

2) 仔動物

いずれの群も出生時の出生仔外表に異常はみられなかった。

a) LLNA 雄仔動物について

媒体対照群における AOO 群、0.5%DNCB 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.15 、 7.15 ± 0.24 であった。

BPA 低用量群における AOO 群、0.5%DNCB 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.22 、 12.45 ± 0.66 であった。

BPA 高用量群における AOO 群、0.5%DNCB 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.10 、 11.86 ± 0.87 であった。

0.5%DNCB 群について、媒体対照群に対して BPA 低用量群及び高用量群で有意な上昇が認められた。

b) LLNA 雌仔動物について

媒体対照群における AOO 群、0.5%DNCB 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.15 、 7.15 ± 0.24 であった。

BPA 低用量群における 0.5%DNCB 群の SI 値は 16.51 ± 0.55 であった。

BPA 高用量群における AOO 群、0.5%DNCB 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.19 、 14.35 ± 0.23 であった。

0.5%DNCB 群について、媒体対照群に対して BPA 高用量群で有意な高値が認められなかった。なお、BPA 低用量群は AOO 群の動物が確保できなかったため、媒体対照群における AOO 群との比から 0.5%DNCB 群の SI 値を算出した。

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物学的解析研究

1. 精巣下降への影響

1-1. DES 曝露の影響

(平成 20 年度)妊娠 9～16 日投与群:DES 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群において肉眼的に精巣下降不全が観察され、解剖学的毒性指標とした精巣－腎臓間距離は DES の用量に依存して減少し、6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群において統計学的有意差が認められた。しかし、胎児体重、精巣重量ならびに精巣比体重値には群間に差はみられなかったことから、精巣－腎臓間距離減少と胎児発育との間に明瞭な関連はないと考えられた。肉眼的に精巣下降不全が観察された 25 あるいは 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において、Insl-3 mRNA の発現が有意に抑制された。精巣－腎臓間距離が有意に短縮した 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、いずれの遺伝子 mRNA の発現も対照レベルであった。

妊娠 15～17 日投与群:いずれの投与群においても肉眼的に精巣下降不全は確認されず、精巣－腎臓間距離及び精巣重量にも群間に差はみられなかった。さらに、Insl-3、SF-1 あるいは P450scc のいずれの mRNA 発現にも DES 投与の影響は認められなかった。

1-2. FLU 曝露の影響

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

1-3. BPA 曝露の影響

妊娠 9～16 日投与群:いずれの投与群においても肉眼的に精巣下降不全は観察されず、また精巣－腎臓間距離及び精巣重量にも群間に差はみられなかった。いずれの投与群の Insl-3 mRNA も対照群に比し変わらな

かったが、200 µg/kg 群の SF-1 mRNA 発現は有意に抑制された。さらに P450scc mRNA については BPA の投与量に依存して発現は抑制され、対照群と 200 µg/kg 群との間に統計学的有意差が認められた。

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

陽性対照として用いた EE の妊娠 9～16 日の曝露により、精巣下降不全が観察されたが、胎児体重及び精巣重量はいずれも対照群と同等であった。Insl-3 mRNA の発現は対照群と比較して著しく減少したが、SF-1 あるいは P450scc については影響は明らかではなかった。

(平成 21 年度)

1-4. BPA 投与群

いずれの投与群においても DTA/100 U が増加する傾向がみられた。また Insl-3 mRNA 発現はいずれの投与群においても対照群に比し変わらなかったが、SF-1 及び P450scc mRNA は減少傾向にあった。

1-5. NP 投与群

いずれの投与群においても DTA/100 U が増加する傾向にあり、Insl-3 mRNA 発現は投与量に依存して減少した。SF-1 mRNA 発現は 12.5 mg/kg 投与群において有意に減少した。さらに P450scc mRNA 発現は 12.5 mg/kg 以上の投与群において有意に減少した。

1-6. BBP 投与群

50 mg/kg 以上の投与群において DTA/100 U が有意に増加した。Insl-3 及び SF-1 mRNA 発現は対照レベルであったが、P450scc mRNA 発現はいずれの投与群にお

いても減少傾向にあった。

1-7. Flu 投与群

5 mg/kg 投与群において DTA/100 U が有意に増加した。Insl-3 mRNA 発現は対照群に比し変わらなかったが、SF-1 mRNA 発現は 2.5 mg/kg 投与群において有意に減少し、P450scc mRNA 発現はいずれの投与群においても減少傾向にあった。

2. DNA メチル化酵素遺伝子 mRNA 発現及びゲノムワイドな DNA メチル化状態に及ぼす影響

(平成 19 年度)

2-1. EE 胎生期曝露の影響

免疫染色の結果、EE 投与群及び対照群のいずれにおいても、セルトリ細胞とライディッヒ細胞に Dnmt1 タンパクの局在が認められた。Dnmt3a タンパクについては EE 投与群及び対照群のいずれにおいても前精原細胞及び精原細胞に強い発現がみられた。

2-2. DES 胎生期曝露の影響

免疫染色の結果、Dnmt1 タンパクの局在には DES 投与の影響は認められず、精細管内側周辺細胞(前精原細胞及び精原細胞)に発現がみられたが、その発現はやや弱くなる傾向を示した。

2-3. BPA 胎生期曝露の影響

免疫染色の結果、同時期の精巣には BPA 投与群及び対照群のいずれにおいても、セルトリ細胞とライディッヒ細胞に Dnmt1 タンパクの局在が認められた。Dnmt3a タンパクについては BPA 投与群及び対照群のいずれにおいても、前精原細胞及び精原細胞に強い発現がみられた。

(平成 20 年度)

投与後の胎齢 13、15 あるいは 18 日胎児の性腺について電子顕微鏡による超微形態観察を行ったところ、生殖細胞のアポトーシ

ス像、暗調セルトリ細胞あるいは間質細胞の肥大が観察されたが、いずれの変化もその発現頻度は低率であり、傷害の程度も軽度であった。さらにこれらの変化は対照群の精巣の精細管でも低率に観察された。

(平成 21 年度)

DES あるいは EE に胎生期曝露された性腺生殖細胞から RNA を抽出し cDNA を合成して real-time PCR を行った結果、いずれの投与群のいずれの Dnmt mRNA 発現も増加した。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。また、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(メチル化 CpG 部位数/全 CpGs 部位数 x100)は、対照群で 18.9%であったが、EE 投与群では 60.2%であり(p <0.05)、EE の胎生期曝露はインプリント遺伝子の DNA メチル化パターンを変化させた。

●太田 亮:周産期・小児期の化学物質曝露による生殖器系の発達及び老化に及ぼす影響の研究

【体重推移】マウスでは、10 週齢以降の雌の体重が、DES 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。ラットでは、10 週齢以降の体重推移に DES 投与の影響は認められていない。

【性成熟】マウスでは、雌の膣開口時期が DES 5 µg/kg 投与群で対照群と比較して有意に遅延した。雄の陰茎包皮分離時期には、対照群と DES 投与群との間で差は認められなかった。ラットでは、DES 投与により、雌の膣開口時期が対照群より早まることが確認されている。

【性周期】マウスでは、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、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性周期異常を示した。ラットの一生涯試験でもほぼ同様の結果が得られている。

【器官重量】マウスでは、雄の器官重量のうち、凝固腺が DES 0.005、0.5 及び 5 µg/kg 投与群、精囊が DES 5 µg/kg 投与群で対照群より有意に低下した。ラットでは雄の器官重量に DES 投与の影響は認められていない。

【免疫検査】マウスでは、ヒツジ赤血球に対する抗体産生能は、雄で用量依存的に低下する傾向がみられ、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みられなかった。ラットでもほぼ同様の結果が雄でみられている。

【生存率】マウスでは、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。ラットにおいても、雌の DES 5 µg/kg 投与群において生存日数の短縮がみられている。

【腫瘍】マウスでは、雌の DES 0.5 及び 5 µg/kg/day 投与群の死亡例で、下垂体腫瘍がみられた。ラットにおいても、DES 5 µg/kg/day 投与群で下垂体腫瘍が早期に発生することが確認されている。

●松島 裕子: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

母動物;

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

出生児;

分娩時の平均出産数は、溶媒対照群、BPA 5 μ g/kg 及び BPA 50 μ g/kg 群、各々 14.8 \pm 1.0 (母動物数 n=9)、13.4 \pm 4.0 (n=11) 及び 14.1 \pm 2.10 (n=11)、平均雄児数 (F1) は、各々 6.9 \pm 1.1、6.9 \pm 3.7 及び 7.4 \pm 2.5、平均雌児数 (F1) は、各々 7.9 \pm 1.2、6.3 \pm 3.3 及び 6.5 \pm 2.6 であり、溶媒対照群と BPA 投与群との間に有意な差はみられなかった。

膣開口検査;

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

性周期検査;

3 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 μ g/kg 群及び 50 μ g/kg 群で各々 0/23、1/19、1/17 例が性周期異常を示した。

4 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 μ g/kg 群及び 50 μ g/kg 群で各々 3/23、4/19、5/17 例が性周期異常を示した。

5 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 μ g/kg 群及び 50 μ g/kg 群で各々 2/23、6/19、1/17 例が性周期異常を示した。

6 ヶ月齢時の性周期検査では、溶媒対照群、BPA 5 μ g/kg 群及び 50 μ g/kg 群で各々 5/23、12/19、8/17 例が性周期異常を示した。

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

臓器重量;

PND21 時 (各群 14 例) では、5 μ g/kg 群で卵巢の絶対及び相対重量の低値がみられた。

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

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

6 ヶ月齢時では、全ての臓器において絶対及び相対重量とも溶媒対照群と BPA 投与群との間に差はみられなかった。一方、卵巢の相対及び絶対重量は、正常な性周期を示す動物に比し、持続発情あるいは持続発情前期を示す動物では有意に低値であった。

6 ヶ月齢時の卵巢の病理組織学的検査;

持続発情期及び持続発情前期を呈した動物に卵胞嚢胞の形成と及び黄体の形成不全がみられた。

乳腺の whole mount preparation 検査;

6 ヶ月齢時では、対照群に比し BPA 投与群において持続休止期を呈した動物の terminal end buds の拡張傾向が認められた。

6 ヶ月齢時の血清生化学検査;

E₂ 値は、正常な性周期を示す動物では、溶媒対照群と BPA 投与群では差は見られなかった。一方、溶媒対照群及び同群の正常性周期を示す動物に比し BPA 5 μ g/kg では、持続休止期を呈する動物、BPA 50 μ g/kg 群では持続発情期及び持続休止期を示す動物で有意に低値であった。

血清 FSH 値は、正常な性周期を示す動

物では、溶媒対照群とBPA投与群では差は見られなかった。一方、BPA 5 μ g/kg 群では溶媒対照群で正常性周期を示す動物に比し持続発情期を示す動物で有意に高値であった。BPA 50 μ g/kg 群では同群で正常性周期を示す動物に比し、持続発情期及びirregular cycleを示す動物が有意に高値であった。

血清 LH 値は、溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、同群のirregular cycleを示す動物で有意に低値であった。BPA 5 μ g/kg 群では溶媒対照群で正常性周期を示す動物に比し、持続発情期及び持続休止期を示す動物が有意に低値であり、更に持続休止期の動物は、同群で正常性周期を示す動物と比しても有意に低値であった。BPA50 μ g/kg 群では溶媒対照群で正常性周期を示す動物に比し、正常性周期、持続発情期及びirregular cycleを示す動物で有意に低値であった。

血清プロラクチン値は、溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、同群でirregular cycleを示す動物で有意に低値であった。BPA 5 μ g/kg 群では、溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、正常性周期及び持続休止期を呈する動物において有意に低値であり、更に持続休止期を呈する動物では同群の正常性周期を示す群と比しても有意に低値であった。BPA 50 μ g/kg 群では溶媒対照群で正常な性周期を示した動物に比し、正常性周期、持続休止期及びirregular cycleを示す動物が有意に低値であり、更に持続休止期を示す動物は同群の正常性周期を示す動物と比しても有意に低値であった。

6ヶ月齢時の下垂体 GnRH 受容体 mRNA の発現；

正常な性周期を示す動物に比し持続発情期及び持続発情前期を示す動物において有意に低値であった。

下垂体のプロラクチン免疫組織学染色
定量化継続中。

【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

DMSO の ES/EB 系の遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイにて検索したところ、外胚葉、中胚葉、臓側内胚葉マーカーに明らかな影響は観られなかったが、心筋分化マーカーの発現が 0.5 日程度早期に見られることが明らかとなった。次いで、BPA の ES/EB 系の遺伝子発現マイクロアレイ解析データの解析を実施した。すなわち、細胞当たりのコピー数や増減比による足切りを行わず、有意 ($p < 0.05$) に変動した全遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、中胚葉、外胚葉、臓側内胚葉については影響は認められなかった。核内受容体の発現について検索したところ、androgen receptor (AR) が培養 1~2 日目で、有意に高かった。コレステロール、アンドロジェン、エストロジェン合成に関与する蛋白をコードする遺伝子発現増加が BPA 添加 1~2 日目に認められた。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、6.5~9.75 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 (data not shown)。

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。

●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) アンドロゲン応答性遺伝子発現を指標にした新生児期 DES 暴露の作用

DES 0~5 $\mu\text{g}/\text{kg b.w.}/\text{日}$ を生後 1~5 日に強制経口投与した C57BL マウスの実験群 (太田グループの実験群) について、成体時のアンドロゲン応答性遺伝子発現を定量した結果、*PSP94*、*defensin β* 、*PCP4* の発現の上昇が見られた。

2) ラットでの前立腺分泌タンパク質同定とそのアンドロゲン応答性

VP では、*prostatein*、*cystatin-related protein 1*、*kallikrein S3*、*spermine binding protein* が主要なタンパク質であった。LP では、VP と同様なタンパク質及び *carbonic anhydrase II* (CA2) が同定された。DP では、*immunoglobulin binding protein* 類似タンパク質、*transglutaminase 4*、CA2、*epididymis specific protein 1*、*peroxiredoxin 6* が発現していた。AP のタンパク質発現は DP とほぼ

同様であった。

同定したタンパク質発現のアンドロゲン応答性を、mRNA レベルで検討した。去勢 1 週間で、CA2 以外の全てのタンパク質の発現は、有意に低下したが、その程度は異なっており、*prostatic protein* の mRNA は、検出限界レベルに低下したのに対し、*probasin* では、対照群の 1/3 程度だった。さらに、去勢動物にテストステロンを投与することで、これらの mRNA の発現が上昇した。ヒト、マウスと共通なタンパク質として *PSP94*、*peroxiredoxin 6*、*GRP78* 及び *defensin* が見いだされた。

3) 前立腺アンドロゲン応答遺伝子のエストロゲン感受性

生後 6 日目及び 9 週齢動物に TP 投与 24 時間で、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 E_2 を投与すると、生後 6 日目動物ではアンドロゲン応答遺伝子がいずれも発現抑制を受けが、9 週齢では、発現レベルに低下がなかった。

4) *PSP94* 遺伝子のプロモーター同定

4a) *mPSP94* 遺伝子上流域のプロモーター活性

mPSP94 の転写開始点上流域を含む *luc* レポーターを作製し、AR 発現ベクターとともに細胞株へ導入したところ、この領域にアンドロゲン応答性転写活性があることが示された。そこで、転写開始点上流 -76、-87、-95、-118、-358、-1202pb 領域について転写活性を検討したところ、アンドロゲンに対する応答性は転写開始点から -87 より短い配列では消失した。-1202 領域のアンドロゲン応答性転写活性は相対的に低かった。

また 118bp レポーターでみると、アンドロゲンへの応答性は、DHT 10-9M で最大値とな

った。またこの転写活性は、抗アンドロゲン剤である OH-flutamide により競合的に阻害された。

4b) アンドロゲン応答配列 (ARE) 類似構造による転写

転写開始点から-84にある半保存 ARE 配列のアンドロゲン応答作用を検索するため、この部位の欠失及び塩基置換したレポーターを作成した。 $\Delta(-79/-95)$ 、 $\Delta(-79/-84)$ でアンドロゲン応答が消失した。さらに、-84の TGTを GAGへ置換した変異レポーターにおいても応答の消失がみられた。一方で、それより転写開始点側の-31/-44の欠失では、転写活性に影響はなかった。

4c) ゲルシフトアッセイ

上流 DNA 領域 +21~-45/、-48~-118、-280~-358(転写開始点+1)の ligoDNA に対する細胞抽出物の結合をみたところ、-48~-118の DNA 断片にのみ特異的な結合が観察された。

5. ERの共発現の作用

5a) PSP94 遺伝子アンドロゲン応答性転写への ERの作用

PSP94 プロモーターレポーター系に、ER α 、ER β の発現プラスミドをコトランスフェクションした。ERの導入は、PSP94 pro-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、PSP94 pro-1202によるアンドロゲン応答性の転写活性を上昇させた。この転写活性化は ER α でのみ観察された。

5b) エストロゲン投与の影響

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た。この作用は、ER α 依存的にみられた。

●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

本研究ではマウス胎児神経幹細胞を主な材料として用い、神経幹細胞成熟前後(胎生11日及び14日)のDNAメチル化状況の網羅的解析し、その変化を制御する分子メカニズムを検討した。

初年度に、ゲノム全体のDNAメチル化状況を把握する手法の導入を進めた。具体的には、生体サンプルから精製したゲノムDNAを断片化し、メチル化シトシンに結合するタンパク質であるMBD2によりメチル化DNA断片を濃縮する、いわゆるChIP(Chromatin immunoprecipitation)法と、サンプル中のDNA領域の存在量を網羅的に定量化するtiling array法(Chip)を融合させたChIP on Chip法の活用を図った。高メチル化状態にあるGFAP exon1領域を対象とし、MBD2を用いたChIPによって同領域が濃縮されること、低メチル化状態の領域は濃縮されないことを確認し、ChIP法の導入に成功した。次に、ChIP法によって濃縮される微量のゲノムDNAをChip解析に適用可能な量まで増幅する手法を検討し、random-primer PCR法により出来るだけ偏りを減らした増幅が可能であることを確認し、tiling arrayを用いたChip法の導入にも成功した。さらには両手法を融合させたChIP on Chip法により、網羅的なデータが得られることも確認した。

2年目に、実際のサンプルを用いたデータ取得を行った。マウスでは胎生11日以降に、神経幹細胞にDNAメチル化を含むエピジェネティックな変化が生じ始め、ニューロンにしか分化しない性質からグリア細胞にも分化しうる性質を獲得することが知られている。そこで胎生11日及び14日の胎児終脳のゲノムDNAについて、メチル化DNA断片の分離精製とマイクロアレイを組み合わせたChIP

on Chip 法により、ゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に解析した。その結果、アストロサイト特異的発現が報告されている遺伝子群 40 遺伝子 (JNS 2008:28: p.264-278) 中 24 遺伝子が胎生 14 日で脱メチル化傾向にあることが判明した。そこで、24 遺伝子のプロモーター配列について共通配列の有無を Genomatix suite を用いて検索した結果、核内受容体結合配列が多く抽出された。それらは NR2 (Nuclear receptor subfamily 2) 及び RXR の結合配列であった。この結果は、脱メチル化されるべき DNA 領域の目印として核内受容体が関与している可能性を推察させるものである。すなわち、核内受容体作動性物質に DNA メチル化を変化させる作用がある可能性が示唆される。

最終年度は、前年度の網羅的解析から同定した胎生 14 日に脱メチル化される DNA 領域について bisulfite sequencing 法による検証を行った。材料としては、胎生 11 日及び 14 日の胎児終脳のゲノム DNA に加え、分化した細胞として、胎生 11 日の神経幹細胞を bFGF を加えない条件で分化させて得たニューロン及び新生児から分離培養したアストロサイトを用いた。まず陽性コントロールとして、胎生 14 日で脱メチル化が進む DNA 領域である GFAP 遺伝子のプロモーター、Aldoc 遺伝子のプロモーターの 2 領域を選び、bisulfite sequencing を行った。その結果、両 DNA 領域とも胎生 14 日で脱メチル化が進んでいることが確認された。次に、網羅的解析から同定した 4 領域について検討した。

その結果、1 番染色体の領域において胎生 14 日で脱メチル化が進んでいること、胎生 11 日の神経幹細胞から分化させたニューロンでは胎生 11 日の神経幹細胞同様メチル化されたままであること、アストロサイトではほぼ完全に脱メチル化されていることが分かっ

た。さらに、興味深いことに、この DNA 領域の近傍に存在する Pou3f3 遺伝子を含む複数の遺伝子の発現が、胎生 14 日に低下していることが分かった。さらには、近傍から離れると発現低下は認められず、この DNA 領域を介した特異的な遺伝子発現制御機構の存在が示唆された。一方で、その他の領域の脱メチル化ははっきりしなかった。

そこで、1 番染色体の領域について配列上の特徴が無いか調べた。その結果、STAT-ETS の promoter module が 2 ヶ所見出された。転写因子である Stat や Ets タンパク質には、ゲノム上に DNA methyltransferase をリクルートする活性があるという報告があることから、この DNA 領域がこれら転写因子を制御するシグナル伝達の影響を受け、DNA メチル化状態変化を受ける可能性が示唆された。

●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 の癌抑制作用: AhR^{-/-}マウスは特に腸の回盲部に癌が発症し易い事を発見し、その時間経過を検討した。その結果、生後 8 週目に癌が出現し 11 週で 100%の AhR^{-/-}マウスに癌が出来る事が分かった。その原因を探ると AhR^{-/-}マウスの腸管上皮に β-カテニンが異常に蓄積している事が見出された。さらにこれに付随して cMyc や cyclin D1 の発現も増強している事が分かった。我々は先に AhR が ER や AR のユビキチン化、分解に E3 ユビキチンリガーゼとして働いていることを明らかにしたが、β-カテニンが AhR によるユビキチン化の基質になっているかを検討した。β-カテニンは ER 等と同じように AhR、Cul4B 等によって構成される E3 リガーゼによってユビキチン化、分解される事が明らかになった。腸管上皮では APC によるユビキチン化によ

るβ-カテニンの分解系が有名である。APCとAhRのβ-カテニンのユビキチン化の関係を検討するためにAPCとAhR遺伝子の二重欠失マウスを作製して腸癌の発症を調べた。APC^{min/+}やAhR^{-/-}マウスの単独遺伝子欠失マウスと比較してAPC^{min/+}AhR^{+/-}やAPC^{min/+}AhR^{-/-}マウスの二重遺伝子欠失マウスでは回盲部の癌や小腸の癌の発生が顕著に早くなっており、悪性度も高くなっている事が分かった。また免疫組織化学的方法によって検出した腸上皮におけるβ-カテニンの発現も単独遺伝子欠失マウスと比較して顕著に増加している事が確認された。この事はAPCとAhRの2つのβ-カテニンのユビキチン化、分解系が独立して働いている事を示している。APC^{min/+}マウスはAPCの変異によって小腸と盲腸に癌が出来易くなっているマウスであるが、このマウスにAhRのリガンドであるインドール3カルビノール(I3P)やジインドリルメタン(DIM)を食餌として与えてAhRのE3ユビキチンリガーゼ活性を増強すると癌の発症がどのような影響を受けるかを検討した。AhRのリガンドが与えられたAPC^{min/+}やAPC^{min/+}AhR^{+/-}マウスでは盲腸癌も小腸癌もその発症が顕著に抑制されている事が分かった。しかし、AhR遺伝子の発現していないAPC^{min/+}AhR^{-/-}マウスではリガンドの発癌抑制効果が認められなかった。β-カテニンの発現を免疫組織染色法で検討するとAhRの発現している腸管ではリガンドの投与に依存してβ-カテニンの発現が顕著に低下している事が分かった。この事によってAhRのリガンドがAhRの活性化により腸発癌抑制効果を示す事が明らかにされ、AhRのリガンドが癌抑制剤として有効である事が示唆された。

炎症におけるAhRの機能: AhR欠失マウスは一般的に感染に弱い事が知られている。その原因を追及するためにLPS

(lipopolysaccharide)をマウスの腹腔に投与すると野生型に比較してAhR欠失マウスは敗血症ショックに対して著しく敏感になっている事が分かった。LPS処理したマウスの血清に分泌された炎症性サイトカインの量を測定すると、TNFα、IL-1β、IL-18、INFγの分泌がAhR欠失マウスでは野生型マウスに比較して、数倍~十数倍に亢進している事が分かった。マクロファージ特異的にAhR遺伝子を欠失したマウスでもLPSに対する感受性が顕著に亢進している事からLPSによる敗血症ショックに対するAhR欠失マウスの感受性の亢進はマクロファージの機能変化にその原因が求められた。

腹腔から分離したマクロファージを用いてLPS処理をするとIL-1βの分泌がAhR欠失マクロファージでは顕著に亢進している事が認められた。DNA microarray法によって遺伝子発現の変化を調べるとIL-1βのmRNAの発現に顕著な変化は見られなかったが、GST-a3、CYP1B1等の薬物代謝酵素と共にPai2とBcl2 mRNAの発現が顕著に減少していた。この事はqRT-PCRによっても確認された。Pai2とBcl2はInflammasomeに働いてCaspase1の活性を阻害する事によってIL-1βのプロセッシングを抑制し分泌を阻害する事が知られている。AhR^{-/-}マクロファージにPai2の発現ベクターをtransfectionしてPai2を発現させるとIL-1βの分泌が抑えられたが、Bcl2の発現はその効果が認められなかった。従って、AhR^{-/-}マクロファージによるIL-1βの異常分泌はPai2の発現低下による、Caspase1の活性化による事が分かった。

AhRによるPai2遺伝子の発現制御のメカニズムはPai2遺伝子の0.9 Kb~1.3 Kb上流にあるNF-kBサイトにNF-kBとAhRがComplexを作って結合してPai2遺伝子の転写を活性化する事が分かった。このAhRによ

る Pai2 遺伝子の転写活性化には Arnt は関与しない事が Chip 法、Arnt の siRNA、Arnt の欠失マクロファージを用いて明らかされた。

Th 細胞分化 AhR の機能: ナイーヴ Th 細胞を TGF γ 1 処理すると Treg 細胞に分化し、TGF γ 1 と IL-6 で処理すると Th17 細胞に分化する事が知られているが、このときに AhR の発現が誘導される。TGF γ 1 のみの時には数倍、TGF γ 1 と IL-6 による誘導の時には数十倍の誘導が見られた。また、これらの Th 細胞の分化実験に AhR^{-/-} ナイーヴ T 細胞を用いると何れの細胞への分化も著しく障害されている事が分かった。この現象は他の研究グループによっても報告されている。AhR の Th 細胞分化における作用メカニズムの詳細な解明は今後の研究に残された重要な課題である。

AhRR の AhR 転写活性に及ぼすフィードバック阻害の作用メカニズム: AhR 活性はその標的遺伝子産物である AhRR によってフィードバック的に阻害される。AhRR は Arnt とヘテロ 2 量体を形成して AhR/Arnt ヘテロ 2 量体の結合する XRE に結合して AhR/Arnt の転写活性を競争的に阻害するが、その時に ANKRA2、HDAC4、HDAC5 をコリプレッサーとしてリクルートする事が two hybrid 法によるスクリーニングと CHIP 法によって明らかにされた。コリプレッサーは AhRR の C-末端の転写阻害領域で AhRR と結合する事を示したが、この時に AhRR の SUMO 化が必要である事が分かった。AhRR の C 末端には種々の動物種間で保存された SUMO 化サイトのコンセンサス配列が 3 ヶ所存在する。In vitro の SUMO 化の実験で 3 つの SUMO 化サイトにある保存されたリジン残基が SUMO 化される事が分かった。そのリジン残基をアルギニンに置換すると何れの場合も、同じように AhRR の転写抑制活性が低下し、3 つ

すべてのリジン残基を置換すると転写抑制活性は顕著に低下する事が分かった。さらに、AhRR の SUMO 化は、2 量体形成のパートナー分子である Arnt が存在すると顕著に促進される事も分かった。一方、Arnt にも SUMO 化のサイトが一カ所存在するがこの SUMO 化も AhRR の存在によって促進され、逆に転写活性化のパートナー分子である AhR の存在は Arnt の SUMO 化を阻害する事が明らかになった。この SUMO 化によって ANKRA2、HDAC4、HDAC5 と AhRR の結合性が顕著に増強され、HDAC5 は AhRR と直接的に結合するが、HDAC4 と AhRR との結合は ANKRA2 を介することが分かった。この事は SUMO 化が AhRR/Arnt による AhR/Arnt の転写活性の抑制に必要な修飾であることを示している。AhRR/Arnt による阻害はトリコスタチン A によって解除される事から、AhRR による阻害は HDAC 活性による事が確認された。

●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
NF κ B による薬物受容体転写活性化能の抑制

培養細胞において、NF κ B のサブユニットの一つである p65 を強制発現させると NF κ B の活性が上昇する。そこで、肝腫瘍細胞株である HepG2 細胞に p65 を遺伝子導入し、薬物受容体の化学物質依存的な転写活性化に与える影響を調べた。SXR はリファンピシンの濃度依存的にルシフェラーゼ活性を上昇させるが、p65 の発現量を上げていくとリファンピシンによる発現上昇が低下していく。このことは、NF κ B が SXR のリガンド依存的な転写活性化能を阻害していることを示している。同様な結果が CAR (リガンドは TCBO) による

や AhR(リガンドは Benzo[a]pyrene)についても得られた。これらの結果は、免疫系制御因子である NFkB が何らかのメカニズムで SXR、CAR、AhR などの薬物受容体に働きかけ、その転写活性化能を抑制していると考えられる。

LPS 投与による CYP 遺伝子の発現抑制

LPS は、グラム陰性細菌の細胞壁表層にある脂質と多糖の複合体であり、補体を第二経路において活性化させ、マクロファージや他の細胞からのサイトカインや他の免疫調節物質の放出を誘導する。一方、PCN はマウスにおける代表的な CYP3A 誘導剤であり、薬物受容体の PXR(ヒト SXR のホモログ)に結合して、転写レベルで CYP3A11 の発現を上昇させる。

本実験では、まず LPS を腹腔内投与して免疫系を活性化させ、この状態のマウスに PCN を投与して CYP3A11 の発現誘導を調べた。その結果、LPS による免疫系の活性化は有意に CYP3A11 の発現誘導を抑制し、細菌感染は薬物代謝酵素の誘導を阻害すると考えられた。逆に、PCN によって PXR を活性化し、NFkB によって制御されているサイトカイン遺伝子の発現誘導を調べた。その結果、PXR の活性化は IL1b、IL6 の mRNA 誘導を顕著に阻害した。これらの結果は、薬物代謝酵素を誘導するシグナル伝達経路とサイトカインを誘導するシグナル伝達経路が相互に干渉し合い、お互いに阻害する関係にあることを示唆している。

次に、CAR や AhR のリガンドを用い、対応する CYP 分子種誘導への影響を検討した。その結果、CAR が制御していると考えられる CYP2ファミリーの遺伝子についても、同様の傾向が認められた。即ち、通常のマウスでは TCBOB を投与することにより CYP2B10、CYP2C29、CYP2C55 の発現誘導が認めら

れるが、LPS で免疫系を活性化させておいたマウスでは CYP 誘導が顕著に抑制された。しかし、CYP2D22 に関しては、LPS で発現抑制が認められるものの、TCPOBOP では誘導されておらず、その発現誘導に CAR が関与していない可能性も示唆された。また、AhR が制御していると考えられる CYP1 ファミリーの遺伝子(CYP1A1とCYP1A2)についても、同様の傾向が認められた。

次に、化学物質による誘導をかけない状態での CYP の遺伝子発現に及ぼす LPS の影響を調べた。その結果、無処理群を 1 とした時、CYP3A11 は 0.07 ± 0.02 、CYP2C29 は 0.08 ± 0.02 、CYP2C55 は 0.06 ± 0.04 、CYP1A2 は 0.05 ± 0.03 でコントロールに比べ 1/10 以下に発現量が減少していた。しかし、CYP2B10 については逆に 5 倍以上に発現量が増加した。

I 型アレルギーマウスにおける CYP の発現

即時型アレルギーであるアナフィラキシー反応を起こさせたマウスを作製して、PCN による CYP3A11 の発現誘導を調べた。マウスを OVA+FIA で感作して、14 日後に、再度同一抗原である OVA を注射することにより、典型的なアナフィラキシー反応を起こすことができた。この時、血清中の IgE レベルの上昇ならびに血圧降下が起きていることを確認している。

このアレルギーモデルマウスを用いて、PCN による CYP3A11 の発現誘導を調べた。無感作群及び OVA+FIA 感作後 14 日目に PCN を投与し、その 24 時間後に OVA でアナフィラキシーを惹起して 3 時間後に肝臓から RNA を抽出して CYP3A11 量を調べた。その結果、無感作群と感作群で CYP3A11 の誘導に有意な差は認められず、アレルギー状態は薬物代謝酵素の誘導に影響を与えないことがわかった。同様に、薬物による

誘導をかけない定常状態で発現している CYP 遺伝子レベルについて、アナフィラキシーの影響を調べた。その結果、CYP3A11、CYP2C29、CYP2C55、CYP1A2 について若干の変動が認められたが、有意な差は得られなかった。つまり、誘導的な条件においても定常状態においても、アレルギーはほとんどの CYP 遺伝子の発現に影響を与えなかった。しかし、CYP2C10 については、感染症モデルマウスと同様に 5 倍以上の発現増加が認められた。

肝抽出液中の薬物代謝能

mRNA の発現変動が、実際の代謝能を反映しているかどうかを調べるために LPS 投与したマウスの肝臓からマイクロゾーム画分を調整し、テストステロンとニフェジピンの酵素的な変換を調べた。その結果、LPS 投与による両化合物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。

【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

主課題分野:

欧州委員会 (EC)、世界保健機関化学品安全計画 (WHO/IPCS)、経済協力開発機構 (OECD (環境・健康・安全性部門)) などを中心に、報告されている EDC 研究活動の現状をまとめた。

経済協力開発機構 OECD は、従来の枠組みに沿って、哺乳綱 (VMG-mammalian)、

環境生物 (VMG-eco)、非動物試験 (VMG-Non-Animal) の3分野から各種の試験法の開発を進めている。ここでは、本邦をリード国とした試験法、子宮腫大反応法のバリデーションが進んでいる他、ハーシュバーガー法、試験管内試験法、さらには環境生物試験法の開発が進展した。

世界保健機関 WHO では、2002 年のグローバル・アセスメントの出版をもって一区切りをなし、その後の内分泌かく乱化学物質問題の対象をこどもの問題に集約して、その一環として検討を進めている。

米国の内分泌かく乱研究諸組織 の中では、平成 19～20 年度に掛けて、NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) によって、BPA に関する2つの評価、すなわち CERHR (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) による専門家パネル会議と、NIEHS のスポンサーによる研究者グループによるワークショップとがそれぞれ提示された。注目される点は、胎児期や小児発達期の低用量 BPA 曝露の、後年の神経行動へ影響で両者の見解は、一致していたことである。

ウェイブリッジ+10 国際会議 欧州共同体と OECD は協力して、平成 18 年 11 月ヘルシンキで、「ウェイブリッジ+10 国際会議」と称するいわゆるウェイブリッジ会議開催 10 年を記念したワークショップを開催した。新しい 10 年紀にあたって求められている課題について、このワークショップで取り上げられた論点に沿って、中心的な討論を行った。この時取り上げられた論点は、以下の通りで、その後の中心的課題となっている。

1. 胎生期発生成長過程への影響:

不可逆性形態変化と、特異的分別性遺伝子発現についての研究が始められている。とくに特異的分別性遺伝子発現の抽出には、

ストかスティックな発現プロフィールをカバーする電算生物学の支援が必要である。

2. 胎生期発生成長過程曝露の神経行動への影響:

性分化と性行動への影響については、行動指標についての多くの研究エンドポイントが設定準備されつつある。小野班で取り上げられている行動指標については、海外団体への、より効果的な発信が重要になっている。

3. 低用量影響、相加・相殺効果:

背景メカニズム毎の比較研究については、欧州共同体を中心に、相加・相殺効果に関するあたらしい実験データとその報文が徐々に増加している。

4. 発がん蓋然性と促進加齢影響:

ダイオキシンや BPA の長期曝露実験データが報告されている。ダイオキシンは、ADI 設定にも用いられた Kociba のデータで知られるとおり、薬物代謝性のエピジェネティック発がんを惹起するが、他方、これに関与する異物受容体 AhR は、生理的には、抑制遺伝子としての機能をもった、寿命延伸遺伝子であることが見いだされた (Hirabayashi Y, et al. *Organohalogen Compounds*, 69: 357-10, 2997)。他方、BPA については、早発老化とエピジェネティック発がんの亢進が観察されている。

5. ヒト影響の限定性とヒト曝露:

ヒトの曝露環境と環境生物の曝露環境の相違が指摘されている。ヒトに内分泌かく乱が生ずる蓋然性は、指摘されつつあるものの、他方、ヒトが食品や上水由来に摂取する内分泌かく乱化学物質の暴露リスクは、限りなく低く、傷害が発生する可能性も限りなく低いという考え方が有力である。他方、環境生物の曝露リスクは、現実的であり、十分なフォローアップが必要と指摘されている。

6. 内分泌器官の拡張:

免疫系を含む高次生命系(含・核内受容体、ステロイドホルモン系シグナル、etc.)、肝、脂肪織、マクロファージでは、いずれも、性ホルモン受容体や核内受容体の発現が見られ、これに伴って、これらの臓器は、内分泌器官と同様の振る舞いを見せることが明らかになりつつある。肝や脂肪織を内分泌器官として取り扱うことには、疑義が伴うが、骨組織など、事実上、そうした取り扱いを受け入れようとする声も見られる。

7. 内分泌かく乱概念の拡張:

前項の認識に伴って、メタボリック症候群のような病態に対して、内分泌かく乱の影響と受け止める考え方も普及しつつある。内分泌かく乱化学物質の生体作用として、促進加齢の蓋然性を惹起、植物ホルモン影響への警告が出されつつあり、慎重な取り扱いに関する、自助努力が必要である。

8. 症候群としての概念付け:

内分泌かく乱症候群、Weybridge-Helsinki 症候群、etc. などの概念付けが提案されつつある。ヒトで直接影響が証明され得るかに疑念をなしとしないが、内分泌ホルモン受容体や核内受容体、異物受容体などが誘因となった、疾患・症候群としての概念付けが注目されるか。

副次課題分野:

副次課題分野では、継続して低用量問題を取り上げた。

主な論点は以下の通りである。

1. 低用量問題に関する主な論点

1) 新たに見いだされる低用量での生体影響 毒性学における諸試験では、高用量の反応から直線回帰によって、低い用量での反応性を予測するのが一般的である。低用量作用が次第に明らかに成りつつある内

分泌かく乱化学物質の作用曲線について、無作用量以下の低用量域で、外挿表徴型と異なった反応がないかについては、早くから議論があった。そして実際に既存のデータを整理すると、従来、無作用量とか、無毒性量と定めた用量よりさらに低い用量で、さまざまな所見が観察されることが分かってきた。

なぜ内分泌かく乱化学物質が、従来型の用量反応関係をとらず、U字型や逆U字型の反応曲線をとったり、非常に低用量レベルでの特異的反応を示したりするのかについては、当初、そのこと自体に疑念を投げかける声も少なくなかった。しかし様々の交差反応性ネットワークを形成する受容体群やコ・ファクター群での、至適の用量相関変域がしばしば相互にずれていたりすることや、用量の増加とともに受容体反応が飽和に達し不応状態になるといった現象が明らかにされるに伴って、問題点が整理され、そうした反応曲線への理解が急速に進んでいる。

2) 低用量域で観察される確率論的な生体反応 低用量影響には、種々の試験法を適用すると、しばしば実質的な反応データとして認識されず、いわばノイズのような結果が見られることが稀ではない。低用量変化は頻度も低く、平均値をとるとしばしば背景データに隠れてしまうことが稀でないからである。これに対して、似たような現象が、例えばフェノバルビタールによるメチル化の結果から見いだされている。ミシガン州立大学のグッドマン (Jay Goodman) のフェノバルビタールによるメチル化という化学変化の形成確率は、これを平均すると実験群は対照群と差異が認められなかったが、ネズミー匹毎に検出してみると、対照群と違って、個体毎に大きく異なった値が観察された。こうしたフェノバルビタールによるメチル化はエピジェネティックな変化

と呼ばれ、ここで認められた低用量におけるメチル化は確率論的に形成され、純系動物でも個体毎に同じ結果には成らない。エピジェネティック変化としてはクロマチン濃縮、ヒストン修飾、DNAメチル化など様々な修飾が取り上げられるが、内分泌かく乱化学物質における低用量反応を、こうしたエピジェネティックな現象として理解する考え方が急速に進展している。この領域での今後の研究の進展を注視する必要がある。なお、こうしたエピジェネティックな変化がゲノムにインプリントされて、継世代変化として固定されてゆく可能性も現実の問題として論じられている。

3) 低用量レベルでの発がんの蓋然性 2006年11月、米国ノースカロライナ州で、BPAのヒトの健康影響に関するリスクの評価のための、環境影響、試験管内試験、及び動物実験結果相互の関連を検討する専門家会議が開催された。そこでは内分泌かく乱化学物質によってがん(癌)が起こりやすそうな体内環境の形成される可能性について、今後の検討が必要とのまとめになっている。最近、女性ホルモンとダイオキシン類のひとつが、正常のmycという遺伝子と協同して、細胞を無限増殖へ導くテロメラーゼという酵素の活性を引き上げる、という報文も発表されている。試験管内実験であってさらなる検討が必要であるが、こうした変化は、がん化の促進(プロモーション)につながる蓋然性を意味しているとも考えられるので、いずれにしてもこの方面での早急な検証が求められている。

内分泌かく乱化学物質の性質の1つとして、早期に思春期を発生させる可能性、とか、早期の老化を引き起こす可能性などの危惧も指摘されてきた。BPAによる結果では、投与した動物の寿命曲線が、対照に較べて死亡

が早期化し、傾きも急峻になる傾向があることが知られている。その真偽についてはまだ検証を要するが、これが正しいとすると、先に紹介した生殖リスク評価センターCERHRの判断とも乖離する結果となるので、これについても更なる検討が求められる。

2. 低用量問題の経過とその本質の解析

内分泌かく乱化学物質における低用量問題は、1996年12月にロンドン郊外のWeybridgeでこの問題に関する最初の国際会議が開かれた時以来の焦点であった。その時の論理は、低用量問題に限って言えば、R.カーソンの“沈黙の春(Silent Spring)”に啓発されて以後、化学物質の安全性には殊のほか注意を払っていただけに、「安全性生物試験の行われる或る程度の高用量域での障害性を見過ごしていたとは考えにくいこと、従ってもしホルモン様作用による障害があるとするならば、低用量域にEDC物質に特有の作用があるのではないか」というもので、いわば化学物質に対する安全性試験へ責任を持つOECDのプライドも緋い交ぜになったものであったと思われる。もとより受容体との相互作用に由来する内分泌ホルモン様物質の生体作用では、安全性生物試験が行われるような高用量では、受容体はしばしば発現降下を起こして無応答状態に陥る。他方、この作用は受容体とリガンド分子の反応にもとづくから、極めて低用量でも応答反応を起こすことが実験的にも知られている。かくして、すべての生体障害を受容体作用で説明できるとする考え方と、何らの生体分子の構造異常も見いだされないことからして、これらの物質の低用量作用そのものに疑念をいだく考え方との間で、果てしなく擦れ違いの議論が行われた。実験が積み重ねられて、時を経過していった。けだし、2000年10月にノースカ

ロライナ州で米国EPAが低用量問題に関するワークショップを開催し、低用量作用が“ない”とする論文も、“ある”とする論文も、いずれもcredibleであった、という至極賢明な結論を出したにも拘わらず、その意義は今日まで生かされていない。

爾来10余年が過ぎたが多くの内分泌かく乱化学物質で、安全性生物試験では決定的な所見が観察されない。Rochelle Tylらは一昨年2008年になっても、ねばり強く、2世代、3世代などの一連の生殖毒性試験で低用量が何も引き起こさなかったことを報じている。低用量問題とは何だったのかを取りあげる際、この事実を正しく教訓として取りあげる必要がある。

結論として考えられることは、低用量問題は、独立した3つの要素から成る複合問題であったということである。すなわち、第1は、毒性学が高用量作用から危害徴候を推定する方法で成り立ってきたことに由来し、第2は、これが生体の調節機構の障害という毒性学で未開拓の問題であったこと、そして第3に、これがストカスティック(確率論的)な生体反応を対象とした、文字通りの低用量科学としての毒性学の問題であったこと、の3点にもとづいている。注目されるのは第1の課題を含めていずれも、これまで毒性学が従来扱って来なかった対象だったということである。殊に第2、第3の課題は、科学一般の中でここ数年の間に明らかになってきた命題である。低用量問題は、こうした未開拓で未経験の要素にもとづいていたため、なかなか問題の本質に辿り着くことができなかったと考えられる。

1) 高用量から作用を見る毒性学の問題点

用量を増せば“当然”生体影響は強くなる

筈である。その高用量域で確認される生体影響(危害影響 adverse effect=エンドポイント)が、用量を下げ、もはや見られなくなる用量を、無作用量(no adverse effect level)として安全域とする安全性生物試験(=毒性試験)の論理は、これまで何の不思議もなく多くの化学物質に適用されてきた。ところがホルモン物質では、高用量では受容体の発現降下が起こるし、低用量では生体のホメオステシスに打ち消される性質があるから、現象的には、高用量でさえ取るに足らない影響にとどまり、低用量では殆ど“検出”されないことになる。そうした物質に対する生体障害作用が見落とされる結果になっても不思議はない。つまり第1の課題については、後ほど見いだされるようになった持続効果と併せて、ホルモン様作動性の化学物質の反応様式(mode of action)は、まったくの想定外のことであった。だから嘗て女性ホルモン影響の検出のために開発された子宮肥大試験(uterotrophic assay)をスクリーニング系として OECD が取り上げ、本邦がリード・カントリーとしてこれに取り組むことになった際も、これら物質群の作用が検出されたとき、それがどんな生体障害を反映することになるのか否かが大まじめに議論されることとなった。

このことは、毒性学にあたらしい教訓を与えた。もとより毒性学では前述の通り、比較的高用量域に於ける実験的生体反応の用量相関直線を実験データ以下の低用量域へ外挿して無反応域を求め、それら無反応域よりも低い用量での生体影響を無影響と推定してきた。無反応域以下では、障害性は無いと考えるわけである。平易な論理であるが、或る事柄を“無い”と推論し、保証することは、科学の方法論としては大いに稀少な“推定力”を意味する。用量相関の直線性の如何の問題などが前提として介在すると

は云え、この“力”こそが近代毒性学の果たした重大な役割の源泉となる中心命題であった。

内分泌かく乱化学物質で観察された“想定外”の出来事は、まず、化学物質の中に従来型の毒性試験の論理を適用できないものがあること、そしてさらに、ガイドラインで定式化された毒性試験が、(当然の事ながら)決定論的な事象を捉える試験系として確立している、確率論的な事象への“予測力”については疑念があるというものである。言い換えれば後者の命題の意味するところは、毒性試験は、近年、様々に取り上げられているエピジェネティクスに対する“検出力”が限定的だということを示唆している。低用量問題の解明に時間がかかった背景には、こうした毒性試験のスキームに関わる根本問題があったことが作用していた。

2) 生体調節機構の障害というあたらしい毒性学の課題

毒性試験が決定論的な事象を捉える試験系として作られていて、非決定論的で確率論的な事象への“予測力”については疑念があるということを前述した。内分泌かく乱現象が従来の試験法で観察されなかった背景は何だったのか。これについては、従来の試験法が専ら生体内分子の改変や変質などといった物質構造異常に対応するものであった点が指摘される。それは、低用量の曝露影響下で、通常生体の生理的調節水準内であって、眼に見えない形で微視的かつエピジェネティックに機能不全へと進行し、遂には不可逆的調節異常に陥る“生体の調節異常”を検出することの不得意な、これまで想定されてこなかったものである。生体内には、大小様々な規模のこうした調節不全状態がいろいろな形で発生している。実験的な

例としては、ラットの胎生期における低用量の BPA の投与が引き起こす母性機能変化が知られ、また思春期の早発傾向につながると考えられる膣開口の早期化なども観察されている。比較的高用量の BPA の出生直後のラットへの投与は、時を経て成熟後の雌のラットに持続性の無排卵も引き起こしている。これらは遅延性無排卵機構として注目される、調節機構における障害のわかりやすい例であるが、このようなエストロゲン系とプロジェステロン系の 2 相制御下にある調節機構の異常現象は、その振れはホメオステシスの背景に隠れてしまい、さらに大きな振幅に達するか、対応した方法や機器を用いない限りなかなか異常として把握されない。例えばいま水平に持ち上げて静止させた腕の筋肉が、上方に持ち上げる筋肉群と下方に押し下げる筋肉群の平行バランスによってはじめて水平に維持されると云うことは、それら各々の筋群が活発な拮抗関係を維持していることを筋電図で確かめることによってはじめて把握されることとのアナロジーである。これがパーキンソン症候群に至ると、事態は絶えず振幅を持続し静止位を保てなくなる。しかしこの状態と云えども、この腕が静止位の維持に堪えきれずに落下しない限り、“情報値の平均”をとると対照群との間に有意差が認められないということも起こってくる。通常の試験系では、こうした揺れ動くデータ(調節不全)を把握することが想定されていない。これが生体の調節異常を一般試験系がしばしば検出しないという現象の比喩的な背景である。実際には生体内には、レドックス制御、血圧調節、あるいは薬物代謝における拮抗調節関係などこうした調節機構に該当する生理機構が無数にある。内分泌かく乱化学物質の安全性生物試験にも、こうした“調節異常の毒性”を解説するシステムズトキシコロジー (systems

toxicology) の開発が必要だったのだということに気付かされる。低用量問題が“検出”できなかった背景は、こうした事柄も関連していたと考えられる。

3) ストカスティックな生体反応を対象とした毒性学の問題

毒性試験による予測が決定論的予測に限定され、エピジェネティクスの“検出”に対して限定的ないし想定外であったことを前述した。これはストカスティック(確率論的)な生体反応を背景としており、それ自体は低用量で観察されやすいが、実は必ずしも低用量に限定された問題ではない。例えばいま 100 匹のマウスがいて、ある発がん物質で、20 匹に軟部組織腫瘍、20 匹に造血器腫瘍、さらに 20 匹に肺腫瘍、20 匹に腎硬化症と関連する加齢病変が発生するものとしよう。こうした実験は近交系の動物を用いることにより、極めて再現性良く追試することができるが、どのマウスに何が発症し、あるいは造血器腫瘍を発症するのはどのネズミとどのネズミかを 1~2 ヶ月程度で予測することは通常の試験では容易でない。こうした確率論的事象はマクロ的には決定論的であって、決して不確実性ではなく、まして理論問題として不可知ではなかった筈のものである。つまり、理論上はある事象の不可逆点 (point of no return) の前に予測可能な筈だったものであるが、これまで科学がその方法を持たなかったことに疑問を持つことはなく、看過されてきた。しかし、いまやマイクロアレイなどの遺伝子発現解析手法の適切な応用によって、様々な事象に対する生物反応の予測遺伝子発現クラスターの形成が観察される見通しは、将来の毒性予測の焦点となっているホットなトピックである。

つぎに実験群の母数を減らしてゆくと、イベ

ントはさらに確率論的になってくるから、通常の試験では、結果の予測はいよいよつかなくなる。こうした確率論的なデータに対してこれまでの毒性学が、意味のあるデータと考える確たる根拠を見いだし得ず、しばしばそれらを棄却してきたことは、科学の発展段階の制約としてやむを得ないものがあったと考えるべきであるが、結果的には、低用量問題の進展を阻む結果となった。これが、低用量問題が把握できなかった3つ目の要因であった。

4) 低用量問題を解決するあたらしい毒性学の確立

低用量影響が認識されなかった背景は、上述のような3つの要素に起因していたと考えられるが、これに対して向後どのような研究的措置を講ずれば、実態を把握することができるであろうか。そのためには3つの要因に即した対応が求められる。いま第1の要因について考えるならば、対応するひとつの方策はといえば、ホメオステシスの陰に隠れて見えなくなる低用量変化を顕在化することが求められるわけであるから、例えばそれはまさに子宮肥大試験はその1つの有効な方法であることがわかる。反対にそうしたあたらしい試験系の構築無しに見ることは恐らくできないのであって、既存のデータを一寸見直すことによって、これまで無視してきたものが見えてくるといった性質のものではない。

問題点としては、子宮肥大試験で検出されることをもって危害リスクを想定しようとした場合、エンドポイントが不明確であることである。第1の要因への対応に限局して何等かのエンドポイントを設定するためには、頻度は低くとも、先に挙げた“早期膣開口”などの表徴表現型や、惹いてはそれに対応する種々の発がん徴候を観察可能なだけの規模の実験

群動物数で観察することが求められることになる。こうした表現型はこれまで想定されていなかったから、観察期間の点からも用いた動物匹数の面からも検出することができなかったわけだが、頻度は低くとも、一定の確率で危害リスクが出現することは確かのようなのである。因みに BPA には、内分泌かく乱性とは目的の異なった一群 100 匹を超える実験規模の発がん性試験の報告がある。この報告のデータを用いて生涯観察期間の発がん性を再計算すると、統計的に有意な寿命の短縮は明らかであった。多くの化学物質でこうした実験を行うことは現実的でないので、実際的に推奨されるわけではないが、理論問題としては、そうした背景に繋がっているということに他ならない。

第2の生体調節機構の障害の面から見た場合には、どんな対応が考えられるであろうか。化学物質はいま8万種類とも10万種類ともいう多くの種類が用いられている。これらすべての化学物質の毒性プロファイルを明らかにすることは容易ではなく、限りなく不可能に近いと思われる。他方、代表的な毒性物質で動物試験を行って、実験動物の側の遺伝子発現を網羅的に把握し、毒性プロファイルを抽出し、データベースを構築することは、不可能ではない。毒性プロファイルは何万もあるのではなく、数千のオーダーのものと考えられ、これとの照合によって、毒性シグナルを発する化学物質スクリーニングし、毒性シグナル発現の蓋然性のあるものに限って安全性生物試験を施行しようとする試みもある。米国ではいまそうした毒性シグナルの抽出のための昼夜を分かたぬ大規模なロボティックなアレイ試験が進行中である。これらが抽出されるまでには20~30年の年月が掛かると思われる。しかしそこで内分泌かく乱化学物質のシグナルがどのような扱いになるかを待

つまでもなく、前述の第1のエンドポイントに対応する毒性プロファイルの抽出を終了するまでにはそれほど時間を要することはないであろう。

第3のストカスティックな生体反応について考えよう。第2の毒性シグナルの抽出の際に問題となるのは、第3の要因、頻度の低い確率論的シグナルの捕捉の問題である。これまで毒性学は、エピジェネティクスを背景とする生体障害や、生物自身や生体反応の多様性に立脚した確率論的現象に対して、正面から対応してこなかったといつてよい。当然のことながら、科学も、その応用学としての毒性学も、決定論的な対象を中心に、機械的な再現性の確かめられる範囲の実験科学にもとづいて構築されてきたのである。再現性が確認できる、ということは、科学的であるか否かの試金石となる代名詞でさえある。ところが、科学の世界には、再現性は、確率論的にしか確認できないストカスティックな現象があることが次第に解ってきた。これに対応した“シグナルの固定化”は、概念的には、ストカスティックシグナルの決定論化(deterministification)とでも云うべきコンピューショナル(computational)な情報加工作業である。一般に大容量のデータを蓄積することにより、十分に大きな確率論的なデータでは亜群集塊化(clusterization)をさせることができるものと信じられている。この亜群集塊化によって確率論的で非決定論的な膨大なデータの決定論化が可能になると、これまで蓋然性としてしか捉えることのできなかった、多くの事象が確率論的な予測の範囲に入ってくる。これは、医療や保健分野で現実的に期待されていることであるが、毒性分野での利用も夢でなくなるものと予想される。

●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

1、OECDにおける取組

OECDでは、内分泌かく乱物質について科学的知見の収集、人の健康や生態系への影響を評価するための試験法の評価・テストガイドラインの作成等ため、OECD テストガイドラインに関する検討を行う専門家会合である WNT (Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme)の下に内分泌かく乱化学物質のための作業部会(EDTA:Task Force on Endocrine Disruptors Testing and Assessment)を設置し、各加盟国から提案された評価手法に関する国際的な検討を進めている。EDTA では、化学物質の内分泌かく乱性については非常に多くの既存化学物質についても再評価する必要があることから、動物を用いた確定試験だけでなく、動物を使用しない比較的安価な高速スクリーニング試験を含む5レベルからなるコンセプチュアルフレームワークを提案し、各レベルに示された個別の試験法開発のため各国専門家から構成される3つの試験法検証グループ(VMG-NA、VMG-mammalian、VMG-eco)を設置して検証やガイドライン化を進めている。

本研究では、平成20年度、21年度に開催されたVMG-NA会議及びこれに併せて開催されたED-QSARワーキンググループ会議に参加して、各種スクリーニング手法の開発における国際動向の調査を行った。VMG-NAでは、コンセプチュアルフレームワークのレベル2に分類される動物を使わない試験法について検証及びガイドライン化を行っており、平成21年度には、それまで我が国

で開発された HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 (ER α) 転写活性化試験系による ER α アゴニスト試験法が、我が国における検証試験結果をもとに正式にガイドライン化 (OECD TG455)された。これに続き現在、我が国が中心となって進めている HeLa9903 細胞による転写活性化試験系 (STTA 法)を用いた ER α アンタゴニスト試験法、ICCVAM (米国代替法検証センター)が中心となって検証を進めている LumiCell による ER α アゴニスト・アンタゴニスト試験法、米国 EPA が中心となって検証が進められている ER α 結合試験、H295R 細胞を使ったステロイド産生試験法のバリデーション経が進められている。

VMG-NA では、STTA 法のガイドライン化に関連してパフォーマンスベースドテストガイドライン (PBTG) について議論が進められている。すなわち現在、検証が進んでいる Lumicell 法が、STTA 法と同等のいわゆる *me too* アッセイであることからパフォーマンス基準を定めた共通ガイドラインを作成しようというものである。また試験に使用する細胞の分譲に関する MTA (Material Transfer Agreement) に関して、OECD ガイドラインで用いる生物資源譲渡に際しての MTA では商業利用が許可されるべきだとの意見が出されており、これについても ATCC のケースなども参考として議論が重ねられている。今後、新たにガイドライン化の提案を行う試験法においては、こうした問題も考慮する必要がある。

ED スクリーニングのための QSAR 手法に関しては、VMG-NA のサブグループで主に情報交換を目的とした議論を進めてきたが、その OECD QSAR Toolbox 第 2 期開発において、EPA で開発された内分泌かく乱メカニズムの評価のため ER 結合予測エキスパートモデルが組み込まれる予定となった。我が国

では 3D ドッキングモデルによる *in silico* 予測法の開発を進めているが、EPA のモデルは適用範囲を非常に限られた化合物構造のみに限定しているのに対して、ドッキングモデルは適用可能な構造範囲が非常に広く、手法の組み合わせによる精度向上が期待される。

in vivo 試験法について検討を行っている VMG-mammalian においては、これまでに子宮増殖アッセイ (TG 440)、ハーシュバーガーアッセイ (TG 441) がガイドライン化され、また 28 日間反復投与試験 (TG 407) の改定が行われており、我が国は、これらの試験法開発においても多大な貢献をしてきている。

2、米国における取組

米国 EPA では化学物質の内分泌かく乱性のスクリーニング評価のための試験法が整備されたとして、EDSP (内分泌かく乱スクリーニングプログラム) を正式にスタートした。EDSP では、EPA でリストアップした内分泌かく乱性について評価を行うべき 67 化合物について、その製造・販売業者に対して 2 段階からなる評価のうち 1 段階目に示されるスクリーニング試験データの提出が求められている。他方、米国 FDA では、内分泌かく乱性が懸念される化合物の一つである BPA について、一度はヒト健康に対して直ちに問題があるという科学的根拠はないとしたものの、特に幼児期における高感受性集団に対する健康影響の可能性があると代替化合物への変更を含む対応を求めるとともに、詳細な再評価のための研究を開始した。

3、日本における取組

厚生労働省では、内分泌かく乱性化学物質によるヒト健康影響に関する問題に対応するため内分泌かく乱化学物質の健康影響