エストロジェン、アンドロジェン合成に関与する遺伝子の発現がBPA添加1~2日後に一過性に増加し、また、long non-coding RNAであるmalat-1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)の持続的発現増加が認められた。さらに、Malat-1遺伝子の胎児での発現部位を明らかにするため、6.5から9.75日のマウス胚を用いたwhole mount *in situ* hybridizationを行ったところ、6.5日胎児の栄養外胚葉(trophoectoderm)を除いて明らかな局在は見られなかった。

2)TCDD投与マウス肝の遺伝子発現解析実験ではTCDD投与後、*cyp1a1*、*Ugdh* (UDP-glucose dehydrogenase)、*Notch1*、*Nqo1* (NADPH dehydrogenase、*quinone1*)等の遺伝子発現が顕著に増加した。また、DMSOは*Mbd1* (methyl-CpG binding domain protein 1)と*Socs2* (suppressor of cytokine signaling2)を一過性に増加させた(委託試験)。

●藤本 成明:新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究

マウス新生児期の前立腺形態形成において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、転写メカニズムを明らかにし、それに対する化学物質の修飾作用を解

明する。

平成 21 年度は、1) 生後 6 日目及び 9 週齢動物に Testosterone propionate (TP) 投与後 24 時間目に、前立腺アンドロゲン応答遺伝子である SBP、SPI-KT3、PSP94、EAPA2 の優位な発現上昇が観察された。このとき同時に E2 投与により、生後 6 日目動物ではアンドロゲン応答遺伝子の抑制がみられたが、9 週齢では発現レベルに低下はみられなかった。2) PSP94 遺伝子のアンドロゲン応答性プロモーターを同定した。3) PSP94 遺伝子アンドロゲン応答性転写への ER の作用をみるため、PSP94 プロモーターレポーター系に ER α 及び ER β の発現プラスミドをコトランスフェクションした。その結果、ER の導入は、PSP94pro-118 によるアンドロゲン応答性転写活性には影響を与えなかったが、PSP94pro-1202 によるアンドロゲン応答性の転写活性を上昇させ、この転写活性化は ER α でのみ観察された。また、ER α +AR のアンドロゲン応答に対して、E2 を投与すると、用量相関性をもって PSP94 転写活性を低下させ、この作用は ER α 依存的にみられた。これらから、エストロゲン受容体 α の発現がアンドロゲン応答性の転写活性に関係していることが分かった。

●五十嵐 勝秀: 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

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 21 年度は、マウス胎児神経幹細胞で脱メチル化されている DNA 候補領域を複数同定した。マウスでは、胎生 14 日から神経幹細胞がアストロサイト分化能を獲得し始め、これに伴い DNA メチル化変化が生じることが明らかになっている。そこで、メチル化 DNA

断片の濃縮法を活用した ChIP on Chip 法を用いて胎生 11 日と胎生 14 日の DNA メチル化状況を網羅的に比較し、胎生 14 日で脱メチル化されている DNA 候補領域を複数同定した。いくつかの領域について、Bisulfite sequencing による検証を行った結果、1 番染色体の Pou3f3 遺伝子近傍の DNA 領域が、胎生 14 日で脱メチル化されることを確認した。

●藤井 義明: AhR の生理機能と炎症応答・小児期個体における役割

ダイオキシンに代表される多環性芳香族化合物の毒性作用は、AhR によって仲介されることから、AhR による生理機能の発現のメカニズムを理解することが重要である。そのような観点から AhR の大腸癌抑制と抗炎症作用の分子メカニズム、免疫現象における役割及び他の受容体型転写因子との相互作用について検討する。

平成 21 年度は、AhR の新しい機能として E3 ユビキチンリガーゼとしての働きは腸において、 β -カテニンを分解して癌抑制因子として働いている事が分かった。腸では、AhR と APC による 2 つの β -カテニンの分解による癌抑制因子系が働いている事が明らかになった。AhR と APC の癌抑制因子系は協調的に働いており、一つの系が欠失すると癌が発症するし、両方が欠失するとさらに癌になり易さが増強される。しかし、APC の変異によって腸癌の発症し易くなった APC^{min/+}マウスに AhR のリガンドを食餌に混ぜて与えると β -カテニンの発現が著しく阻害され癌の発症は顕著に抑制される事が分かった。

AhR の転写活性のフィードバック的抑制因子として発見された AhRR の阻害作用が SUMO 化によって調節される事が明らかになった。転写活性化に働く Arnt のパートナー

分子である AhR の存在では Arnt の SUMO 化は起こらないことから AhRR と Arnt の SUMO 化は抑制因子複合体形成に特異的である事が分かった。また SUMO 化によって AhRR の Co-repressor である ANKRA2、HDAC4、HDAC5との結合性が増強される事も明らかになった。

●西川 淳一: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

感染症や炎症による免疫系の賦活化が肝薬物代謝能を変化させ、薬物相互作用や副作用の発生を引き起す可能性が考えられることから、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 21 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た。細菌感染モデルマウスの肝臓では、CYP3A11、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2mRNA の発現抑制、CYP2B10 の発現増加が認められた。同様に、I 型アレルギーの CYP 遺伝子発現は、CYP3A11、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 について若干の変動が認められたが、有意差はみられなかった。しかし、CYP2C10 は、LPS と同様に 5 倍以上の発現増加が認められた。LPS 投与マウスの肝ミクロソームを用いた薬物代謝能試験では、テストステロン及びニフェジピンの代謝クリアランスの減少が認められ、CYP3A の遺伝子発現に相関した肝抽出液中の薬物代謝酵素の活性変動が認められた。炎症性サイトカインの発現変動を感染症モデルマウスとI型アレルギーモデルマウスについて調べたところ、TNF α と IL-1 β の発現量はいずれのモデルにおいても上昇が認め

られ、NF κ B が活性化していることを確認した。これらのことから、感染による免疫系の活性化は、ほとんどの場合は薬剤の代謝速度を減少の方向に向かわせるが、特定の CYP 分子種については発現が増加し、そのような CYP によって代謝される薬剤については代謝速度が亢進することを示唆している。

【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

OECD、WHO 等の国際機関にお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: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

主たる課題としては、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と、本邦における EDCs 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、副次課題として、本邦としての関連の独自の情報の発信や提案を行うことを担当した。

●小野 敦: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

高感受性集団に対する有害性検出手法について、国際動向の調査と我が国における今後の開発方針を検討する目的で、OECD-EDTA のもとに設置された試験法検証グループのうち平成 20 年度、平成 21 年度に開催された VMG-NA(非動物試験検証管理グループ)及び ED-QSAR グループに参加し、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・評価法開発の状況について

て調査を行った。

委託研究

高感受性集団へ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)

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き、化学物質の結合様式の推定ならびに結合性予測を行った。

平成 21 年度は、国立医薬品食品衛生研究所より供与された化合物リストに従い約 1,500 化学物質について予測計算を実施した。ER 結合モデルでは 1,059 化合物についての予測結合値を得ることが出来た。また、AR 結合モデルでは、1 段階目の 1t63 構造において 953 化合物について、さらに 1t63 構造で安定構造が計算されなかった化合物のうち 45 化合物について 2pnu 構造において結合予測値の計算に成功した。

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、特に受容体原生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枢神経系に及ぼす影響とエ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オペラント条件付けによ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(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)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、及びマウス経胎盤・経母乳 BPA 投与による出生児の免疫系への影響を Local Lymph Node Assay を用いて検討し、影響評価法としての有用性が得られた。

内分泌系に関しては、周産期化学物質暴露の影響を従前の生殖毒性に限定せず、生

殖関連臓器の形成、発達、機能、その加齢変化に対する影響、及び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TCDD及びDMSO投与による肝臓遺伝子の網羅的解析、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、クオリティー・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的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動性化学物質のうち、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 $\mu\text{g}/\text{ka}/\text{day}$ 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)DES の低用量による同様の影響の確認。(4)宮川分担研究者による、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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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) 大向英夫、太田 亮、宮原 敬、豊泉友

康、丸茂秀樹、小野 宏: 新生児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. 内分泌攪乱化学物質学会 第 12 回研究発表会, 2009 年 12 月(東京) 要旨集 155 ページ

2) 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. 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

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. 分担研究報告書

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2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3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、Bisphenol A(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用物質の代表として Genistein 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 等の国際活動に提供した。2009年9月22～24日には OECD-EDTA Workshop on OECD Countries Activities Regarding Testing, Assessment and Management of Endocrine Disruptors (OECD 参加国による内分泌かく乱化学物質に関する試験と評価法開発に関するワークショップ) (デンマーク環境防護庁・コペンハーゲン・デンマーク) に招聘され、成果発表とそこでの論議に参加した。また、同11月11～13日には BfR-Workshop: Substances with

endocrine disrupting properties under the new EU plant protection product regulation – establishment of assessment and decision criteria (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin)に招聘され、国際的エキスパート論議に参加した。

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纏めを行うと共に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、既に実施し、低用量影響データを得ているBPA及びDESに引き続き、(2)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(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

【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曝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