

Fig. 3 DexamethasoneによるLIF作用の増強

マウス胎生14日胎児終脳由来神経上皮細胞に対し、DEX ( $3.2 \times 10^{-9} M$ ), LIF ( $1.25 \text{ ng/mL}$ )を加え、24時間培養後、GFAP mRNAを定量RT-PCRで測定した

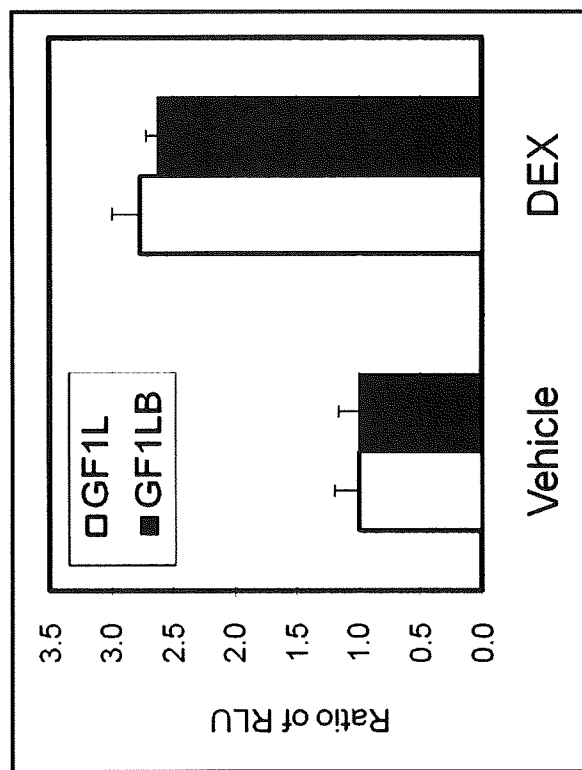
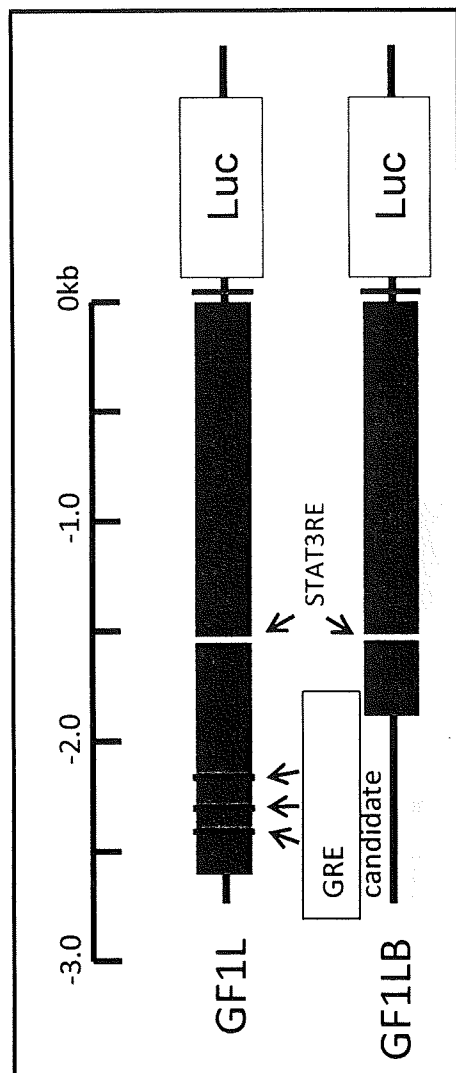


Fig. 4 DexamethasoneによるGFAP誘導に関わるプロモーター領域の検討

GFAPの転写開始点上流2.8kbを配列解析し、GREの候補を3ヶ所見出した。それらを欠失するレポーターを作製し、dexamethasoneによる活性化を検討したが、GRE候補を欠失させても誘導程度に変化は無かった。

核内受容体作動性化学物質の中樞影響に関する研究

研究分担者 粟生修司 九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授

研究要旨

核内受容体作動性化学物質のヒト中樞影響評価に利用できるマウス、ラット、サルを用いた神経行動学的評価法の確立を目的とした。核内受容体作動性化学物質やその関連物質を発達期に曝露し、その影響を神経行動学的にラットおよびマウスで比較検討した。サルでも評価系の構築を図った。核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、群れ行動に対して影響を及ぼすが、ラットでヒトとほぼ類似の影響を検出できた。サルにおける胎生期曝露の実験は長期の実験が必要となるが、幼弱ザルと成熟ザルを比較することで代替評価できる可能性があり、鼻腔投与による性認知、性志向性、性行動および社会行動評価系を確立した。

A. 研究目的

核内受容体作動性化学物質のヒト中樞影響評価に利用できるマウス、ラット、サルを用いた神経行動学的評価法の確立を目的とした。ビスフェノールA (BPA)を中心に発達期曝露の各種行動や体重に及ぼす影響をラットおよびマウスで比較検討した。社会行動の評価では、BPA および 1-ブromoプロパン(1-BP)の群れ行動の影響を調べた。サルでは評価系の構築のため、ポジティブコントロールとさいてテストステロンを用い、さらに生殖系とエネルギー代謝系に作用する核内受容体作動性化学物質候補物質である 2-buten-4-olideの性行動、性認知行動、社会行動に及ぼす影響を調べた。

B. 研究方法

核内受容体作動性化学物質を発達期に

曝露し、その影響を神経行動学的にラットおよびマウスで比較検討した。すなわち行動評価においては、活動性や探索行動の評価にオープンフィールド試験、不安情動の評価に高架十字迷路試験、回避学習の評価に受動的回避学習試験、うつ反応の評価に強制水泳試験、攻撃行動や警戒反応の評価に侵入者試験を用いた。さらに4匹のラットをオープンフィールドに置き、群れ行動を評価した。サルではモンキーチェア上に被験ザルを置き、雄ザルまたは雌ザルに対するレバー押し行動を評価した。またサルの視覚的性嗜好性や性弁別機能をレバー押し行動で評価した。曝露手段としては、BPAを飲料水に混ぜて母ラットあるいは母マウスに投与した。1-BPは母ラットを曝露チェーンに1日6時間置き、20日間700ppmの濃度で曝露した。サルではポジティブ

コントロールとしてテストステロンを鼻腔内投与し、2-buten-4-olide は筋注で投与した。

実験はすべて「九州工業大学大学院生命体工学研究科における動物実験に関する指針」に基づいて行った。

### C. 研究結果

環境中に存在する核内受容体作動性化学物質はオープンフィールド行動や情動行動、体重に対して、ラットでヒトと類似の非生殖行動の性分化障害、うつ・不安の増大、雄の多動、雄の体重増加と雌の体重減少を引き起こした。マウスではヒトと類似の影響として思春期の一過性の攻撃性の増大と成熟後の攻撃性の低下が雄マウス認められた。

ラットの群れ行動に対して BPA はこれまでのところ明確な影響が認められないが、1-BP は雌雄とも個体間距離を有意に増加させた。また同腹・同ケージ同士の群れにすると雄への影響が増強され、雌への影響は減弱した。また、1-BP は個別状態では雌の活動性を抑制するが、群れ状態にすると雄の活動性を上昇させた。

テストステロンを雌ザルに鼻腔内投与すると、性的活動性を示す雄ザルに対して、雌ザルのレバー押し行動が高進し、性行動も促進した。性的活動性を示さない雄ザルに対しては、影響出現が遅延し、雌ザルに対しては、闘争行動が増加した。

2-B40 はマウスのマウンティング回数を減少させ、射精までの潜時を短縮させるが、サルにおいては性弁別の正答率が向上した。食物弁別の正答率は変化しなかった。サルのマスターバージョンに対

しても影響しなかった。

### D. 考察

核内受容体作動化学物質のヒトへの中枢影響として可能性があるのは、1) 行動の中性化、2) 不安・うつの増強、3) 学習・記憶障害、4) 薬物依存やその他の嗜癖行動、5) 自閉症・コミュニケーション障害などの社会機能異常、6) 母性行動異常、7) 性同一性障害・性志向性異常を含む生殖障害、8) 肥満および摂食障害であり、これらはすべて会問題化している。

これまでの研究で、ラットは上記のヒトへの影響ときわめてよく似た影響を受けることが明らかになった。核内受容体作動性化学物質の標的はエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、PPA 受容体、レチノイド受容体などが示唆されているが、核内受容体から細胞、組織、器官、個体、集団（社会）の各レベルで複数の標的がネットワーク化されて、影響を及ぼしあっている。各レベルで複雑な応答ネットワークをもっているにもかかわらず、共通の発現系を有しているのも事実で、さまざまな物質が異なる標的を介して類似の影響を示している。

ヒトへの中枢影響のメカニズムを解明する上で、サルはきわめて重要な位置を占めているが、実験的な解析はまだ不十分である。高等動物になるほど核内受容体に依存する神経の可塑性は発達の後期にずれ込んでいることから、思春期前の幼弱サルは核内受容体に高い感受性を有している可能性があり、実験期間の短縮

をもたらす可能性がある。今年度の研究で鼻腔投与が中枢影響を見る上で有用であることがわかり、レバー押し行動を用いることで定量的な評価が可能であることも示唆された。ナショナルリソースプログラムで幼弱サルへの供給が確立されつつあるので、今後有用な実験的アプローチが期待される。

#### E. 結論

核内受容体作動化学物質の発達期曝露は耐用 1 日摂取量以下の濃度でも中枢神経系に作用し、ヒトで示唆されている中枢影響と類似の影響を起こすことが主としてラットで明らかになった。また群れ行動も影響を受けることが明らかになった。サルを用いた評価は困難な点が多いが、鼻腔投与方法とレバー押し行動を利用することが学習機能や、性志向性、性行動および社会行動を評価できることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. ©Masuda A, Aou S. (2009) Social transmission of avoidance behavior under situational change in learned and unlearned rats. *PLoS One*. 2009 Aug 27;4(8):e6794
2. Oomura Y, Aou S, Fukunaga K. (2009) Prandial increase of leptin in the brain activates spatial learning and memory. *Pathophysiology*. 2009 Jul 14. [Epub ahead of print]
3. Tsuruoka T, Fujimoto T, Shiota N, Monda M, Fueta Y, Ishidao T, Hori H, Aou S. Positive and negative effects of environmental chemicals

on brain functions in rodents. *BrainIT IV 2010 in press*

4. ©Masuda A, Narikiyo, K, Shiota, N, Aou S. Acquisition and extinction of avoidance response by social interaction in rat. *Brain-Inspired IT*. Springer 2010 in press
5. Inoue T, Lukats B, Fujimoto T, Moritake K, Karadi Z, Aou S. Category recognition in the monkey orbitofrontal cortex. *Brain-Inspired IT*. Springer 2010 in press
6. Sonoo S, Aou S, Horio K, Tamukoh H, Koga T, Shimo N, Yamakawa T, Emotional behavior and expression based on a neural network model of amygdala, *Brain-Inspired IT*. Springer 2010 in press
7. 栗生修司 (2009) 環境ホルモンと脳の性差. *Clinical Neuroscience* 27, 1128-1129

##### 2. 学会発表

1. Oomura Y, Aou S, Fukunaga K, Sasaki K (2009) Orexin impairs spatial learning and memory. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1
2. Masuda A, Aou S (2009) Social learning for avoiding behavior in rats. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1
3. Aou S, Monda M, Kanemaru A, Fujimoto T, Kubo K (2009) Chemical impacts on neurobehavioral developments: time-, sex- and species dependency. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1
4. Fujimoto T, Kubo K, Aou S, Nishikawa Y (2009) Low dose bisphenol A: a potential factor of psychological illness. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto Jul27-Aug 1
5. Aou S, Kanemaru A, Monda M, Narikiyo K, Fujimoto T (2009) Species-, Sex- and time-dependent neurobehavioral effects of bisphenol A. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16-18
6. Masuda A, Aou S (2009) Behavioral effect of excitotoxic lesion of

medial frontal cortex on social transmission of avoidance in rats. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16-18

7. Narikiyo K, Shiota N, Aou S (2009) Dopaminergic activities of the nucleus accumbens in limited-access-induced fat overeating in rats. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16-18
8. 金丸愛、門田誠、増田明、成清公弥、  
笛田由紀子、石田尾徹、保利一、粟  
生修司 (2009) 1-プロモプロパンの  
胎生期曝露はラットの集団時の行動  
を修飾する 環境ホルモン学会

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他 (データベース等)

なし

研究課題名=[マイクロアレイ基盤整備]

遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立

研究分担者 五十嵐 勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。実際には、各班員との協議の下、共同研究を行い検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析結果を班員にフィードバックする。

今年度実施中の共同研究は、井口班員との DES 新生児期暴露腫の DNA メチル化変化の網羅的解析、加藤班員との肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析、DNA 脱メチル化酵素 MBD4 の標的遺伝子の解析、骨芽細胞特異的 ERalphaK0 の骨組織網羅的遺伝子発現解析、である。

A. 研究目的

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。

すなわち、核内受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・発達段階により多種多様であると考えられる。例えば、核内受容体活性化物質の *in vivo* 試験として従来から行われている子宮肥大試験や Hershberger 試験における比較的単純な endpoint でさえ、幾重か

の反応カスケードの結果であると考えられる。このカスケードの解析は容易ではないが、進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方が得られることが示されている。そこで本研究では、DNA マイクロアレイ技術を当班で活用可能とし、各班員が実施中の研究を網羅的遺伝子発現解析の側面からサポートする体制を整える。

B. 研究方法

各班員との協議の下、共同研究を行い、検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析結果を班員にフィードバックする。

すなわち、

### 各班員からの検体からの RNA 分離精製

生体組織を採取後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、臓器の場合は厚さが 5mm 以下となるように細切する。その後、RNA 抽出操作までは $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存する。抽出に当たっては、RNAlater を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製し、破碎液の 10 $\mu\text{L}$  を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。DNA 含量に応じ、Spike cocktail (Bacillus 由来の RNA 5 種類を濃度を変えてあらかじめ混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出する。一部を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。以上のステップのうち、生体組織分離と RNA later への浸漬までを共同研究先の班員が実施し、その後のステップを当方で実施する。

### Genechip 解析

全 RNA 5  $\mu\text{g}$  を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。ハイブリダイゼーションは  $45^{\circ}\text{C}$  にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャン

してデータを得る。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析する。

### ChIP on Chip 解析

班員がクロマチン免疫沈降 (ChIP: Chromatin Immunoprecipitation) により得た DNA サンプルを必要量まで増幅し、3'末端にビオチンラベルを入れ、Affymetrix promoter 1.0R array にハイブリし、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得る。データは Genomatix 社の ChipInspector 及び Genomatix suite を利用して解析する。

### C. 研究結果

本年度は、井口班員との DES 新生児期暴露腫の DNA メチル化変化の網羅的解析、加藤班員との肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析、DNA 脱メチル化酵素 MBD4 の標的遺伝子の解析、骨芽細胞特異的 ERalphaK0 の骨組織網羅的遺伝子発現解析を実施中である。

すなわち、

### DES 新生児期暴露腫の DNA メチル化変化の網羅的解析 (井口班員)

出生直後のマウスへの DES 投与により、不可逆的な腫上皮の角質化・腫瘍化が誘起される現象と DNA メチル化変化の関係について、網羅的手法により解析している。メチル化 DNA 断片をメチル化シトシンに対する抗体で沈降し、遺伝子のプロモ



ーター領域に対するプローブを配した DNA マイクロアレイにて網羅的検索を行った。実験群は、以下の3群とした。

Control : 8週齢で卵巣を摘出し、10週目から5日間、ごま油を投与し翌日サンプリング。

NeoDES : 新生児0日目から4日目までDESを1.5 mg/kg BW 投与、8週で卵巣を摘出し、10週でサンプリング。

Adult DES : 8週齢で卵巣を摘出し、10週目から5日間、DESを1.5 mg/kg BW 投与し、翌日にサンプリング。

その結果、NeoDES、AdultDESに特有の変化が捉えられており、現在井口先生、渡邊先生と詳細な解析を行っている。

#### 肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関するChIP on Chip解析 (加藤班員)

ファルネソイドX受容体(FXR)複合体精製によりFXR新規転写共役因子として加藤先生の研究室で同定された、PHF2/ARID5B複合体の肝臓に於ける標的遺伝子を網羅的に解析するために、ChIP on Chipによる検討を行った。PHF2/ARID5B複合体形成はグルカゴン依存的であり、グルカゴン依存的なFXR転写活性に対するコアクチベーターとして機能すること、グルカゴン依存的にヒストンH3K9の脱メチル化を促進し、FXR標的遺伝子の発現を誘導すること、PHF2の発現量は一定であるものの、グルカゴン下流のPKAによってリン酸化され、複合体形成とプロモーター結合が促進されること、さらに肝臓においても、PHF2は絶食依存的にFXR標的遺伝子のSHP(胆汁酸代謝)、PEPCK(糖

新生)のプロモーターにリクルートされることが、加藤研究室により明らかにされている。

ChIP on chip解析実施にあたっては、PHF2がゲノムワイドでグルカゴン(または絶食)依存的に代謝関連遺伝子上に落ちてくることを示すこと、を目標とした。

絶食、摂食条件のマウス肝臓からPHF2抗体でChIPしたDNAサンプルを受け取り、PCR法を用いたアフィニティソート公開プロトコールに従い、Promoter arrayにハイブリするために必要な量まで増幅したところ問題なく増幅されたので、PHF2結合が確認されているSHPプロモーター領域に対するPCRによって、増幅に偏りが生じていないか検討したところ、同じサンプルでも増幅実験のロットによって偏りが生じることが明らかになった。そこで、同一サンプルについて複数の増幅反応を行い、増幅後に偏りの有無を検討し、問題の無いものを選び、Promoter arrayにハイブリし、生データを得た。得られたデータをGenomatix社のChipInspector及びGenomatix suiteにより解析した結果、PHF2が絶食条件依存的に代謝遺伝子群のプロモーターにリクルートされること、そのプロモーターにはFXR結合配列が認められることなど、ゲノムワイドにFXR/PHF2/ARID5B複合体が代謝関連遺伝子プロモーターにリクルートされることを示すデータが得られた。

#### DNA脱メチル化酵素MBD4の標的遺伝子の解析(加藤班員)

加藤先生の研究室において、ビタミンD受容体を含む核内蛋白複合体を精製した結果、DNAメチル化酵素が含まれていることが分かった。ビタミン

ンDによるCYP27B1プロモーター制御をDNAメチル化について調べたところ、ビタミンDによりメチル化が促進され、PTHにより脱メチル化が促進されることが分かった。さらに、蛋白複合体内に含まれていたMBD4がDNA脱メチル化酵素であることが明らかになった (Nature, 2009;461(7266):1007-12)。

そこで、MBD4ノックアウトマウスを用い、網羅的発現解析によりMBD4のCYP27B1以外の標的遺伝子を同定することを目的とした共同研究を行っている。野生型、MBD4KOマウスにビタミンDもしくはPTH(ビタミンD処理後)処理し、腎臓の遺伝子発現を網羅的に解析した。

その結果、ビタミンDによるCYP27B1の発現低下は確認されたものの、PTHによる野生型マウスでのCYP27B1発現回復は認められなかった。そのため、ビタミンDによる発現変化のみに着目したデータ解析を先行させ、PTHによる回復のデータを再取得する方針で進めている。

#### 骨芽細胞特異的ER $\alpha$ KOの骨組織網羅的遺伝子発現解析 (加藤班員)

加藤先生の研究室で、破骨細胞でのER $\alpha$  KOは雌特異的に骨量減少が認められるが (Cell, 2007;130:811-23) が、骨芽細胞でER $\alpha$  をノックアウトすると、雄特異的に骨量減少が認められることが分かった。この現象について網羅的遺伝子発現解析を実施したいとの依頼を頂き、共同研究を開始した。現在、サンプル到着を待っている段階で、今年度中にはっきりした結果が得られるよう進めていく予定である。

#### D. 考察

井口班員との共同研究において、DES投与により予想以上にDNAメチル化の変化が誘発されていることが示唆された。これはこれまでに別途進めてきたDNAメチル化変化の網羅的解析ではほとんど変化が検出されないことと比べると、驚くべき結果である。今後は、DESにより引き起こされる不可逆的变化と関連するDNAメチル化変化を同定することが重要と考えられる。加藤班員との共同研究においては、FXR-PHF2複合体のリクルート、VDR-MBD4の機能についての解析が進み、核内受容体を起点に生じるエピジェネティック変化のメカニズム解明にの手がかりが得られてきている。

ChIP on Chip解析は網羅的遺伝子発現解析を補助する解析ツールとして重要である。特定の転写因子のゲノムDNAへの結合やヒストン修飾状況、DNAメチル化状態の解析に用いることが出来、化学物質の生体影響メカニズム解析に有力な情報をもたらす手法であり、今後も活用されていくことが望まれる。

#### E. 結論

本研究は、網羅的ゲノム解析手法を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を得ることを狙いとして実施しており、有用な成果が得られている。

すなわち、網羅的ゲノム解析手法は、発現解析として数万の遺伝子の発現を迅速に検討することに加え、クロマチン免疫沈降と組み合わせることで転写因子やヒストン修飾、DNAメチル化などのクロマチン制御メカニズムを網羅的に解析す

ることを可能とする有効な技術である。本研究で示されてきたようにこの技術は、既知の情報から推測することが困難な新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に今後も有力な手法となる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hypersensitivity of AhR-deficient mice to LPS-induced septic shock. Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. Mol Cell Biol. 2009 Dec;29(24):6391-400. [Epub 2009 Oct 12.]

Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. J Toxicol Sci. 2009;34 Suppl 2:SP279-86.

### 2. 学会発表

脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析 -幼若期雄マウスへのトリアゾラム投与による学習記憶障害について-  
種村 健太郎, 松上 稔子, 五十嵐 勝秀, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純  
日本トキシコロジー学会学術年会, Vol. 36 pp. 1303-, 2009年, 岩手

ビスフェノールA経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定  
荒瀬栄樹、石井健一郎、五十嵐勝秀、相崎健一、小倉友二、今村哲也、吉尾裕子、有馬公伸、菅野純、杉村芳樹

第 97 回日本泌尿器科学会総会, 巻:100 号:2  
頁:160, 2009年, 岡山

### 3. 知的所有権の取得状況

#### A. 特許取得

なし

#### B. 実用新案登録

なし

#### C. その他

なし

資 料

[講演抄録：特別講演]

男性性機能障害と環境化学物質

緒方 勤

国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部 部長

近年、日本を含む複数の国々において、精子形成障害、尿道下裂、停留精巣など、男性性機能障害に関連する疾患の増加が報告され、環境化学物質（内分泌攪乱化学物質）の影響が危惧されている。特に、多くの環境化学物質がエストロゲン受容体を介してエストロゲン様効果を発揮しうると推測されること、そして、エストロゲン様作用を有する化学物質への暴露が雄性生殖器異常を生じることから、エストロゲン様内分泌攪乱化学物質が男性性機能障害の増加と密接に関連している可能性がある。ここで、内分泌攪乱化学物質の作用が、その暴露量や暴露時期の他に、個体の遺伝的感受性にも支配されると考えられることから、われわれは、エストロゲン受容体 $\alpha$ 型をコードする ESR1 遺伝子とエストロゲン受容体 $\beta$ 型をコードする ESR2 遺伝子のハプロタイプ解析による感受性因子の同定を試みている。その結果、体細胞（ホルモン産生細胞）で発現している ESR1 遺伝子の特定ハプロタイプが尿道下裂にたいしてオッズ比 13.75、停留精巣にたいしてオッズ比 7.55 という顕著な感受性作用を有することを見いだした。さらに、この特定ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す約 2 kb の微小欠失を同定し、現在、そのノックインマウス作製に成功し、解析を行っている。一方、生殖細胞（精子）で発現している ESR2 遺伝子の特定ハプロタイプが精子形成障害の感受性として作用するというデータも得られている。本講演では、主にこの感受性因子について話したい。

## 低用量問題とストカスティックな生体反応

The low-dose issue and stochastic xenobiotic responses.

井上 達

国立医薬品食品衛生研究所

### 和文要旨

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。すなわち、第1は、毒性学が危害徴候を高用量作用から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、そ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点に基づいている。いずれも未経験の新しい事柄であったため解明に時間を要したが、いまその本態が明らかになるうとしている。

(keywords: 決定論的生体反応、調節機構障害の毒性学、毒性遺伝子シグナル、電算毒性学、システムズトキシコロジー)

### はじめに

内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン;以下「EDC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で最初の国際会議<sup>1</sup>が開かれて以来の焦点である。その発端は、R.カーソンの“沈黙の春<sup>2</sup>”に啓発されて、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、「安全性生物試験が実施され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難いこと、だから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、化学物質に対する毒性試験へ責任を持つOECDのプライドがいわば緋い交ぜになったものであった。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、従来型の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、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基づくから、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と、何らの生体分子の構造異常も起こさないことからして、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との間で、擦れ違いの議論がはじまった。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<sup>3</sup>、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、その意義は生かされなかった。

爾来 10 余年が過ぎた。多くの EDC 物質で、従来型の試験では決定的な所見は観察されない。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<sup>4,5</sup>。かくして低用量問題への疑念が再燃する。

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。その第 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樹立されてきたことに由来し、第 2 に、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、そ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 点に基づいている。注目されるのは第 1 の課題を含めていずれも、毒性学がこれまで扱って来なかった対象だったことである。殊に第 2、第 3 の課題は、科学一般でここ数年の間に明らかになってきたあたらしい命題である。低用量問題は、こうした未開拓で未経験の要素に基づいていたため、なかなか問題の本質に辿り着くことができなかった。

## 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はずである。その高用量域で確認される生体影響が、用量を下げてははや見られなくなる用量を、無作用量として安全域とする従来型の試験 (= 毒性試験) の論理は、多くの化学物質に適用されてきた<sup>6</sup>。ところがホルモン様物質では、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、後程確認される遷延効果と併せて、ホルモン様作動性の化学物質の反応様式(mode of action)とその障害性は、毒性学にとって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で用いられた子宮肥大試験<sup>7</sup>を OECD がスクリーニング系として取り上げ、本邦がリード・カントリーとしてこれに取り組んだ際も、検出されたこれら物質群の作用に対して、それがどんなエンドポイントを反映するのかの論理付けに困った。

このことは毒性学に教訓を与えた。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作用量を求め、それよりも低い用量での生体影響を無影響と推

定する。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、安全性を保証するという事は、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、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。

EDC 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構築されていて、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疑念の意味するところは、毒性試験は、いま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”が限定的だというものである。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枠組みに関わる根本問題があった。

## 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構築されていて、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。化学物質の ED 現象が従来 of 試験法で観察されなかった背景は、それが専ら生体内分子の改変や変質などといった構造異常に対応するものであった点が指摘される。EDC 作用は、低用量の曝露影響下で、通常の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”である。こうした生体作用は、従来 of 試験系が検出することの不得意な、これまで想定していなかったものである<sup>6</sup>。生体内では、こうした調節不全状態が様々な形で発生する。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<sup>8</sup>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惹起される<sup>9</sup>。BSA 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を引き起こす。これらは遅延性の無排卵機構として注目され、調節機構におけるわかりやすい障害例である。このようなエストロゲン系とプロゲステロン系の 2 相性の制御下にある調節機構の異常は、その振れはホメオステシスの背景に隠れて、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。例えばそれは、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水平に維持されていることが、各々の筋群の拮抗関係の維持に基づく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のアナロジーで理解される。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。しかしその状態と云えども、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性質がある。通常の試験系は、こうした揺れを異常(調節不全)として想定しておらず、むしろ可逆性の範囲と捉える。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調節機構に該当する生理機構が無数にある<sup>10</sup>。EDC 物質の試験にも、こうした“調節異常の毒性”を解釈するシステムズトキシコロジーの開発が必要だったのだということに気付かされる<sup>11</sup>。低用量問題が“検出”できなかった背景には、こうした事柄も関連していた。

### 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

毒性試験の結果が決定論的な予測に限定され、エピジェネティクスの“検出力”に関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易い。しかし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 匹に造血器腫瘍、さらに 20 匹に肺腫瘍、20 匹に軟部組織腫瘍、20 匹に腎硬化症関連の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、極めて再現性良く観察されるが、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がどのネズミかを 1~2 ヶ月程度の時点で予測はできない。こうした確率論的事象はマクロ的には決定論的であり、決して不確実なのではない。まして理論問題として不可知なはずはなく、理論上はある事象の不可逆点 (point of no return) の前に予測可能なはずのものである。これまでの科学は、そうした予測法の開発に努めなかったことに疑われることもなく看過されてきた。時を経て、いま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が進んでいる。後述するように、発現遺伝子クラスター形成はホットなトピックであり、将来の毒性予測の焦点である<sup>11</sup>。

さらに実験群の母数を減らしてゆくと、イベントの確率はより低頻度になって、通常の試験では、いよいよ結果の予測がつかなくなる。これまでの毒性学では、こうした確率論的なデータを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。このことは、科学の発展段階での制約としてやむを得ないが、低用量問題はその進展を阻まれた。これが低用量問題が進まなかった 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、上のような3つの要素にあったと考えられる。では、向後どのような研究的措置を講ずれば、実態を把握できるのだろうか。これには3つの要因に即した対応が必要である。いま第1の要因について考えると、対応する1つの方策は、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させることが求められるわけであるから、それには例えば子宮肥大試験こそひとつの有効な方法であることに気づく。反対にそうしたあたらしい試験系の構築無しには、恐らく見ることはできないのであり、既存のデータを一寸見直すことによって、これまで黙過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。

この場合の問題点は、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する場合、まず前述の通りエンドポイントが不明確なことであり、次いで反応がどうしても受容体原性の影響に限られる点である。先の第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には、頻度は低くとも、前述の“早期腔開口”などの表現型や、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と観察期間をもって試験することが求められる。こうした表現型はこれまで想定になかったから、観察期間からも使用動物数からも検出に堪えなかったわけだが、頻度は低くとも、一定の確率で危害リスクが発現することは確かのようなのである。因みにBSAには、内分泌攪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がある<sup>12</sup>。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が明らかである<sup>13</sup>。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、実際に推奨されるわけではない。理解すべきは、低用量問題が理論問題としてそうした背景に繋がっているということである。

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流通している。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限りなく不可能に近い。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、抽出される毒性プロファイルから毒性シグナルデータベースを構築することは不可能ではない。毒性シグナルは何万もあるとは想定されず、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をスクリーニングし、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によって確認すると云う試みが提案されている<sup>14</sup>。米国ではそうした毒性シグナルの抽出のための昼夜を分かたぬロボティックな大規模アレイ試験が進行中である<sup>15</sup>。これらが抽出されるま

では10～20年の年月を要すると思われる。しかしそこでEDC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には多くの時間を要しないだろう。

第3のストカスティックな生体反応を考えてみよう。第2の毒性シグナルの抽出の際にも問題になるのは、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。当然のことながら、科学一般も毒性学も、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基づいて構築されている。再現性が確認できるということは、科学的であることの試金石となる代名詞である。他方、科学には再現性が確率的にしか確認できないストカスティックな世界があり、量子論の世界ではそれが命題である。生物界にも同様の現象があることが解ってきた。そこでは量子論にならった“シグナルの固定化”、つまり確率論的毒性シグナルの決定論化が、電算毒性学(コンピュータショナル・トキシコロジー)の課題である。そこでは大容量のデータの蓄積による十分に大きな確率論的なデータは、データの亜群集塊化(clusterization)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データの決定論化ができると、これまで蓋然的に捉えてきた多くの事象が確率論的な予測の射程内に入ってくる。これは医療や保健分野で現実的に期待され、試行段階に入っていることであるが、毒性分野での利用もまもなく現実の課題になるものと予想される。米国EPAなどではこれに照準を合わせている。

低用量問題は、未知で予想外な機構にもとづいていたので簡単に実相が解けなかった。生物科学の進展に伴ってその本態が明らかになろうとしている。以上に見たような従来型の試験データの背景は、これに直接関わってきた人々にも予想外の展開だったに違いない。併せて、毒性学の歴史に残るこうした想定外の展開に巡り合わせたものとして、低用量問題のこの10余年には、深く感じ入るものがある。

- 
- 1 EU Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters. 2-4 December 1996, Weybridge, U.K.
  - 2 R. Carson: *Silent Spring*, Houghton Mifflin, Boston (1962).
  - 3 Melnick, R, et al. *Environ Hlth Perspect* 110(4): 427-431, 2002.  
[http://www.epa.gov/ncer/rfa/2004/2004\\_low\\_dose.html](http://www.epa.gov/ncer/rfa/2004/2004_low_dose.html).
  - 4 Tyl RW, et al. *Toxicol Sci* 102: 392-412, 2008.
  - 5 Tyl RW, et al. *Toxicol Sci* 68: 121-146, 2002.
  - 6 井上 達: *科学(岩波書店)* 74(1): 18-23, 2004.
  - 7 Markey CM, et al. : *Environ Health Perspect* 109 : 55-60, 2001.
  - 8 Palanza P, et al.: *Environ Health Perspect* 110, Suppl.3:415-422, 2002.
  - 9 Howdeshell KL, et al.: *Nature* 401: 763-764, 1999.
  - 10 Packer L. and Yodoi J.(eds): *Redox Regulation of Cell Signaling and Its Clinical*

---

*Application*. Marcel Dekker, Inc., 1999, N.Y., pp. 328.

- <sup>1 1</sup> Hirabayashi, Y., and Inoue, T. In: *Handbook of Systems Toxicology* (D.A. Casciano, and S.C. Sahu, Eds.), John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ, 2010.
- <sup>1 2</sup> Huff J.: *Odontol.* 89: 12-20, 2001
- <sup>1 3</sup> 平林容子, 井上 達 : *基礎老化研究* 30(4):9-15, 2006.
- <sup>1 4</sup> National Research Council. *Toxicity Testing in the 21st Century: The National Academies Press*. Washington, DC, 2007
- <sup>1 5</sup> Schmidt CW. *Environ Health Perspect* **117** (8), A348-353, 2009.