

2009 41002B

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 19 年度～21 年度

総合研究報告書

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19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 小野 宏

平成 22(2010)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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

(資料) 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

【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

(資料) 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

(資料) 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

(資料) 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—

2) 免疫

(資料) 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

(資料) 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

3) 生殖器

(資料) 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

(資料) 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

(資料) 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

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

(資料) 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

(資料) 新生児化学物質曝露の前立腺影響の解析研究

(資料) 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

(資料) AhR の生理機能と炎症応答・小児期個体における役割

(資料) 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】

(資料) 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

(資料) POPs を中心とした有害性評価手法における高感受性集団に関する国際動向調査研究、及び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

(資料) 委託研究

1. ERレポーター遺伝子測定－ER系へ作用する化学物質検出法の検証データの収集－
(委託先;財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所) (H20)
2. AhR、AR、TR系レポーター遺伝子測定－ARを介する作用に関する研究－
(委託先;大塚製薬株式会社) (H20)
3. ホルモン活性予測計算－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) (H20)
4. 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) (H21)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表.....63

III. 研究成果の刊行物・別刷.....71

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

I. 総合研究報告書

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

内分泌攪乱化学物質の問題については、その実態の把握と管理のあり方について、国際的に多くの研究努力が傾けられてきた。平成16年度からの3年間に本研究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、これら化学物質の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-免疫系にまたがって現われ、特に Bisphenol A による遅発性の影響は再現性をもって示された。そこで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」を考案した。その開発と併せてそれを裏付ける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を進め、所定の成果を得た。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、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、を目的として掲げた。

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、研究を実施した。

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った。

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

広瀬 明彦・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、室長

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、を目的とした。

B. 研究方法

本研究は、【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いた。

また、解明研究の中でOECD対応委託研究を実施した。

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、班員及び協力者の協力を得ながら、(1)厚生労働省の「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」(2008年3月)において研究班の成果を報告した。(2)OECDの試験法ガイドライン事業において進められている「拡大一世代生殖毒性試験」ガイドライン策定のための専門家会議(2008年10月、2009年10月)に参加した。(3)内分泌攪乱物質試験法特別班(EDTA)のWorkshop(2009年9月)に参加した。

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

- マウス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

- ラット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

- 化学物質のマウス周産期暴露、及び *in vitro* 暴露の初期免疫応答に対する影響評価

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 NFκB 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
- POPs を中心とした有害性評価手法に

における高感受性集団に関する国際動向調査研究、及び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 Framework 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、既に行い、低用量影響データを得ているBPA、DES及びGenisteinに引き続き、(2)平成21年度は、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)げっ歯類を用いた子宮内・経乳汁曝露による成熟後の性周期等に対する遅発影響についての検討試験

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 及び 20 ng/kg 群で肛門挙筋及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 及び 20 ng/kg 群でそれぞれ 2、1 及び 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 及び 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)。

平成 21 年度は、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;オリブ油	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ことを目指した。

1) 神経・行動

● 鈴木 勉: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

使用動物及び BPA の慢性曝露

実験には C57BL/6J 系雄性及び雌性マウスを使用した。BPA の胎児期及び授乳期慢性曝露は薬物混入飼料法(0、2 mg/g of food、120~240mg/kg)にて、交配日より離乳に至るまで親マウスに曝露した。生まれた胎仔は離乳後 4 週間以上普通飼料で飼育

し、7～11 週齢の雄性マウスを実験に使用した。また、交配後 14 日の胎仔マウス全脳を採取し、胎仔サンプルとした。なお、本研究は関連法規及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、BPA の胎児期及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。

神経幹細胞の分離・培養

妊娠中期雌性マウスから摘出した胎仔の全脳を用いて、神経幹細胞を単離した。神経幹細胞を EGF-DMEM にて 7 日間培養することにより、球状の細胞塊である neurosphere を形成させた。神経幹細胞の分化誘導実験は、DMEM あるいは DMEM に BPA を添加した培地にて neurosphere を 7 日間培養することにより行った。アストロサイトへの分化誘導の同定は、GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的染色法に従い行った。

Methylation-specific PCR (MSP)

BPA 曝露による DNA メチル化の検討は、胎生 14 日目のマウス全脳より DNA を抽出し、バ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。

RT-PCR 法

胎生 14 日齢及び 7～10 週齢のマウス全脳

より total RNA を採取し、常法に従い、histone deacetylase (HDAC) 1、2 ならびにヒストン H3K4 の脱メチル化に関する Jmjd2A mRNA の発現量を検討した。

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法

胎生 14 日齢のマウス全脳あるいは 7～10 週齢のマウスの海馬領域を含む分画を採取し、formaldehyde (最終濃度 1%) にて固定した。DNA が、200 bp～1000 bp 程度の長さになるよう超音波処理を行った。破碎された chromatin 20 μ L を Input とした。この時、破碎された chromatin を 15 μ g/mL に対し、それぞれに抗 acetyl histone H3 抗体 (Millipore)、抗 trimethyl histone H3K4 抗体 (Wako)、抗 trimethyl histone H3K9 抗体 (Millipore)、抗 trimethyl histone H3K27 抗体 (Millipore)、2～4 μ L ずつ加え、免疫沈降を行った。抽出した DNA は 50 μ L の TE に溶解し DNA 1 μ L を用いて、real-time PCR による検討を行った。

●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

タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュールによる認知機能影響の測定

SCOB はオペラント条件付けにより学習される行動であり、通常は粒餌を報酬としたオペラントチャンバー内でのバー押し反応として測定される。反応数や反応間隔などに特定の条件を設定し、それを満たした反応に対してのみ報酬を与える手続きが用いられ、この条件を強化スケジュールと呼ぶ。ラットやマウスに条件付け訓練を反復することで、強化スケジュールに応じた反応パターンでバー押し反応を習得させることができる。我々は「タイムアウト付交替型混合 FR DRO」という強化スケジュールを工夫し、これを用いて妊

娠・授乳期曝露による学習習得と短期記憶に対する影響を検討している。被験動物は「速やかに 10 回反応(FR10)」と「反応せずに 10 秒待機(DRO10s)」を、数秒から数十秒のタイムアウトをはさんで交互に行なうことが要求される。タイムアウト終了時には、速やかに反応を自発するか(FR の場合)、反応を適切に抑制するか(DRO の場合)のどちらかが交互に要求されるが、FR であるのか DRO であるのか、すなわちどちらの行動パターンをとるべきかを示す手がかり刺激は与えられない。被験動物は、タイムアウト中に前回どのようにして報酬を得たかについての記憶を保持し、それに基づいてタイムアウト終了時の行動パターンを選択する必要がある。従って、この学習課題は典型的な短期記憶検査課題とされる遅延交替反応の一種となり、タイムアウト時間(数秒～数十秒)を変化させて反応パターン切替えの正確さを測定することで短期記憶の保持/忘却曲線を得ることが可能となる。通常、一定の強化スケジュール下で 1 日 1 セッション(約 1 時間)・週 5 日・数か月の訓練を実施し、各訓練段階における反応パターンの習得過程(学習曲線)から学習への影響を検討している。学習が進行した段階では、最終的なパフォーマンスレベルを評価するとともに、短期記憶の保持曲線から短期記憶過程に及ぼす影響を調べている。

この方法を用いた試験の実施において適切と考えられる陽性対照物質を検索し、PTU で明確な影響を測定可能なことが示された。以下に PTU についての実験方法を詳細に記載する。

プロピルチオウラシル(PTU)経母体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

上述したタイムアウト付交替型混合 FR10

DRO10s スケジュール下でのラットの SCOB を指標に、抗甲状腺薬 PTU の妊娠・授乳期(GD15～PND20)の投与(0.5、1.0、2.0 mg/kg/day)が成長後の仔の認知機能(学習習得・短期記憶保持)に及ぼす影響を測定した。9 週齢の交配確認済みラット(IGS-SD、日本チャールスリバー)を購入し、妊娠第 15 日(GD15)から生後 20 日(PND20)まで PTU を連日強制経口投与(0、0.5、1.0、2.0 mg/kg/day、各群 8 匹)した。出産 2 日後(PND2)に各腹の仔数を 8 匹に調整した(別の測定に使用する都合で、雄雌比を可能な限り 6:2 とした)。PTU 投与による仔の成長遅延を考慮し、対照群を含め全群で離乳を通常より 1 週間遅くし生後 28 日とした。離乳時に各腹から行動試験に使用するための個体雄 1 匹をランダムに選び、離乳後は一般固型飼料(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。母動物 1 群 8 匹計 32 匹から雄仔各腹 1 匹を使用する予定であったが対照群では未妊娠動物が 2 匹含まれていたため、同群 6 腹中 2 腹では同腹から 2 匹の雄性仔を行動実験に使用した。但し、結果の解析には同腹仔を除外し 1 腹 1 匹のデータを使用したため、対照群は 6 匹、他は各群 8 匹である。8 週齢からは、食餌強化による SCOB 行動測定のための個別飼育と給餌制限を開始した。以後、実験期間を通じての体重を 8 週齢時の 85% を目標に維持すべく給餌量を調整した。飲用水は実験セッション中を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。

食餌制限を行い体重が目標値付近で安定した後、13 週齢から SCOB の測定を開始した。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。強化スケジュールを、1) 自動反応形成スケジュール(7 セッション)、2) 定率強化(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 FR DRO スケジュールを導入した。

タイムアウト付交替型混合スケジュールでの訓練は 3 段階に分けて実施した。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。

被験体の反応習得過程と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。

訓練の第 3 段階では、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 をプロットすることで、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)を得た。

さらに、メタンフェタミン、SKF38393(D1 系

アゴニスト)、quinpirole(D2 系アゴニスト)による薬理的負荷試験を実施した。これらの薬理的負荷試験では、各セッション開始前に薬物を投与し、薬物効果の現れ方に対する BPA 曝露の影響を検討した。

BPA経母体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

9 週齢の妊娠ラット(IGS-SD)を購入し、妊娠第 6 日(GD6)から離乳日(PND21)まで高純度の BPA(>99.6%)を混餌投与(0, 0.33, 3.3, 33 ppm、各群 12 匹)した。混餌濃度を体重当たりの摂取量に変換すると、通常のラットでは 0.017, 0.17, 1.7 mg/kg/day に相当する用量である。

今回の実験に於ける妊娠期の摂餌量測定値から計算すると、BPA 摂取量は 0.025, 0.25, 2.5 mg/kg/day と推定された。出産 5 日後(PND5)に各腹の仔数を 8 匹に調整し、離乳後に各腹から雄 1 匹をランダムに選り行動試験に使用した。目標体重を一律体重 300 g として給餌制限・体重統制を行ない 13 週齢から SCOB 訓練を開始した。PTU の実験と同様に強化スケジュールを、1) 自動反応形成、2) 定率強化(FR)、3) タイムアウト付交替型混合 FR10 DRO10s スケジュールー固定長タイムアウト条件、4) 同スケジュールー変動長(上昇系列)タイムアウト条件、5) 同スケジュールー変動長(上昇・下降系列)タイムアウト条件と、順次変更し曝露影響を調べた。各訓練段階における適切な反応パターンの習得過程から「学習習得への影響」を検討した。Accuracy をタイムアウト時間に対してプロットした短期記憶保持(忘却)曲線によって「(短期)記憶」への影響を評価した。薬理的負荷試験も実施した。

倫理面への配慮

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—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—

Sprague-Dawley 系ラット Crl: CD(SD) 妊娠 7 日から哺育 20 日に亘り DES の 0.2、2.0 あるいは 20 ng/kg/day を投与し、出生した F₁ 動物のうち、7 か月の観察期間中に何らかの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、各群からこの間に性周期が正常に回帰した 5 例を追加して、組織学的検索の対象とした。なお、用量設定の根拠は、先行研究班で実施された委託試験において BPA を 0.5、5 及び 50 µg/kg/day の用量で経胎盤・経乳汁暴露させたところ、全ての投与群において、出生児に遅発性の性周期異常が認められていること、及び DES は BPA の約 2,500~5,000 倍のエストロジェン活性を持つと考えられていることにより、DES の投与量を設定した。

上記の検索対象動物を安楽死させたのち剖検して、下垂体及び脳組織を採取し、ホルマリン固定した。下垂体は前葉、中間葉、後葉を含む全組織を、脳に関しては主に視床下部(前腹側室周囲核、内側視索前野及び弓状核)を中心に切り出してパラフィン包埋後、いずれも HE 染色をしたほか、免疫組織化学的手法により ER α を染色し、さらに下垂体は FSH 及び prolactin (PRL) 染色を、また脳は GnRH 染色を施した。免疫組織化学的染色に使用した主な試薬は以下の通りである。

<FSH>

- ・抗原賦活化:プレッシャークッカー 125°C、5 min
- ・1 次抗体:Rabbit anti-rat FSH polyclonal antibody (AbD serotec 社 4561-7359) dilution : 1/100
- ・洗浄:TBST
- ・ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用
- ・発色:DAB Reagent Set (KPL 社)

<PRL>

- ・1 次抗体:Rabbit anti-rat PROLACTIN polyclonal antibody (AbD serotec 社 7770-5004G) dilution : 1/100
- ・洗浄:TBST
- ・ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用
- ・発色:DAB Reagent Set (KPL 社)

<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
- ・EnVision™+ 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
- ・EnVision™+ Dual Link (Dako 社)
- ・発色:DAB Reagent Set (KPL 社)

(倫理面への配慮)

動物の飼育及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」及び「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) マウス及び投与方法

雌 NFS/*sld* マウスを使用(有効匹数雌 75 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。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD、Cambridge Isotope Lab. Ins.)を各濃度(100、1000 ng/kg 体重)にて妊娠マウス(膈内プラーク確認 3 日目及び 15 日目)に腹腔内投与後、出産、授乳及び離乳後、6 ヶ月齢での変化を非妊娠対照群と比較した。基剤としてコーンオイルを用いた。

卵巣摘出は、6 週齢のマウスを用い、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、腹膜及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。ダイオキシン投与は、各濃度(100、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) フローサイトメリー解析

各群における全てのマウスから胸腺及び脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体(CD4、CD8)と反応させた後に 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($\times 5$)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

各組織に関してトライゾール及びホモジナイザーによって Total RNA を分離した。逆転写反応後、PTC-200 DNA Engin Cycler 装置(MJ Research、Waltham、MA)を用い、下記プライマーにて各 mRNA を定量化した。

< T-bet >;

F:5'-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',
< 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及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. 培養細胞を用いた実験系

1) 被験物質暴露及びサンプリング

10%FBSを含む RPMI1640 完全培地で継代培養したヒト単球系細胞株 THP-1 を 24 well plate に 1×10^6 cells/mL/well で播種し、媒体 DMSO、既知マーカー膜タンパク質 CD86 の発現がみられる濃度とその 1/10 濃度の各 2 用量で強度感作性物質 Dinitro-

chlorobenzene (DNCB) 0.3 及び 3 μ g/mL、中程度感作性物質 Eugenol (EUG) 10 及び 100 μ g/mL 並びに非感作性物質 Propylene glycol (PG) 100 及び 1000 μ g/mL を n=3 で暴露し、3、6 及び 24 時間後に経時的にサンプルを採取した。

2) フローサイトメトリーによる CD86 の発現確認

サンプルの一部を PE 標識した抗 CD86 抗体で染色し、フローサイトメーター Epics XL (ベックマン・コールター社製) にて CD86 発現を媒体暴露群に対する相対蛍光強度 (Relative Fluorescence Intensity ; RFI) を指標として、RFI=120 を境に感作性/非感作性を判定した。

3) 2D-DIGE によるディファレンシャル解析

プロテオミクス手法の一つである 2D-DIGE によるディファレンシャル解析を実施し、感作性物質暴露による変動スポットを抽出した。

4) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

各被験物質暴露後の THP-1 細胞からそれぞれ Total RNA を抽出し、同じ暴露条件の Total RNA (n=3) を等量混合した。等量混合した Total RNA を Template として Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent 社製) を使用して蛍光標識 (Cy3) cRNA を作製し、Whole Human Genome Oligo Microarray 4 \times 44K (Agilent 社製) を用いて 1 色法により網羅的に遺伝子発現解析を行った。媒体対照群に対する被験物質暴露群の発現比を算出し、2 倍以上または 1/2 倍以下に発現変動した遺伝子を抽出した後、ベン図解析を行い、感作性物質 DNCB 及び EUG で共通に発現変動し、かつ非感作性物質 PG で共通に発現変動しなかった感作

性物質特異的遺伝子群を抽出した。なお、マイクロアレイによる遺伝子発現解析については、原則高用量群のみとした。

5) 遺伝子機能及びネットワーク解析

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

2. BPA の経胎盤・経乳汁曝露とマウス局所リンパ節増殖試験 (LLNA)

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、投与期間及び投与経路

BPA (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 BPA 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

a) 母動物

一般状態及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。

b) 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、BPA 低用量群及び BPA 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 BPA 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。

3) 生殖器

●長尾 哲二: 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

1. 精巣下降に関する実験(解剖学的指標の検討及び精巣下降制御遺伝子 mRNA 発現変化)

平成 20 年度(平成 19 年度は精巣下降遺伝子 mRNA 発現について RT-PCR 法を用いて予備的に検討した。):ICR マウスの妊娠 9~16 日(膣栓=妊娠 0 日)あるいは妊娠 15~17 日の連日に、Diethylstilbestrol (DES) 1.5~50 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及び精巣重量を測定し、精巣-腎臓間距離を計測した。次いで精巣下降の制御に関連する遺伝子群 InsI3 (insulin-like factor3)、SF-1 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。次いで低用量の BPA の 2~200 µg/kg 体重を妊娠 9~16 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 ethynylestradiol (EE) 50 µg/kg 体重を用いた。

平成 21 年度:ICR マウスの妊娠 9~17 日(膣栓=妊娠 0 日)の連日に、低用量の BPA 2~200 µg/kg 体重、Nonylphenol(NP)12.5~50 mg/kg 体重、Butylbenzylthalate (BBP) 25~100 mg/kg 体重あるいは陽性対照として EE 50 µg/kg 体重を強制経口投与し、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及び精巣重量を測定した。精巣下降の解剖学的指標として左右の腎臓-膀胱間距離(100 U)及び精巣-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について mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。さらに 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遺伝子群 mRNA について調べた。

2. DNA メチル化制御分子に関する実験

平成 19 年度: Dnmt タンパクの局在: ICR マウスの妊娠 9~16 日の連日、BPA 200 µg/kg 体重を強制経口投与した。また、EE 50 µg/kg 体重あるいは DES 50 µg/kg 体重を背部皮下注射した。胎齢 18 日に帝王切開にて得られた胎児及び養母哺育により得られた新生児から、それぞれ精巣を摘出して 4% PFA で固定後パラフィン切片とし免疫染色法(ABC 法)を用いて精巣における Dnmt1 あるいは Dnmt3a のタンパク局在を調べた。

平成 20 年度: 胎児性腺の超微形態観察:

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、15 あるいは 18 日の胎児性腺について、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。

平成 21 年度: DNA メチル化酵素遺伝子 mRNA 発現及びゲノムワイドな DNA メチル化状態: 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(DNA methyltransferases: 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。

(倫理面への配慮)

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 及び 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 74 週齢まで体重を測定し、体重推移を観察した。

【性成熟】雌は膣開口、雄は陰茎包皮分離を性成熟の指標にして、各完成日を調べた。

【性周期】8 週齢から 54 週齢まで膣スメアを採取し、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 週齢まで生死及び一般状態を観察し、生存日数を調べた。

得られた結果は、以前実施した Sprague-Dawley ラットを用いた一生涯試験の結果と比較した。

(倫理面への配慮)

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)フジミ製薬所 Lot No.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。

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 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ 、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)に出産生児数、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以降は膣スメアにより発情前期にあることを確認した上で剖検に供した。

検査・検体採取項目;

- ①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) スメ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日間連続膣スメア採取後、2週間休止した。膣スメアは午前10:00~12:00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、不規則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 を用いて組織破碎液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破碎液中の 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 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 1µg をオリゴ dT プライマーを用い逆転写し 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 (ABS) を用い、初期変性後 (95°C、10sec)、ニーリング温度 60°C 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。

7) 下垂体のプロラクチン免疫組織学染色 ホルマリン固定、パラフィン切片

操作手順

脱パラ

↓

抗原賦活化; 10mM sodium citrate buffer
95°C 10min

↓

3%過酸化水素加メタノールによる内因性ペ
ルオキシダーゼ処理 15min 室温

↓

10%ウサギ正常血清 30min 室温

↓

第一次抗体 30min 室温

↓

第二次抗体; シンプルステインラット
MAX-PO(G) 30min 室温

↓

DAB 溶液による発色

↓

核染 ヘマトキシリン

封入

第一抗体; Anti-Prolactin

Santa Cruz (C-17) : sc-7805、200 µg
IgG/1.0mL of PBS

Sourc ; Goat polyclonal IgG antibody raised
against a peptide mapping near the
C-terminus of prolactin of human origin.

希釈倍率: 1:50

(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

化合物の添加溶媒として dimethyl sulfoxide (DMSO) の ES/EB 系に対する遺伝子発現影響について基礎的検討を行なった。実験は、DMSO を 0.1% の濃度で培地に添加し、ES 細胞は LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日間は天井培養法で、次の 5 日間は浮遊培養法で、計 7 日間培養した。培養開始 1 日目から 7 日目まで毎日 EB を採取してプールし、サンプルとし、アフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。

次いで、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、上記と同様に、計 7 日間培養、マイクロアレイ解析を行った。なお、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