

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時間後に肝臓を採取し、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された。

(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

F344雄ラットをCharles River Japanより購入し、11週齢で屠殺、実体顕微鏡下で、前立腺の腹葉(VP)、側葉(LP)、背葉(DP)、前葉(AP)を区別して取り出した。各葉をプロテアーゼ阻害剤含有の生理食塩水中に浸し、切り込みを入れることで内容物を漏出させた。これを遠心分離して分泌物抽出液とした。また、ホルモン応答試験として10週齢のF344ラットを去勢し、1週間後に、テストステロンプロピオネイト(TP)5mg/kg body weight (bw)をip投与した。投与1、3、24時間後に屠殺して、前立腺の各葉を分離しRNAlater中に保存した。

マウスによる試験では生後5日目及び8週齢のC57BL雄マウスを購入して用いた。生後6日目で、TP4mg/kg bw及び17 β -estradiol (E₂) 0.5、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TP4mg/kg bw及びE₂を10 μ g/kg bwでi.p.投与した。投与後24時間で屠殺し、前立腺の各葉を保存した。

2) ラット前立腺分泌タンパク質の同定

ラット各葉からの分泌物をpIレンジ3-11で等電点電気泳動し(Immobiline DryStri)、5~20%グラジエント SDS-PAGEで二次元目泳動を行った。Sypro Ruby染色によりタンパク質を検出し、スポット部のゲルを切り出した。各ゲル片からタンパク質を抽出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF質量分析機(UltraFlex mass spectrometer)によりマスペクトルを測定し、peptide mass fingerprinting法を適用して(MASCOT Ver.2.1)、タンパク質を同定した。

3) mRNA定量

ラット、マウスとも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。

4) レポータープラスミド

PSP94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 及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。

5) 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 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、ブトレスシン、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 (10 ng/ml) 及び EGF (10 ng/ml) を添加したものをを用い、10cm シャーレ (ヌンク社) に 10⁶ 個/6ml の密度で生細胞を播種した。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砕し、100~400 bp 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 1 μ g を MethylEasy 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 クローンずつシーケンスし、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

AhR^{-/-}マウスは自然発症的に腸癌を発症する。腸癌発症における AhR の役割を明らかにするために AhR^{-/-}及び APC^{min/+}マウスを用いて生化学、分子生物学、発生工学的手法により解析して AhR 欠失による癌化の原因を比較検討した。さらに、AhR のリガンドが発癌の抑制に働くかを APC^{min/+}マウスの発癌系を用いて検討した。また AhR は炎症等免疫現象に関与している事が示唆されているので AhR^{-/-}マウスあるいはその動物から分離した免疫細胞を用いて免疫反応における AhR の作用メカニズムを生化学的、分子生物学的方法によって明らかにした。AhR の転写活性化作用における AhR repressor (AhRR) のフィードバック阻害機構を HeLa 細胞や COS 細胞を用いて細胞生物学的、分子生物学的、生化学的に検討した。

●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

化学物質

AhR のリガンドとして Benzo[a]pyrene を、CAR のリガンドとして TCPOBOP を、SXR のリガンドとしては Rifampicin を用いた。動物実験においては、PXR (SXR のマウスオルソログ) のリガンドとして Pregnenolone-16-carbonitrile (PCN) を用いた。

SXR、CAR、AhR の転写活性化能の測定

10%FBS を添加した EMEM 培地中、37°C、5% CO₂ の条件で培養した肝腫瘍細胞株 HepG2 を、遺伝子導入 24 時間前に、96 穴細胞培養プレートに移した。この細胞に、AhR、CAR 又は SXR 発現プラスミドをルシフェラーゼレポータープラスミドと共に、FuGENE6 (Roche) を用いて遺伝子導入した。24 時間後に、Benzo[a]pyrene、TCPOBOP

又は Rifampicin を添加し、24 時間後に細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、遺伝子導入効率を補正するために、β-galactosidase 発現プラスミドも同時に遺伝子導入し、その活性を測定した。

感染症モデルマウスでの CYP の発現

BALB/c 系雄マウスに LPS (1 mg/kg) を腹腔内投与して免疫系を活性化した後、3 時間後に化学物質を腹腔内投与した。さらに、21 時間後に LPS (1 mg/kg) を再び投与して、その 3 時間後に肝臓から RNA を抽出し、各種 CYP 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で調べた。また、化学物質を投与しない状態での CYP 遺伝子の mRNA レベルを測定した。

アレルギーモデルマウスでの CYP の発現

BALB/c 系雄マウスに OVA とフロイント不完全アジュバンド (FIA、2 mg/ml OVA 生理食塩水溶液:FIA=1:1 のエマルジョン) を 50 ml/mouse で腹腔内投与して感作し、2 週間後に再度 OVA (0.1 mg/ml) を腹腔内投与すると I 型アレルギーの典型症状である全身アナフィラキシーが誘導されることを確認した。そこで、OVA+FIA で感作後、14 日目に化学物質を腹腔内投与し、その 1 日後に OVA でアレルギーを惹起した後、肝臓から RNA を抽出して、CYP3A11 の発現量をリアルタイム PCR で調べた。また、化学物質を投与しない状態での CYP 遺伝子の mRNA レベルを測定した。

RNA の抽出と cDNA の合成

肝臓をセパゾール RNA I super (ナカライテスク) 中でホモジナイズして、Total RNA を抽出した。得られた Total RNA を鋳型として、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

Real-time PCR

SYBER Primer Ex Taq II(タカラバイオ)を用い、初期変性後(95℃、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より摘出した肝臓より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

この3年間の、諸国際組織における研究動向を整理した。諸国際組織における現段階での研究動向を整理すると同時に、併せて、平成18年11月ヘルシンキで開催されたウェイブリッジ+10国際会議(1996にロンドン郊外のウェイブリッジで開催された「ヒトの健康と野生生物への内分泌かく乱化学物質問題のインパクトに関する欧州ワークショップ」の開催10年を記念して開催されたワークショップ)における討議事項を参照した。諸国際組織における研究動向を文献的に整理すると同時に、内分泌かく乱化学物質問題の諸課題の到達点と今後の課題の抽出につとめた。

●広瀬 明彦、小野 敦: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

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)会議及び併せて開催される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

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) 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:17β-Estradiol (E₂、和光純薬工業)、
- アンタゴニスト陽性対照物質:4-Hydroxy-tamoxifen (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(hERα)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の上流にhERα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 ニュスイ、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。

化合物溶液の調製

各化合物は国立医薬品食品衛生研究所にて DMSO を媒体として 10 mM に調製された試料、あるいは DMSO に溶解しない場合は、水を媒体として 10 mM に調製された試料を用いた。

10 mM に調製された化合物をそれぞれの媒体にて 1/10 希釈を行い 1 mM、100 μ M、10 μ M、1 μ M、100 nM 及び 10 nM とした。

化合物は終濃度が 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM 及び 10 pM となるように培地に添加した(DMSO 終濃度:0.1%)。媒体として水を用いた場合には、他の物質と同じ構成になるように同量の DMSO を同時添加した。

Steady-Glo Luciferase Assay Reagent の調製

Steady-Glo ルシフェラーゼ活性測定試薬(Steady-Glo Luciferase assay system, Promega)を使用した。Steady-Glo Luciferase Assay Substrate 1 vial に Steady-Glo Luciferase Assay buffer 1 vial 全量を直接加えて溶解した。

ER α を介する転写活性化測定法(レポータ

一遺伝子アッセイ)アゴニスト検出系 測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

細胞を測定用の 96 well プレートに播種(10⁴ cells/100 μ L/well)

↓CO₂ インキュベーター内で培養 3 時間

↓化合物の添加

化合物終濃度:10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM、10 pM [n=3]

媒体対照区:DMSO [n=6]

陽性対照区:1 nM E₂ [n=6]

↓CO₂ インキュベーター内で培養(20~24hr)

↓各 well から培地を除去

↓PBS (0.3 mM の MgCl₂ 含む)と Steady-Glo Luciferase Assay Reagent を 1:1 で混和し、各 well に 50 μ L ずつ添加

↓10 分間室温で静置

化学発光測定装置(TopCount NXT™、PerkinElmer)による発光測定(測定時間:1sec/well)

Assay プレート上のサンプル配列

plate format に従い、被験物質、媒体対照区(DMSO)及び陽性対照区(1 nM E₂)を配置した。

データ解析

各濃度区で得られた発光強度(RLU)を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率(Fold induction)を求めた。同時に被験物質及び陽性対照区的全濃度区で得られた発光強度(RLU)から媒体対照区の平均値を差し引いた後、陽性対照区の平均値(通常、誘導活性がプラトーに達する 1 nM E₂ を使用)で除し、相対転写活性化倍率(Relative transcriptional activity)を求めた。また、陽性対照区の最大転写活性化倍率(1 nM の E₂)の 10%の値を与える濃度

(PC10) 及び 50%の値を与える濃度 (PC50) を 2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

PC10 が算出されない化合物は hER α アゴニスト活性陰性 (-) と判定した。

ER α を介する転写活性化測定法 (レポーター遺伝子アッセイ) アンタゴニスト検出系

測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

細胞を測定用の 96 well プレートに播種 (10⁴ cells/100 μ L/well)

↓CO₂ インキュベータ内で培養 3hr

↓化合物の添加

以下の培地中にはスパイク対照 E₂ を終濃度 25 pM になるよう予め添加

化合物終濃度: 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM [n=3]

アンタゴニスト陽性対照区: 1 μ M 4-Hydroxytamoxifen [n=3]

細胞毒性対照区: 100 μ M Digitonin [n=3]

スパイク対照区: DMSO (25 pM E₂ のみ) [n=3]

以下の培地中にはスパイク対照 E₂ を添加しない

媒体対照区: DMSO [n=6]

アゴニスト陽性対照区: 1 nM E₂ [n=6]

↓CO₂ インキュベータ内で培養 (20~24hr)

↓各 well から培地を除去

↓PBS (0.3 mM の MgCl₂ 含む) と Steady-Glo Luciferase Assay Reagent を 1:1 で混和し、各 well に 50 μ L ずつ添加

↓10 分間室温で静置

化学発光測定装置 (TopCount NXT™, PerkinElmer) による発光測定 (測定時間: 1 sec/well)

Assay プレート上のサンプル配列

plate format に従い、被験物質、アンタゴニスト陽性対照区 (1 μ M 4-Hydroxytamoxifen)、細胞毒性対照区 (100 μ M Digitonin)、スパイク対照区 (DMSO (25 pM E₂ のみ))、媒体対照区 (DMSO) 及びアゴニスト陽性対照区 (1 nM E₂) を配置した。

データ解析

被験物質及び各対照区の全濃度区で得られた発光強度 (RLU) から媒体対照区の平均値を差し引いた後、スパイク対照区の平均値 (25 nM E₂) で除し、スパイク対照に対する相対転写活性化倍率 (Relative transcriptional activity against Spike control) を求めた後、スパイク対照区の転写活性化倍率 (25 nM E₂) の 30% を阻害する値を与える濃度 (IC30) 及び 50% を阻害する値を与える濃度 (IC50) を 2.5.3 同様に 2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

IC30 が算出されない化合物は hER α アンタゴニスト活性陰性 (-) と判定した。

細胞毒性試験

IC30 が算出された物質については、細胞毒性による False positive 反応を回避するため、水溶性ホルマザン WST-8 を用いた WST-8 assay により細胞毒性を観察し、細胞生存率が 80% 未満になる細胞毒性が認められた濃度区は、hER α アンタゴニスト活性の IC30 及び IC50 の算出から除外した。

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)
AR レポーター遺伝子アッセイ (安定発現細胞株)

AR-EcoScreen™ 細胞⁽¹⁾を 1×10⁵ cell/mL

の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 90 $\mu\text{L}/\text{well}$ で撒いた。このときの培養液は Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL), 5% Charcoal/Dextran treated FBS (Hyclone) を用いた。翌日 (約 20 時間後) サンプル及び標準物質をプレートフォーマットにしたがって各ウェルに 10 μL 加え CO_2 インキュベーターでさらに培養した (約 20 時間)。翌日、ルシフェリン溶液 (Steady-GloTM: Promega) を加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。AR アンタゴニストアッセイでは、AR アゴニストである 5-alpha-dehydrotestosterone (DHT) をあらかじめ細胞培養液に加えておき (終濃度 5×10^{-10} M)、被験物質によるアンタゴニスト活性を評価した。サンプル調製プレートから AR-EcoScreenTM 細胞に各ウェル 10 μL 加え CO_2 インキュベーターでさらに培養した (約 20 時間)。翌日、ホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (Dual-GloTM: Promega) を測定マニュアルに従って加えて約 10 分間振とう攪拌して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

AR、GR レポータージーンアッセイ (一過性発現系)

CHO-K1 細胞 (1×10^5 cells / ml) を 96 ウェルプレートに 84 $\mu\text{L}/\text{well}$ で播種した。培養メディアウムは、Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL)、5% Charcoal Dextran treated FCS (Hyclone) を用いた。翌日、プレート 1 枚あたり、AR レポータージーンアッセイでは、

pZeoSV2 AR 124ng、pIND ARE B10-luc 6.2 μg 、GR レポータージーンアッセイにおいては、pcDNA GR 124 ng、pIND ARE B10-luc 6.2 μg を希釈トランスフェクション試薬 (FuGene6 (ロツシュ) 18.6 μl を Medium (血清無添加) 620 μl で希釈したもの) に加えて、96 ウェルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6 μl 添加し、 CO_2 インキュベーターで培養した。培養 6 時間後にサンプル、及び各コントロール物質を各ウェルに 10 μl 添加して、 CO_2 インキュベーターで培養した (約 20 時間)。翌日、ホタルルシフェリン (Steady-GloTM) をマニュアルに従って添加後、10 分間振とう混和して細胞を溶解して、ルシフェラーゼ活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

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)

1) AR 結合強度予測システム

一般に蛋白構造は、リガンドの結合に伴って一部の側鎖コンフォメーションが変化する。Induced fit と呼ばれる現象で、リガンドとの相互作用をより安定化するための動きである。時には主鎖コンフォメーションまで変化する。同じ標的蛋白であっても、どのようなコンフォメーションをとった構造を用いるかで、*in silico* スクリーニングの精度・成果が左右される。AR 結晶構造に対して、幾つかのリガンド (いずれもアゴニスト) が結合した複合体構造が解明された現在では、*in silico* スクリーニングにより適した蛋白コンフォメーションを選んだり、リガンド結合部位周辺の動きに関する知見をもとに戦略を立てることがやりやすくなった。予測モデルには、これまでの検討結果

から公開されている AR 結晶構造のうち、dihydrotestosterone (DHT)、EM5744 が結合した 2 つの複合体構造を利用した。これらの結晶構造におけるリガンド結合キャビティは他の構造に比べて比較的広く、多様な化学物質のドッキングが行ないやすいと考えられる。

次節に述べる方法で、それぞれの AR 立体構造の準備を行なった。また、3 節に述べる方法で、予測システム構築のためのトレーニングセット化合物 (98 個) の立体構造準備も行なった。次に、4 節で述べる方法で、2 つの AR 構造に対する各化合物の自動ドッキング計算を実施して、それぞれの安定複合体モデルを生成した。その後、蛋白構造の動きを考慮した複合体構造のエネルギー極小化と詳細なエネルギー解析を経て、結合性予測式導出のための重回帰分析に使用する各独立変数の値を、各々の AR 構造に対して得た。最後に、重回帰分析により各々の AR 構造に対する結合性予測式を得た。

2) 3 つの AR 構造の準備

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

各々の複合体結晶構造から、結合しているリガンド分子を取り除き、リガンド分子が結合していたポケット (結合ポケット) を、低分子化合物をドッキングさせる領域 (ドッキング対象領域) として指定した。ドッキング対象領域内

で、自動ドッキング計算の際にリガンドとの相互作用計算に用いる格子点データをプログラム CALGRID により計算した。

3) トレーニングセット化合物の立体構造の準備

AR 結合強度予測システム構築に用いるトレーニングセット化合物は、財団法人 化学物質評価研究機構 (CERI) により AR 相対結合強度 (RBA) が測定され、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE) により一般に公開されている低分子化合物より選んだ。

今回検討する AR 結晶構造のリガンド結合部位にドッキング可能なサイズ・構造 (すなわち結晶構造とは大きく異なる induced fit を起こす可能性が低い構造) の中から、結合強度や骨格のバリエーションに配慮して、98 化合物を選択した。一部、AR に結合しない物質 (non-binders) も含まれている。

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

4) AR と各トレーニングセット化合物のドッキング計算

蛋白質—リガンド自動ドッキングプログラム ADAM を用いて、2 つの AR 構造について、計算対象化合物の安定な複合体構造モデルを生成した。続いて、複合体モデルが得られた化合物について蛋白質—リガンド複合体構造最適化プログラム Bluto を使用して、複合体のエネルギー極小化を行なった。最後に蛋白質—リガンド複合体における結合

自由エネルギー解析プログラム GenB ならびに複合体形成に伴う水素結合・水和の変化を見積もるプログラム Desolv を用いて複合体安定化に寄与すると考えられる各種エネルギー項の計算を実行した。

5) AR 予測システムを利用した *in silico* スクリーニング

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

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)

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。

蛋白質ー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ー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。最後に蛋白質ー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、これまでに構築・検証した以下の式を使用し logRBA の推算をした。

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

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、蛋白質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:

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

2pnu:

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

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)」及び「動物実験に関する指針(2003 年 4 月版)」を遵守し、適正に使用する。

●徳島大学は、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学 実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

●財団法人 化学物質評価研究機構は、当機構実験倫理審査委員会の制定する実験倫理審査委員会規程(平成 17 年 4 月制定)に従い、研究倫理委員会の厳重な審査、管理のもとに「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の使用及び保管等に関する基準」を遵守し適正に試験を実施する。

●近畿大学は、近畿大学 理工学部「動物実験に関する指針」に準拠して行い、使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼など苦痛の少ない方法を用いる。

●財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所は、「動物の愛護及び管理に関する法

律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」及び「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

(1)2008年3月、厚生労働省医薬品食品局によって開催された「第20回内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」に参加し、本研究班において行われてきた研究の成果に基づき展望を述べた。この検討会の結果は、「内分泌かく乱化学物質問題の現状と今後の取組 中間報告書 追補その3」としてまとめられつつある。

(2)OECDでは、「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て使用動物数を削減するというものであるが、妊娠の前から投与した化学物質が次世代動物の繁殖能だけでなく、

内分泌・生殖系、神経系、免疫系の発達に及ぼす影響も含めて試験するものであるから、われわれの目指している化学物質の発生早期からの曝露の、内分泌-神経-免疫を包含する高次調節系の発達に対する攪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)で決定される見込みである。

(3)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に参加し、各国における研究と対策の現状を調査し、今後の展望に関する討議を行った。

●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)

(1)齧歯類一生涯試験取り纏め事項

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

これに関連し、平成19年度は、BPAに関する健康危険情報(レベルB)を提出した際の準備を補佐した。

平成20年度はこれらの成果の一部をOECDの改良一世代試験の検討資料として提供した(2008年4月開催のOECD・WNT会合のため)。

平成21年度は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、各国の内分泌かく乱化学物質問題に関する活動状況、テストガイドラインや他のツール/データ情報が内分泌かく乱化学物質の同定・評価・管理に関する政策決定にどのように反映されているかを分析することを目的として、内分泌かく乱化学物質の試験法に関するOECD 参加国間の適用及びテストガイドライン化について検討した。その際に、本研究の成果等を元にした内分泌かく乱の基本的な問題点の提示を行った。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、農薬補助剤の EU での規制に関わる内分泌かく乱作用の有無の判定基準に関する国際的エキスパート論議に参加し、分科会の座長を務めた。

(2)げっ歯類を用いた子宮内・経乳汁暴露による成熟後の性周期等に対する晩発影響についての検討試験

ラット(一部マウス)を用いた低用量化学物質の子宮内・経乳汁暴露による成熟後の性周期等に対する晩発影響について、Bisphenol A、DES、及び Genistein(GEN)について、可能な限り複数回の試験により再現性を確認しつつ、検討した。その結果、Bisphenol A と DES について、エストロゲン受容体を介したシグナルを誘発し得る濃度を周産期に暴露した際に、共通して、雌児動物に晩発性の性周期異常の発生頻度の増加が確認された。EE と DES については、Cleft phallus の誘発が再度確認された。しかし BPA には Cleft phallus 誘発が確認されな

かった点からは、形態形成に関しては化学物質依存的な影響の存在が示唆された。遅発性の性周期異常とそれに付随する所見に加え、雌外性器の詳細な観察並びに雌外性器携帯計測学的検査は、DES や EE の低用量域の生体影響を評価する検出指標として有用である可能性があると考えられる。Genistein については、子宮肥大試験が示すごとく antagonistic な効果が比較的強いためか、前二者とは異なり遅発影響としての性周期異常を誘発しなかった。また、使用する飼料のエストロゲン活性により遅発影響の発現が影響を受ける可能性も示唆された。

(2-1)DES 短期追加確認試験(委託先: バイオラボ株式会社)(H19)

性周期の観察では、5 ヶ月齢までの観察で対照群では異常性周期を示す動物が認められなかったのに対し、被験物質投与群では persistent diestrus あるいは constant estrus を示す動物が少数例ながら認められた。6ヶ月齢時では性周期異常を示す動物はさらに増加したが、対照群と比較し有意差はみられなかった。

また、剖検時に実施した雌外性器形態計測学的検査では、2 ng/kg 以上の群で、Size of urethral slit 及び Distance between tip of phallus and urethral orifice (Cleft phallus に関連)が有意に延長した。

(2-2)ラットを用いた Deihylstilbestrol および Genistein の子宮内・経乳汁暴露による晩発影響についての検討試験 (委託先: 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)(H20)

母動物に対する影響

母動物には、全飼育期間を通して死亡例及び一般状態の異常は観察されず、妊娠及

び哺育期間の体重推移、分娩・哺育状態、さらには妊娠日数にも GEN 及び DES 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。したがって、GEN の 40~1000 µg/kg/day 及び DES の 20ng/kg/day は、哺育期及び授乳期投与によって、母動物に影響を与えないものと考えられる。

児動物に対する影響

児動物の離乳前の観察では、産児数、性比、生存率、形態及び体重に GEN 及び DES 投与の影響は認められなかった。また、哺育 4 日に計測した雌雄の肛門生殖突起間距離 (AGD) についても、GEN 及び DES 投与の影響は認められなかった。しかしながら、哺育 21 日に剖検した雄の器官重量については、1000 µg/kg GEN 投与群で前立腺腹葉の絶対及び相対重量が、DES 投与群で精囊の相対重量が対照群より減少した。

雌児動物の離乳後の観察では、200 µg/kg GEN 投与群で 2 例に途中死亡が認められたが、GEN 投与の影響ではないと判断した。

生存例の一般状態及び体重推移には GEN 及び DES 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

膈開口の完成日齢及び完成日体重は、DES 投与群で早期化傾向がみられたが有意差はなかった。

性周期 : 40 µg/kg GEN 投与群では、34~35 週齢及び 38~39 週齢の発情休止期日数及び観察日数に占める発情休止期日数 (以下、頻度) が有意に増加し、発情前期日数及び頻度が有意に減少した。1000 µg/kg GEN 投与群では、10~11 週齢の発情前期日数及び頻度が有意に増加し、38~39 週齢では発情期日数及び頻度が有意に増加した。DES 投与群では、10~11 週齢の発情

休止期日数及び頻度が有意に減少し、34~35 週齢では有意に増加した。また、10~11、14~15、18~19、22~23、26~27 週齢の発情前期日数及び頻度が有意に増加し、34~35 週齢及び 38~39 週齢では有意に減少した。

Cleft Phallus: GEN 各投与群では、12~13 週齢時及び 52~53 週齢時の観察で Cleft Phallus は認められなかった。DES 投与群においては、12~13 週齢時に 1 例、52~53 週齢時にこの 1 例を含む 2 例に Cleft Phallus が認められた。

下垂体、卵巣及び子宮にも、対照群を含む各投与群で異常が少数例みられたが、GEN あるいは DES 投与の影響を示唆する変化ではなかった。なお、副腎では、DES 投与群のみに両側あるいは片側の大型化が観察され、DES 投与の影響が示唆された。

(2-3) マウス子宮内・経乳汁低用量化学物質 (BPA、DES 及び GEN) 暴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検討試験 (委託先: 財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所) (H21)

親動物

対照群で 1 例、ケージ内で首が挟まる事故があり、哺育 17 日に死亡が確認された。その他、試験期間中の一般状態に、異常は観察されなかった。各測定時点における体重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。分娩・哺育状態に異常は観察されず、妊娠期間においても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。

児動物

産児数、性別、外表奇形、一般状態に異常は観察されなかった。また、哺育期間中の

体重には、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。死亡児及び間引き児の剖検の結果、異常所見は観察されなかった。

育成期の観察において、試験期間中の一般状態に、異常は観察されなかった。体重測定の結果、雄では、BPA 50 µg/kg 投与群の生後 35 及び 42 日に有意な低下がみられた。その他、各測定時点における体重には、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。雌では、BPA 50 µg/kg 投与群の生後 42 日に有意な体重抑制、DES 0.02µg/kg 投与群の生後 28 日に有意な増加がみられた。その他、各測定時点における体重には、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。

膈開口は、BPA 50 µg/kg 投与群の完成日数に有意な遅延がみられた。その他、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。包皮分離は、BPA 50 µg/kg 投与群の完成日体重に有意な低下がみられた。その他、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。

免疫学検査(9週齢時)

1) ヒツジ赤血球 (SRBC) に対する抗体価には、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。

2) 胸腺及び脾臓重量は、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。

免疫学検査(10週齢時)

1) 胸腺及び脾臓重量は、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。

2) イムノフェノタイピング: 雄では、DES 0.02 µg/kg 投与群において、脾臓では CD4 抗体陽性/CD8 抗体陰性細胞の有意な増加が認

められた。その他、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。雌では、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。

3) リンパ球幼若化反応試験: 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。

4) 白血球数: 雄では、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。その他、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。

雌では、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。

5) サイトカイン測定: 雄では、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。雌では、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。その他、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。

【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

BPA の胎児期及び授乳期慢性曝露による海馬 DCX 及び NeuroD 免疫活性に及ぼす影響

BPA を胎児期及び授乳期に慢性曝露したマウスの海馬歯状回における神経新生に及ぼす影響について、神経芽細胞や神経前駆細胞に特異的に発現する DCX ならびに神

経への分化に促進的に働き、かつ海馬顆粒細胞の成熟に重要な役割を果たす basic Helix-Loop-Helix 型転写因子である NeuroD にそれぞれ特異的な抗体を用いて、免疫組織学的染色法に従い検討を行った。その結果、BPA 曝露群は control 群と比較し、海馬歯状回において DCX 免疫活性の減弱が認められた。また、同じく BPA 曝露群の海馬歯状回において、control 群と比較して、NeuroD 免疫活性の減弱ならびに NeuroD 陽性細胞数の有意な減少が認められた。

BPA 処置による神経幹細胞の分化誘導に及ぼす影響

マウス全脳由来神経幹細胞を用いて BPA 処置による神経幹細胞の分化誘導への影響を免疫組織学的染色法に従い検討を行った。その結果、BPA 処置により神経幹細胞から GFAP 陽性アストロサイトへの分化誘導の促進が認められた。

BPA の胎児期及び授乳期慢性曝露による海馬 GFAP 及び MAG 免疫活性に及ぼす影響

BPA を胎児期及び授乳期に慢性曝露したマウスの海馬領域におけるグリア細胞の発現について、アストロサイトのマーカーである GFAP ならびにオリゴデンドロサイトのマーカーである MAG にそれぞれ特異的な抗体を用いて、免疫組織学的染色法に従い検討した。その結果、BPA 曝露群は control 群と比較し、GFAP 免疫活性の著明な増強が認められた。また、BPA 慢性曝露群においては control 群と比較し、MAG 免疫活性の著明な増強が認められた。

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

胎生 14 日目のマウス全脳より DNA を抽出し、アストロサイト構成タンパクである GFAP 遺伝子の DNA メチル化状態について検討した。

その結果、胎生 14 日目の GFAP 遺伝子は、control 群、BPA 慢性曝露群共に高度にメチル化されており、両群間で差は認められなかった。

BPA の胎児期慢性曝露による HDAC ならびに Jmjd2A mRNA の発現量変化

BPA 慢性曝露により、胎児期における HDAC 1、2 ならびに Jmjd2A mRNA 発現量の有意な減少が認められた。一方、成体期における HDAC 1、2 mRNA ならびに Jmjd2A 量に変化は認められなかった。

BPA の胎児期及び授乳期慢性曝露による海馬新生細胞の同定

BPA の胎児期及び授乳期慢性曝露により、海馬において DCX 及び NeuroD 免疫活性の減弱が海馬神経新生効率の低下によるものか否かを、BrdU を用い、さらに詳細に検討を行った。新生細胞を検出する目的で、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て免疫染色法に従って検討した。その結果、異所性に局在が認められた BrdU 陽性細胞とオリゴデンドロサイトのマーカーである Olig2 陽性細胞との共局在が認められた。このことから、BPA の胎児期及び授乳期慢性曝露により、異所性にオリゴデンドロサイトが新生している可能性が示唆された。

BPA の胎児期及び授乳期慢性曝露によるヒストン修飾の変化

BPA の胎児期慢性曝露により、olig2 の遺伝子プロモーター領域において、促進性のヒストン修飾である、ヒストン H3K4 トリメチル化の有意な増加が認められた。

●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

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

PTU 投与により離乳時の体重は用量依存的に減少し、行動試験実施時まで体重に影響は残ったが、すべての仔ラットは強化スケジュール下で適切な反応パターンを習得した。しかし、学習習得過程、最終的な SCOB パフォーマンスレベル、及び短期記憶の保持には PTU 投与による用量依存的な影響が明確に認められた。SCOB の訓練段階において、特に DRO 反応率は用量に依存した明確な影響を受けた。また、FR と DRO に対応した反応パターン切替えの正確さの指標である Accuracy 値も同様に影響を受けた。タイムアウト時間を上下させる訓練最終段階では Accuracy 値をタイムアウト時間に対してプロットした Delay-Accuracy 曲線 (短期記憶の保持曲線に相当) が得られるが、得られた曲線は PTU 投与群では全体として下方にシフトするとともに、遅延時間が長い場合程 Accuracy が低値となる右下がりのものとなった。PTU 投与により記憶の忘却率が増大したとみなし得るものである。

これらの結果は、PTU が SCOB を指標とした認知機能影響の評価において適切な陽性対照物質となること、逆に上述した SCOB 課題が学習や短期記憶といった認知機能に対する影響を評価するための適切な試験方法となることを示す。

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

訓練に使用したすべてラットが強化スケジュール下での適切な反応パターンを習得した。交替型混合スケジュールでは、反応抑制が求められる条件下での行動指標値 (DRO 反応率) は学習の進行とともに低値と

なるが、BPA の妊娠・授乳期曝露 (0.33~33 ppm 混餌) を受けたラットでは DRO 反応率に対照群と比較して有意かつ用量依存的影響が認められ、結果として学習習得の遅延と考えられるものとなった。

一方、訓練進行後の最終的なパフォーマンスには差がなかった。セッション内でタイムアウト時間を上下させる訓練最終段階のデータからは、測定の結果得られた Accuracy 値をタイムアウト時間に対してプロットした Delay-Accuracy 曲線を求めた。これは短期記憶の保持曲線に相当するものとなるが、訓練の最終段階では短期記憶への影響は観察されなかった。

また、薬理学的負荷試験では BPA の影響は明らかではなかった。

3 年間で実施した各実験のまとめ

1) PTU (ラット): 学習習得過程を示す学習曲線及び短期記憶の保持曲線に用量依存的な明確な影響が認められ、陽性対照として本物質が使用可能なことが示された。

2) PTU (マウス): 学習習得過程では影響が認められたが、短期記憶の保持について影響は認められなかった。

3) 老化促進マウス: 老化促進マウス (SAM8 及び SAM10) のパフォーマンスを対照マウス (SAMP) と比較したところ、SAM10 マウスでは他のマウスと比較して早期 (40 週齢頃から) に Accuracy の低下が生じることが示された。

4) BPA (ラット): 1 回目の実験では低用量域において用量依存的な曝露影響が学習習得過程において認められたが、短期記憶過程への影響はなかった。2 回目の再試験で

は有意な影響は認められなかった。

5) BPA (マウス) : 学習習得過程で曝露影響が認められたが、ラットの 1 回目の実験とは異なり逆 U 字型の量-影響関係となった。曝露の影響自体は高い反応率として特徴づけられ、ラットの場合と同様の傾向であった。以前に実施した同様の実験では有意ではないものの同じ傾向の結果が得られている。

●今井 清: 新生児脳の性分化への化学物質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 —

HE 染色による組織学的観察では、対照群及び DES 投与群の視床下部前腹側室周囲核に変化はなく、両群の間で ER α 陽性細胞数にも差は認められなかった。しかし、性周期が正常に回帰した動物について、発情前期～発情期と発情後期～発情休止期における ER α 陽性細胞数を神経核ごとに比較したところ、発情後期～発情休止期と比較すると、発情前期～発情期における ER α 陽性細胞数が、減少する傾向が認められた。また、剖検時に性周期異常が観察された動物では、正常な性周期を回帰した動物と比較すると、前腹側室周囲核において ER α 陽性細胞が減少する傾向が認められたが、性的二型核においては逆に ER α 陽性細胞数が増加する傾向にあった。

一方 GnRH 陽性神経線維は、性的二型核と比較すると、前腹側室周囲核及び弓状核においてより多くの陽性神経線維が認められたが、その数に性周期との相関は認められず、また各神経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。

なお、扁桃核と視床下部の中間に存在し、その容積は雌より雄の方が大きく、ヒトでは性

アイデンティティを担当すること、またラットではアルギニンバソプレッシンの性差の性分化と性ステロイドとの関連が指摘されている分界条床核に多数の ER α 陽性細胞が認められたが、その数に対照群と DES 投与群との間に明らかな差はなく、この部に GnRH 陽性線維は確認されなかった。

一方、下垂体前葉では、大型で円形の核が偏在し、一部には豊富な細胞質の中に周囲にハローを有する封入体構造を有する I 型好塩基細胞では、細胞質内には FSH 陽性の微細な顆粒が高密度で彌慢性に観察され、円形の核が細胞質の中心に位置し卵円形でやや小型の II 型好塩基細胞細胞では、FSH 染色陽性の微細顆粒が散在性に分布していた。性周期の変化に伴って、I 型好塩基細胞と II 型好塩基細胞の比率に変化が見られ、発情後期～発情休止期と比較すると発情前期～発情期では I 型好塩基細胞が減少しより多くの II 型好塩基細胞が観察された。ER α は I 型好塩基細胞、II 型好塩基細胞の細胞核に陽性を示したが、発情後期～発情休止期では I 型好塩基細胞、II 型好塩基細胞とも核が ER α に強陽性に染色された細胞が散見され、発情前期～発情期にかけては核が ER α に強陽性に染色される細胞は観察されなかった。

DES に経胎盤・経乳汁的に暴露された群で性周期が正常に回帰していた動物の下垂体においては、対照群と比較して病理形態学的に差は認められなかったが、持続発情あるいは休止期が持続していた例では、HE 染色で I 型好塩基細胞の減少が観察され、これに伴って I 型好塩基細胞と II 型好塩基細胞の中間型と考えられるやや大型で好塩基性に染まる細胞質の一部に好酸性染色領域を有する卵円形ないし多型性細胞の増加が認められた。これとともに I 型好塩基細胞

胞、II型好塩基細胞ともER α 及びFSHの染色性が低下した。なお、観察期間途中で一時的に性周期の乱れを生じたが、剖検時には正常の性周期が観察された例では、下垂体に病理形態学的変化は認められなかった。

また、各例いずれにも下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞に変性・壊死などの退行性変化は認められなかった。

なお、今回の観察ではDES投与群と対照群の間にPRL陽性細胞数に差はなく、持続性の性周期異常が認められた例においてもPRL細胞数に変化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

1)妊娠期へのTCDD投与の影響

8~10週齢の妊娠NFS/*sld*マウス(3日目、15日目)及び非妊娠マウスにTCDD(100、1000 ng/Kg 体重)を腹腔内投与した後、妊娠マウスに関しては出産、授乳、離乳後6ヶ月齢にて解析した。非妊娠マウスにおいても6ヶ月齢にて解析した。全身諸臓器について固定後、有機溶媒に浸染したのち組織切片を作成して病理組織学的検討を実施した。その結果、非妊娠マウスへのTCDD投与により唾液腺(顎下腺)に軽度のリンパ球浸潤が認められたが、その頻度は低かった。それに対して、妊娠15日目にTCDDを投与すると激しい炎症性病変が高率に見られ、高濃度投与群では半数以上が強い炎症性病変を呈していた。炎症性病変は導管周囲の巢状単核細胞浸潤及び腺房細胞の萎縮、破壊として観察された。

TCDDの投与によるT細胞のサイトカイン産生能への影響を検討するために、固相化抗CD3抗体による*in vitro*での刺激で脾臓

のT細胞から分泌されたサイトカインに関して培養上清を用いてELISA法にて定量化した。妊娠初期及び後期にTCDDを投与した群において、IL-2の産生がTCDDの投与により増加していることが判り、非妊娠マウスへのTCDD投与ではIL-2の産生上昇は確認されず、逆に1000 ng/kg投与によりIL-2の産生は低下していた。IFN- γ に関しては妊娠後期へのTCDD投与により産生上昇が認められたが、妊娠初期投与群、非妊娠群ではTCDDの影響は認められなかった。また、TCDD非投与群を比較すると、妊娠群で非妊娠群よりもIFN- γ の産生が増加していることが判った。

妊娠後期へのTCDD投与によりTh1型のサイトカインの産生が増加していたことから、Th1、Th2サイトカイン産生を制御することが知られている転写因子であるT-bet、GATA-3に関して各群の脾臓におけるT細胞での各分子のmRNA発現をreal-time PCR法にて定量化した。Th1型サイトカインを調節することが知られているT-betに関しては妊娠後期にTCDD投与されたTh2型サイトカインを調節することが知られているGATA-3に関しては妊娠後期TCDD投与群で発現の低下傾向が認められた。

TCDDによる胸腺への影響として、胸腺における自己抗原の発現を制御しているAIREの発現に関し、各群の胸腺組織を用いて解析した結果、妊娠後期にTCDDの投与によりAIREのmRNA発現が有意に低下していることが判明した。妊娠初期及び非妊娠投与群においてはAIREの発現に大きな変化は認められなかった。さらに、代表的な自己抗原のmRNA発現に関して検討したところ、唾液腺抗原として知られているSP-1に関して、妊娠後期群でTCDDの投与により、AIREの発現パターンと一致して、低下して

いることが明らかになった。他の自己抗原である GAD67、Insulin に関しては各群で TCDD による影響は確認されなかった。Insulin に関しては妊娠両群で非妊娠群に比較して有意に発現が低下していることが確認された。

2) 卵巣摘出マウスへの TCDD 投与

6 週齢にて卵巣摘出術 (Ovx)、TCDD 投与を行い、8 ヶ月齢にて屠殺後、全身臓器の病理組織学的解析を行った結果、8 ヶ月齢での唾液腺 (顎下腺) では、卵巣摘出 (Ovx) 群及び対照 (Sham) 群でそれぞれ軽度の加齢的变化と考えられる炎症性病変が認められるものの、両者に組織学的な差は確認されなかった。TCDD 100 ng/kg 投与では Ovx 群で激しい炎症性病変を認める個体が観察され、Sham 群でも中等度の炎症性変化が見られたが、両者に統計学的な有意差が認められなかった。TCDD 1000 ng/kg 投与では、Ovx 群では 80% のマウスで組織破壊を伴う激しい炎症性病変が観察され、Sham 群では 25% 程度のマウスで強い炎症性病変が認められた。組織学的スコアを用いた解析では TCDD 1000 ng/kg 投与によって Ovx 群と Sham 群で有意な差が確認された ($p=0.045$)。

CD4 陽性 T 細胞の活性化状態をまた、T 細胞のサイトカイン産生を確認するために、脾細胞を固層化抗 CD3 抗体にて刺激した培養上清を用いて ELISA にて各サイトカイン濃度を定量すると、IFN- γ の産生が Ovx 群において TCDD 投与により、Sham 群に比較して有意に上昇していることが確認された。GATA-3 の発現に関しては、胸腺での動態と類似して、Ovx でその発現が低下し、高濃度の TCDD 投与により Sham 群のレベルと同程度に回復した。T-bet の mRNA 発現に関し

て変化は認められなかった。

T 細胞分化を司る胸腺組織への TCDD 暴露による影響を Ovx 群と Sham 群で比較した。TCDD 非投与において、Ovx によって CD4 陰性 CD8 陰性 (Double negative: DN) 分画細胞数が有意に減少していることが判り、Sham 群では TCDD 投与により DN 分画は減少傾向にあるのに対し、Ovx 群では DN 分画の増加が見られ、TCDD 1000 ng/kg 投与では Ovx 群の DN 分画は Sham 群に比較して有意に上昇していることが確認された。

胸腺分化異常に基づいた自己免疫疾患の発症機序の一つとして、胸腺上皮細胞における自己抗原遺伝子の発現調節が重要であるということが知られている。そこで、唾液腺組織特異的自己抗原の一つである SP-1 の mRNA 発現を検討したところ、Ovx により発現の増加傾向が見られ、TCDD 投与により、Sham 群、Ovx 群ともに著しく SP-1 の発現が低下することが明らかになった。さらに、AIRE の mRNA 発現を観察してみたところ、Ovx によって有意に減少することが判り、TCDD の投与により Sham 群では濃度依存的に AIRE の発現が低下するのに対し、Ovx 群では逆に上昇することが明らかとなった。

●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

1. 培養細胞を用いた実験系

1) フローサイトメトリーによる CD86 の発現確認

3 及び 6h 暴露では、いずれの群でも RFI は 120 未満であった。24h 暴露の強度感作性物質 DNCB 0.3 及び 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、中程度感作性物質 EUG 10 及び 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で RFI が 120 以上となった。非感作性物質 PG では、いずれの時点でも 100 及び 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共

に RFI が 120 未満であった。

2) 2D-DIGE によるディファレンシャル解析

変動スポット数は、強度感作性物質 DNCB が最も多く、中程度感作性物質 EUG、非感作性物質 PG の順に少ない傾向が見られた。また、各物質のサンプリングポイント間で比較すると感作性物質 2 種では 6h 暴露後に最も多かった。

3) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

24 時間暴露の強度感作性物質 DNCB の高用量群 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、被験物質暴露の影響によると考えられる RNA の分解が $n=3$ 全例に見られ、RNA の品質が遺伝子発現解析には適さなかったことから、24 時間暴露の DNCB については低用量群 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ について解析を実施した。

初めにマイクロアレイによる遺伝発現解析データから CD86 を検索し、遺伝子 (mRNA) レベルでの発現量を確認したところ、24 時間暴露では媒体対照群に対して感作性物質 DNCB (低用量群) 及び EUG は、フローサイトメトリーで確認したタンパク質レベルでの発現と同様の比率で増加していたが、遺伝子レベルでは 6 時間暴露の時点で既に感作性物質 DNCB (高用量群) 及び EUG でより大きな発現増加がみられた。加えて遺伝子レベルでは 6 時間暴露の方が 24 時間暴露に比べ、発現変動遺伝子数も多かったこと (data not shown) から、以後の解析は 6 時間暴露のデータを中心に行うこととした。

次に媒体対照群に対して 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、かつ非感作生物質 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

ところ、感作性物質特異的に発現増加及び発現減少した遺伝子が、それぞれ 249 遺伝子及び 871 遺伝子得られた。

4) 遺伝子機能及びネットワーク解析

感作性物質特異的に発現増加した遺伝子機能について IPA ソフトウェアを用いて調べたところ、遺伝子機能情報が得られたものは 249 遺伝子中 119 遺伝子あり、そのランキングは 1 位:「細胞の成長と分化」(62 遺伝子)、2 位:「細胞死」(55 遺伝子)、3 位:「免疫系疾患」(31 遺伝子)であった。

一方、感作性物質特異的に発現減少した遺伝子機能を調べたところ、遺伝子機能情報が得られたものは 871 遺伝子中 425 遺伝子あったが、発現増加した遺伝子群に比べ、免疫系に関連性が高い遺伝子群は上位に來なかった。

5) 抽出したマーカー候補タンパク質との比較

抽出したマーカー候補タンパク質について遺伝子発現解析データとの比較を行ったところ、タンパク質レベルで発現変動し、共通の発現変動を示す遺伝子は 3 種あり、これらは、有力なバイオマーカー候補であると考えられた。

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) 母動物

媒体対照群、BPA 低用量群及び BPA 高用量群で分娩した動物はそれぞれ 6/12 匹、5/12 匹、6/12 匹であった。媒体対照群と比較していずれの群においても出産率、妊娠期間及び産仔数は媒体対照群と比較していずれの群においても影響は認められなかった。