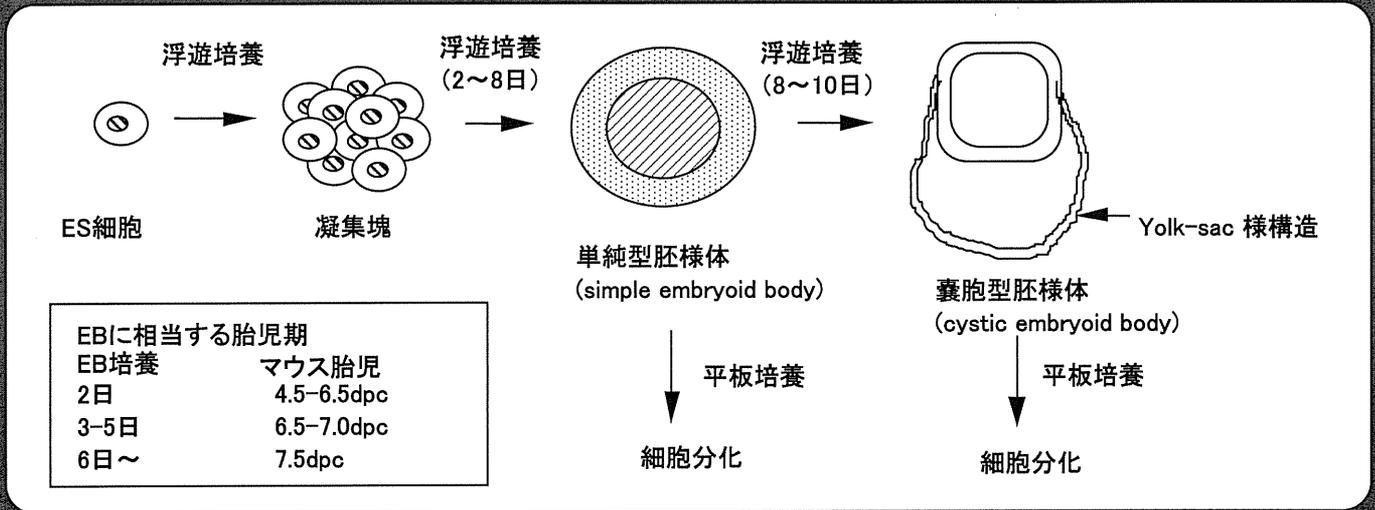


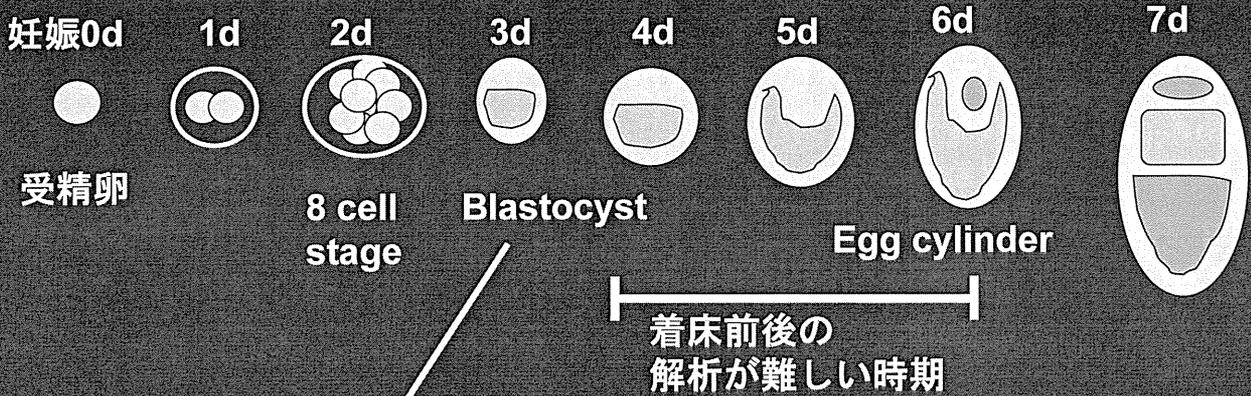
ES細胞と胚様体(Embryoid body)

ES細胞の天井培養によるEBの形成

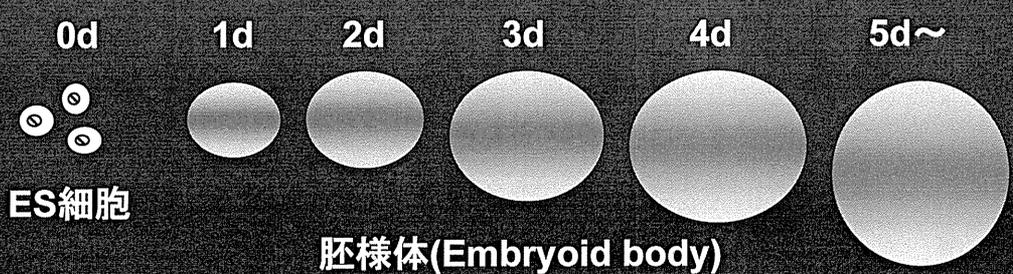


胎児とES細胞/胚様体の比較

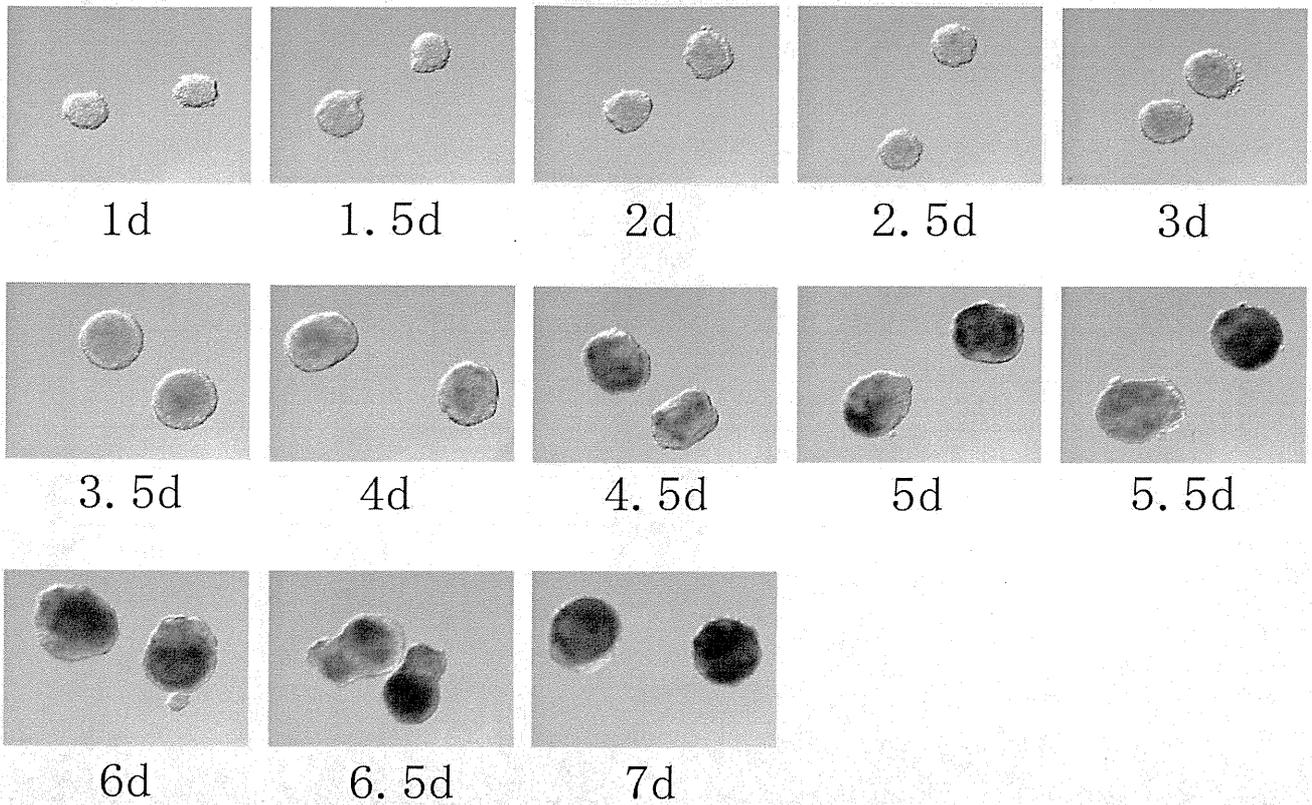
In vivo



In vitro

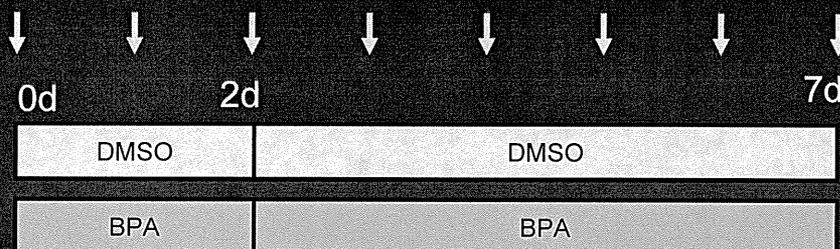


TT2 ES細胞由来EBの形態の経時的変化



実験プロトコール

- ・細胞：ES細胞 (TT2)
- ・培養：7日間の浮遊培養



- ・培地：LIF(-)のES細胞培養用培地
- ・化合物：Bisphenol-A (1nM)
- ・溶媒：DMSO (final 0.1%)
- ・サンプリング：0日(ES)と、1日目から1日ごとに7日目までのEmbryoid body (EB)を採取し、それぞれ独立に実験を行った。
- ・測定：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。
解析には定量的比較を正確に行うために、PerceLome法を用いた。

有意に変動した遺伝子数

	Up	Down
1d	3880	217
2d	426	1208
3d	361	1909
4d	757	612
5d	1016	364
6d	290	874
7d	9647	89

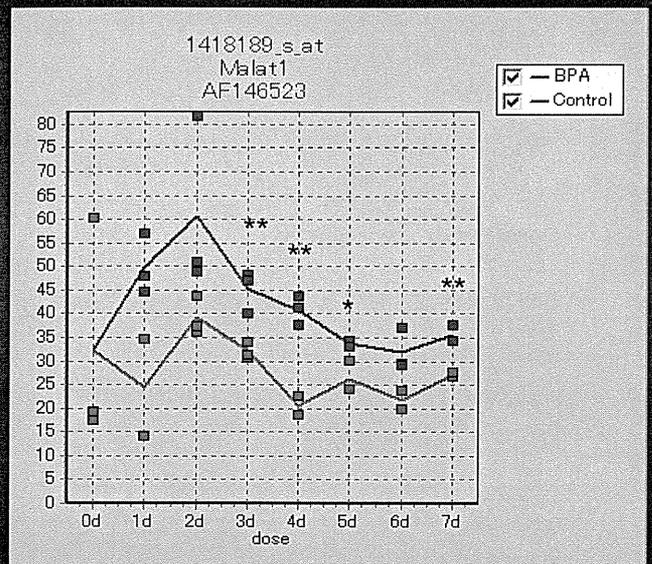
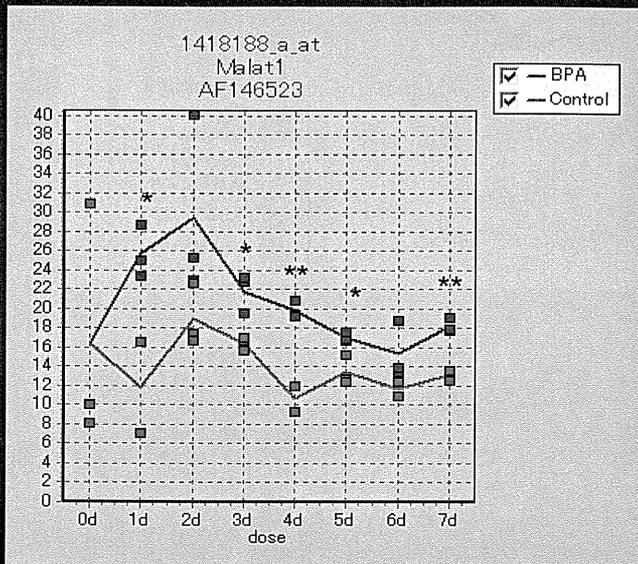
Time point	Up	Down
7	0	0
6	0	0
5	1	0
4	5	3
3	77	21
2	1673	300
1	12775	4598

45101 probe set中、 $p < 0.05$

1. Malat-1遺伝子

2. Malat-1以外の増加遺伝子

Malat-1遺伝子の発現増加

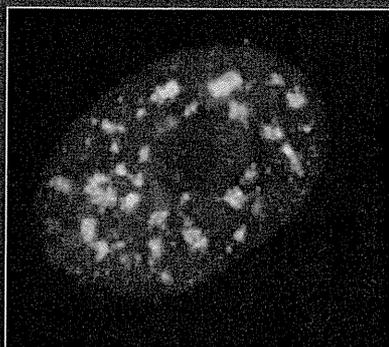


Malat-1遺伝子

(Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)

- ・転移性肺がん細胞で発現が高い遺伝子として発見された(2003)。
- ・核スペckルに存在するnon-coding RNAでスプライシング因子と共存し、スプライシングを制御していると考えられている。

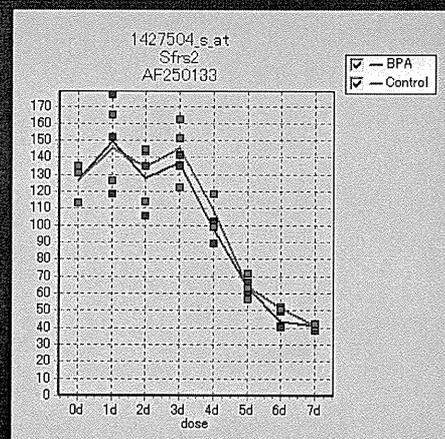
Malat-1遺伝子の核内局在

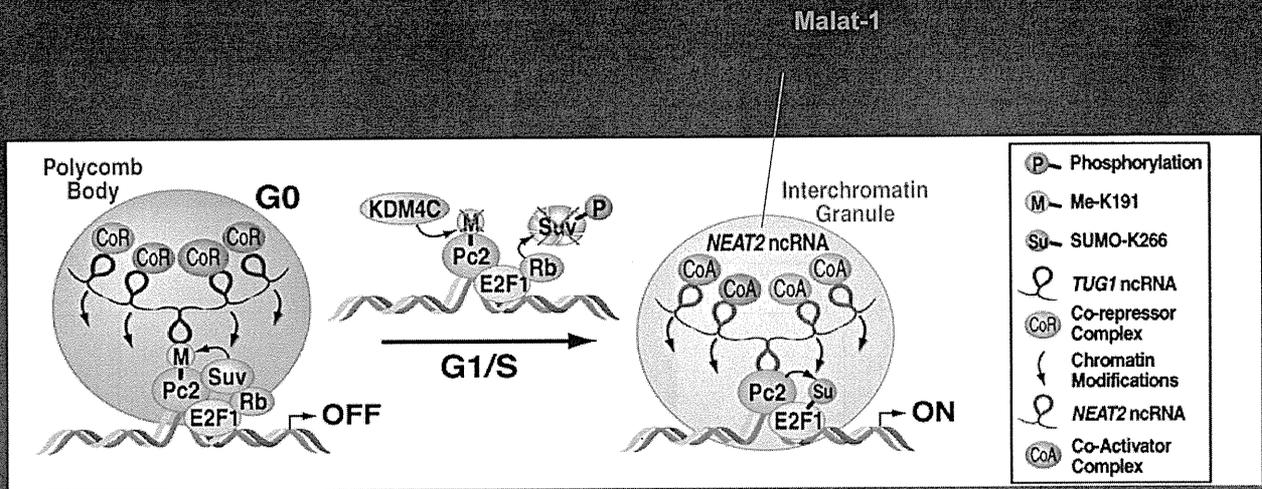


human fibroblast
Malat1 (red)
SC35
スプライシング因子

BMC Genomics, 8,
39, 2007より

ES/EB分化系でのSC35(sfrs2)の発現パターン





Cell, 147, 773, 2011より

Hela細胞において増殖刺激により脱メチル化されたPC2により増殖コントロール遺伝子がポリコームから Interchromatin granuleへ移動する。NEAT2 (Malat-1)はPC2とCoActivatorを結合することにより、遺伝子発現制御に関与している。

1. Malat-1遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子に結合させたコンストラクトと同定した受容体遺伝子をCos7あるいはES細胞にco-transfectさせ、ルシフェラーゼアッセイを行い、BPAによるMalat-1誘導に必要な領域を限定する。

ヒト-マウス間で
保存性の高い上流配列
約10kb
(制御配列がある可能性高い)

マウス19番染色体

Malat-1

Malat-1-ルシフェラーゼレポーター
(培養細胞へ導入)

Luciferase

BPA添加によりルシフェラーゼ発現が
上昇することを確認

BPA

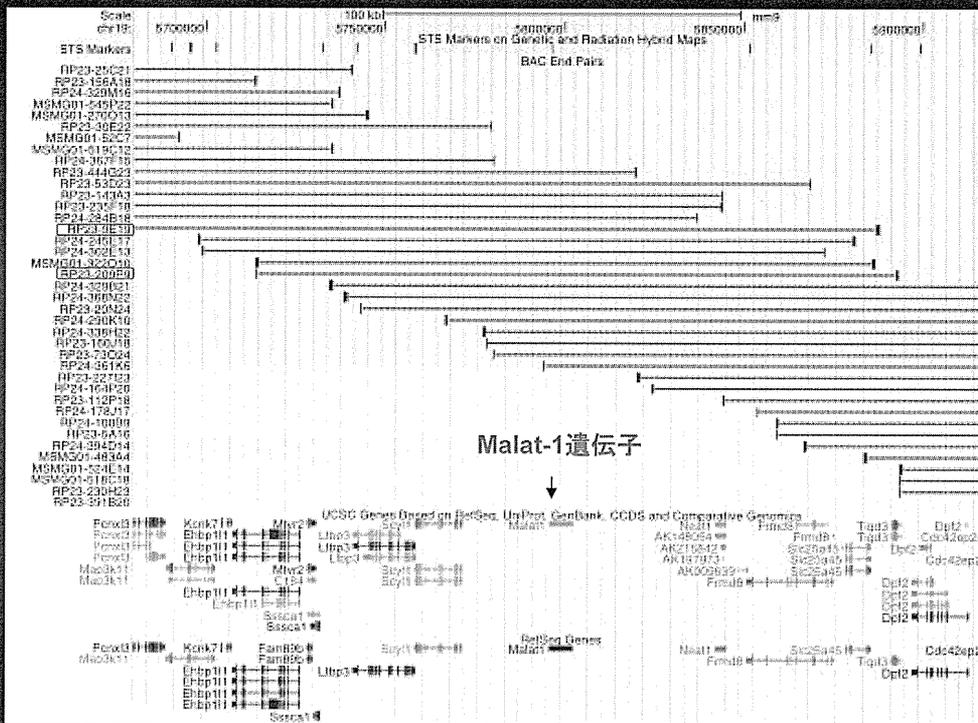
Luciferase

欠失, 変異導入により
BPA応答配列を同定

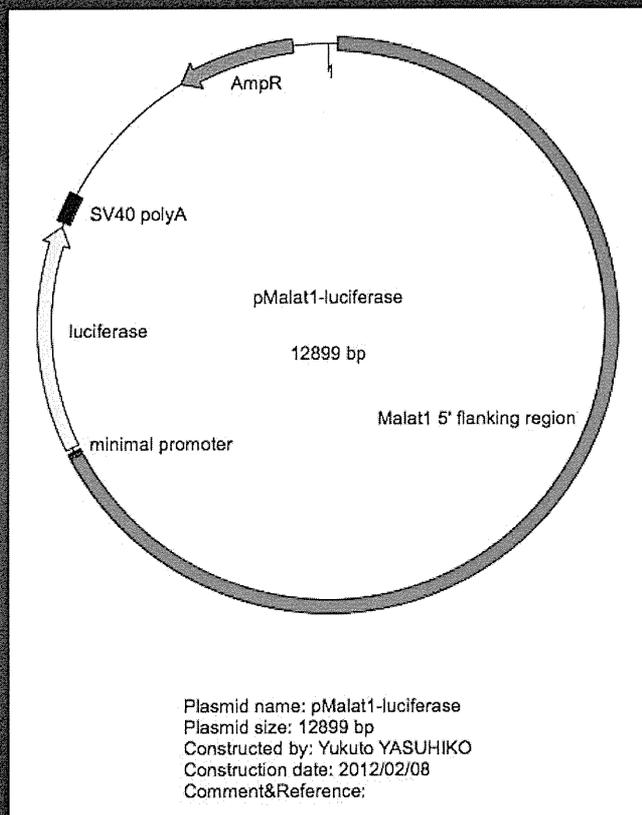
BPA

Luciferase

UCSC Genome Browser からBAC cloneの選択

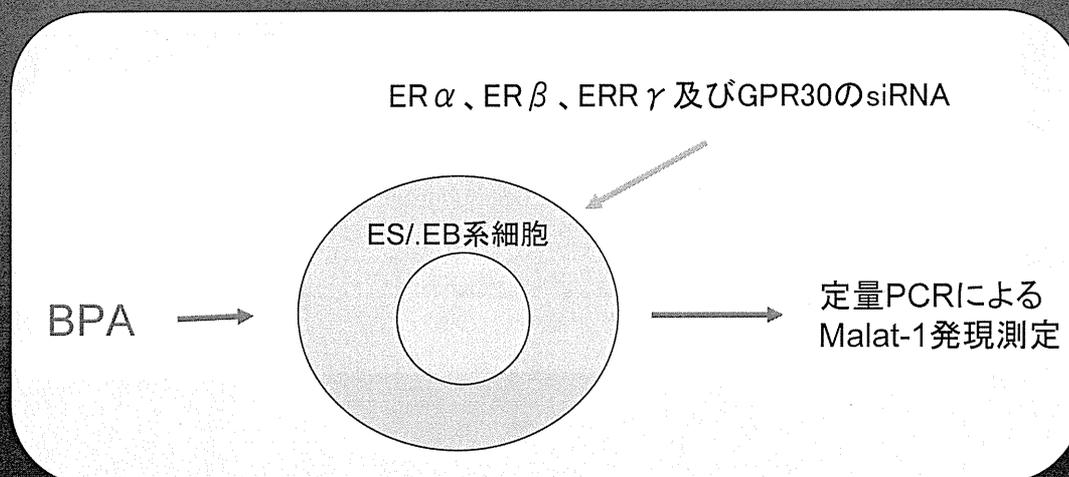


完成したconstruct

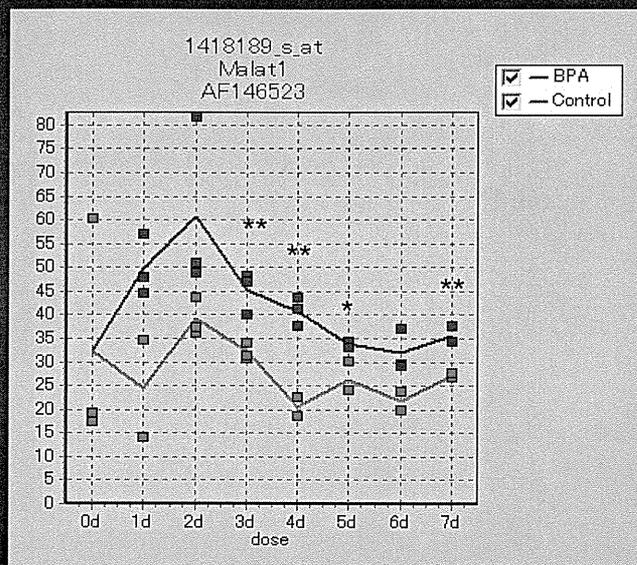
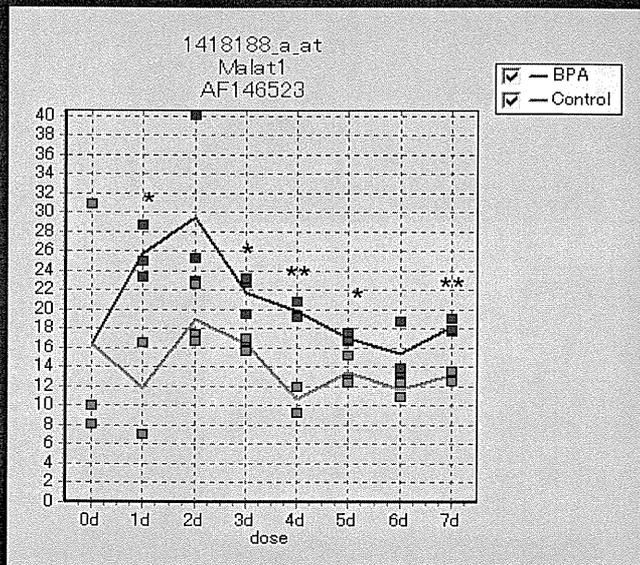


C57BL/6マウスのMalat-1遺伝子およびその上流・下流領域を含むBAC（細菌人工染色体）クローン（RP23-9E19）をIn vitrogen社から入手し、Malat-1上流9kbを制限酵素EcoRIおよびNheIで切り出してレポーターベクターpGL4-23（プロメガ社）に挿入し、ベクターを構築した。

2. BPAによるMalat-1発現上昇メカニズムにおけるエストロジン及び 関連受容体の関与を明らかにするため、ER α 、ER β 、ERR γ 及びGPR30受容体等のsiRNAによるノックダウンにより、BPAによるMalat-1誘発が阻害されるか否かをES/EB系において測定する。

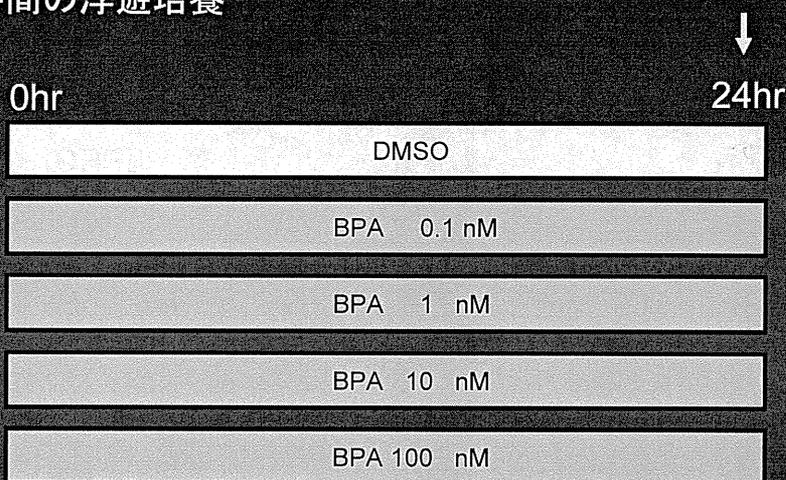


Malat-1遺伝子の発現増加



実験プロトコール

- 細胞 : ES 細胞 (TT2)
- 培養 : 24時間の浮遊培養



- 培地 : LIF(-)のES細胞培養用培地
- 化合物 : Bisphenol-A
- 溶媒 : DMSO (final 0.1%)
- サンプリング : 24hrのEmbryoid body (EB)を採取した。
- 測定 : Perce llome 定量PCR法を用いた。n=3

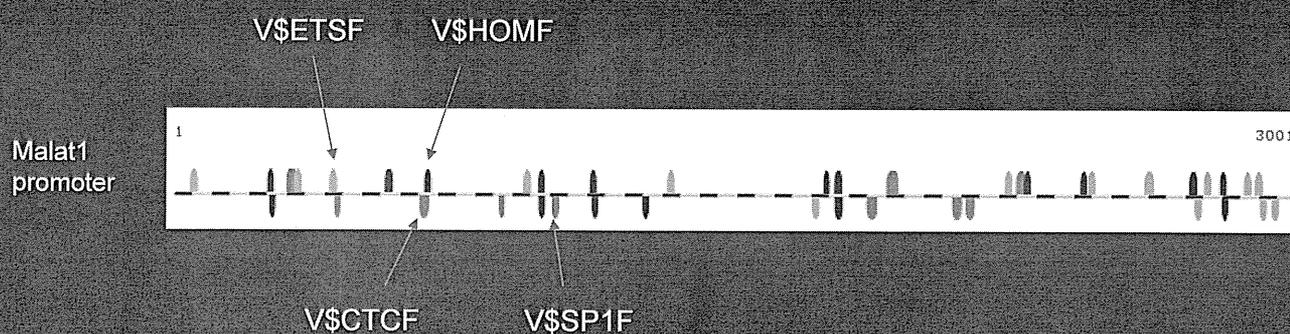
Accell siRNA導入プロトコール

長所: 独自の化学修飾によりトランスフェクション試薬が不要

siRNA(1 μ M)と細胞をMix \longrightarrow 72時間培養 \longrightarrow mRNAノックダウンの評価

ESR1とERR gで確認予定。

Malat-1遺伝子のプロモーター



まとめ

1. Non-coding RNAであるMalat-1遺伝子のプロモーター解析用ベクターを作成した。
2. 定量PCRの結果、BPAはEBにおいてESR1及びERRGを100nMの濃度で有意に増加させた。
3. 今後、他の遺伝子についても定量PCRで検討するとともにsiRNA導入実験、プロモーター解析実験を進める予定である。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、
それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23-化学-一般-002)

分担研究報告書

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究-げっ歯類一生涯試験の検証-

分担研究者 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 部長

研究協力者 根倉司、大向英夫、丸茂秀樹、香取輝美、新藤智子

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨:げっ歯類を用いる一生涯試験の検証を目的として、ビスフェノール A またはジエチルスチルベストロールを用いて、C57BL/6J マウスの新生児期に強制経口投与を実施し、現在、低用量影響を検索中である。これまでところ体重推移および性成熟に、ビスフェノール A およびジエチルスチルベストロール投与群とも影響はみられていない。今後、免疫検査を実施し、両物質の低用量域における免疫系に及ぼす遅発影響の有無を調べ、一生涯試験の検査項目としての妥当性を検証する。

A. 研究目的

化学物質の子どもへの有害性評価法の確立を目的に、内分泌かく乱作用を確定する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行ってきた。子どもの発達期は、受容体シグナルをかく乱する程度の低用量暴露により、神経-内分泌-免疫系に不可逆的な変化を及ぼす可能性が示唆されている。したがって、化学物質の低用量域での子どもに対する有害性評価法の確立は重要である。本研究は、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」(試験スキーム)の拡充と確定試験法の確立を目的とし、子どもの発達期における低用量暴露が、成長後の脳および免疫系に対して「遅発影響」を及ぼすか否かを検討する。得られた結果は、OECD が提唱する延長一世

代試験(TG415)のガイドラインにも情報提供ができるものと期待される。

B. 研究方法

1. 被験物質

A. ビスフェノール A (略称:BPA)

1) CAS 番号:80-05-7

2) 純度:99.9%

3) ロット番号:009X1493

4) 入手先: 関東化学工業株式会社

B. ジエチルスチルベストロール

1) CAS 番号:56-53-1

2) 純度:99.5%

3) ロット番号:096K1041

4) 入手先:シグマアルドリッチジャパン株式会社

2. 陰性対照物質(媒体)

- 1) 名称: 日本薬局オリブ油
- 2) 製造者: フヂミ製薬所
- 3) ロット番号: 053AOA

3. 使用動物

- 1) 種、系統、品質: C57BL/6J マウス (SPF)
- 2) 生産所: 日本チャールス・リバー株式会社
- 3) 購入動物数: 妊娠雌 60 匹
- 4) 群数および母動物数: 5 群、12 匹/群

4. 飼育条件

- 1) 温湿度: 温度 21.0~25.0°C、湿度 40.0~75.0%
- 2) 明暗サイクル: 7 時点灯、19 時消灯
- 3) 床敷: ペパークリーン(日本エスエルシー)
- 4) ケージ: TPX 樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm、日本チャールス・リバー)
- 5) 飼育密度: 1 腹/ケージ(離乳後 2~4 匹/ケージ)
- 6) 餌: 固型 Phytoestrogen-low diet (PLD)
- 7) 飲料水: 水道水(秦野市水道局給水)

5. 動物愛護

全ての実験操作は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「厚生労働省が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」に基づき実施している(動物実験承認番号:1110278A)。

6. 投与検体の調製

1) 調製法

(1)BPA の調製:0.020 g 秤量し、エタノール 1 mL に溶解後、オリブ油を加えて全量を 20 mL として作製した 1 mg/mL 液に、適宜、オリブ油を加えて投与検体を調製した。

(2)DES の調製:0.020 g 秤量し、エタノール 1

mL に溶解後、オリブ油を加えて全量を 20 mL として作製した 1 mg/mL 液に、適宜、オリブ油を加えて投与検体を調製した。

2) 保管条件

調製した投与検体は、ガラス製気密容器に入れ、冷蔵、遮光条件下で保管し、調製後 7 日以内に使用した。

7. 投与方法

1) 投与経路: マイクロシリンジおよび新生児用胃管を用いて強制的に経口投与した。

2) 投与量、群構成

投与物質	投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	投与容量 (mL/kg)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
オリブ油	0	10	0
BPA	5	10	0.5
BPA	50	10	5
DES	0.002	10	0.0002
DES	0.02	10	0.002

3) 投与液量: 毎日測定した体重(腹平均)をもとに、腹ごとに投与液量を算出した。

4) 投与回数と投与時刻: 1 回/日、13 時~15 時。

5) 投与期間: 生後 1 日~生後 5 日まで。

8. 試験操作・検査・測定

■ 現在までのところ、以下の検査を実施した。

1) 哺育児体重: 哺育 1~5(毎日)、7、14、21 日に litter 重量を測定した。

2) 同腹児数の調整: 実施しなかった。

3) 離乳: 哺育 21 日に母動物から全哺育児を離乳させ、以下の検査に供した。

4) 一般状態の観察: 毎日 1 回観察した。

5) 体重測定: 3 週齢以降毎週 1 回測定した。

6) 性成熟: 膣開口は、生後 26 日から開口するまで毎日観察し、完成日に体重を測定した。包皮分離は、生後 28 日から分離するまで毎日観察し、完成日に体重を測定した。

■ 今後は、以下の検査を実施する。

7) 性周期:24 週齢から 2 週間間隔で連日 2 週間、膣スメア標本を作製し、性周期を観察する。

8) 免疫学検査 I

14、24 および 48 週齢の各時期に、雌雄とも 6 匹以上/群(原則として各腹から雌雄各 1 匹)について、ヒツジ赤血球 (SRBC) を静脈内投与し、以下の検査を行う。

①SRBC に対する抗体価測定:SRBC 投与の 5 日後にセボフルラン麻酔下で心臓採血し、血中の抗-SRBC IgM を測定する。

②器官重量:胸腺および脾臓の重量を測定する。

9) 免疫学検査 II

14、24 および 48 週齢の各時期に、雌雄とも 6 匹以上/群(原則として各腹から雌雄各 1 匹)について、セボフルラン麻酔下で心臓採血後、胸腺および脾臓を摘出し、以下の検査を行う。

①器官重量:胸腺および脾臓の重量を測定する。

②イムノフェノタイピング:脾臓および胸腺の細胞を CD4 抗体および抗 CD8 抗体で染色し、フローサイトメーターを用いて測定する

③リンパ球幼若化反応:脾臓の細胞をマイトジェン添加培養液中で培養し、細胞増殖の活性を調べる。

④白血球数:採取した血液の白血球数及び白血球百分率の検査を行う。

⑤サイトカイン測定:脾臓および胸腺の細胞を ConA 添加培養液中で 72 時間培養し、培養液中の IFN- γ 、IL-4 濃度を、ELISA キットを用いてマイクロプレートリーダーにより測定する。

C. 研究結果

哺育 1 日から哺育 21 日までの体重推移に、BPA 投与または DES 投与の影響を示唆する

変化は認められなかった。また、離乳後の生後 28 日から生後 56 日までの体重推移についても、BPA 投与または DES 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

雌の膣開口の時期には、対照群と BPA 投与群あるいは DES 投与群との間で有意差は認められなかった。さらに、雄の陰茎包皮分離の時期についても、対照群と BPA 投与群あるいは DES 投与群との間で有意差は認められなかった。

D. 考察・結論

子どもの発達期における低用量暴露が、成長後の免疫系に誘発される「遅発影響」を検討するために、5 または 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の BPA あるいは 0.02 または 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DES を C56BL/6J マウスの新生児期に強制経口投与し、現在、飼育中である。これまでのところ、体重推移および性成熟の指標に、被験物質投与の影響はみられていない。

以前、新生児マウスに DES を強制経口投与して実施した一生涯試験においては、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群の雌において、過剰な体重増加が観察されたが、今回の試験においては今のところ、0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DES 投与群の雌においても過剰な体重増加は認められていない。また、以前の試験では 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DES 投与群において、DES のホルモン活性による影響と考えられる膣開口時期の遅延が見出されているが、今回の試験では性成熟の時期に影響が認められていないことから、使用した被験物質の濃度は、ホルモン活性を示さない低用量域と考えられる。以前実施した新生児期 DES 投与マウスでは、IgM 抗体産生能が用量に依存して低下し、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の DES 投与群で有意差が認められていることから、本実験において実施する予定の免疫検査において、抗体産生能の低下が再現されれば、ホル

モン活性を示さない低用量域での内分泌かく乱作用の指標として、免疫検査が有効な検査項目となり得ると期待される。

E. 発表論文, 学会発表

太田亮、大沢基保：周産期のアレルギー
Developmental Immunotoxicology (DIT)、周産期医学、41:5:609-613 (2011)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究
-げっ歯類一生涯試験の検証-

分担研究者 太田亮、根倉司、大向英夫、香取輝美、新藤智子
(財)食品薬品安全センター秦野研究所

本日の主な内容

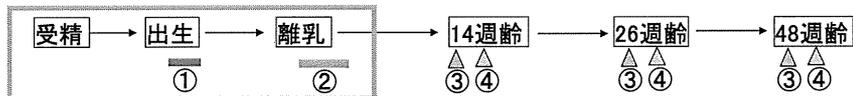
1. マウスを用いた低用量化学物質の
新生児投与による免疫毒性試験
2. 新生児期にDESを経口投与した
C57BL/6Jマウスに認められた腫瘍
3. 近交系ラットによる一生涯試験の検
証(提案)

1. マウスを用いた低用量化学物質の 新生児投与による免疫毒性試験

【方法】 動物種と系統
経路
投与物質と投与量

マウス、C57BL/6J
新生児経口投与

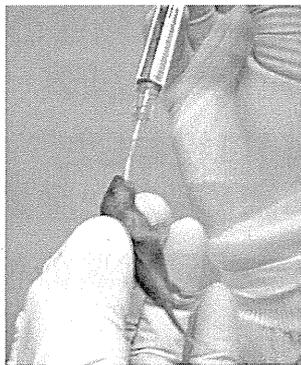
BPA 5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
DES 0.002~0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$
GEN 100~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$



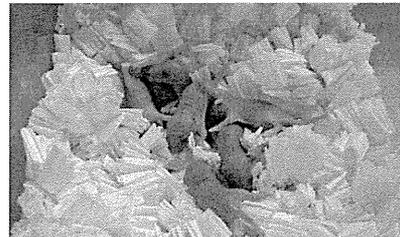
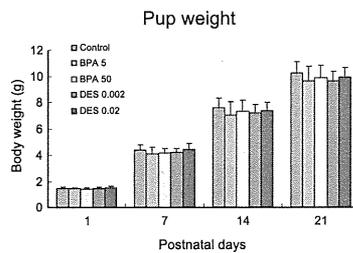
- ① 投与 生後1~5日
- ② 性成熟 3~6週齢
- ③△ 免疫検査 14, 26, 48週齢
- ④△ 器官重量 14, 26, 48週齢

新生児に強制経口投与
腔開口時期、陰茎包皮分離を観察
ヒツジ赤血球に対する抗体産生能
イムノフェノタイピング
リンパ球幼若化反応検査
サイトカイン測定
脾臓と胸腺重量を測定

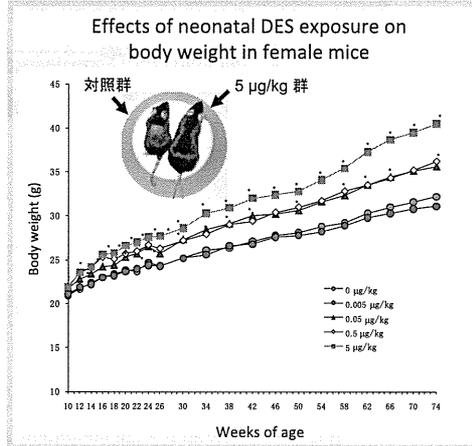
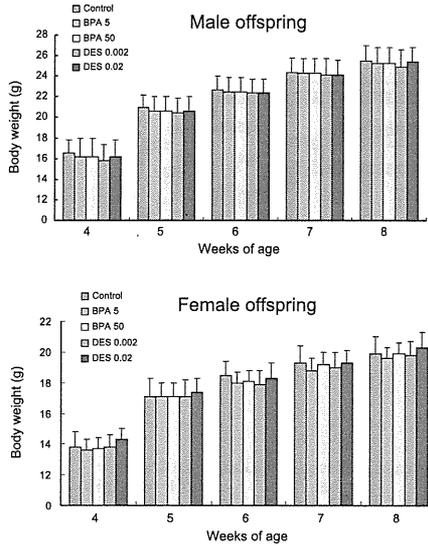
新生児投与



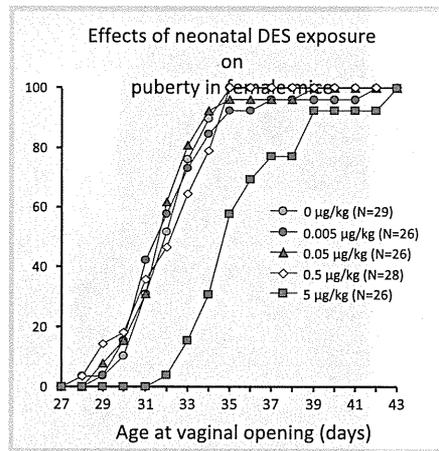
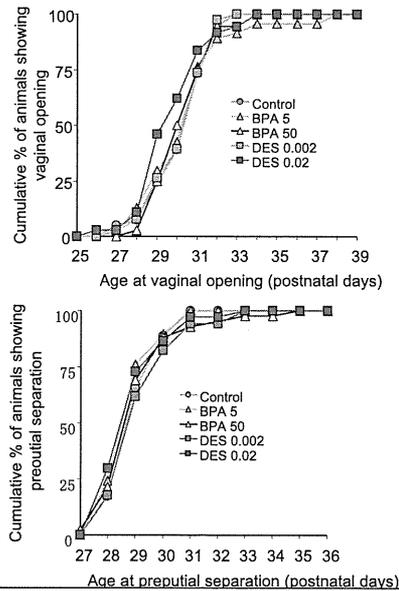
新生児に強制経口投与



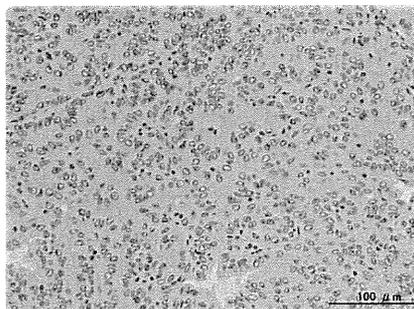
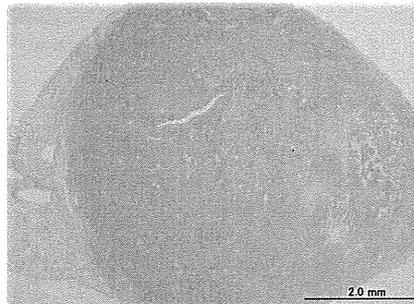
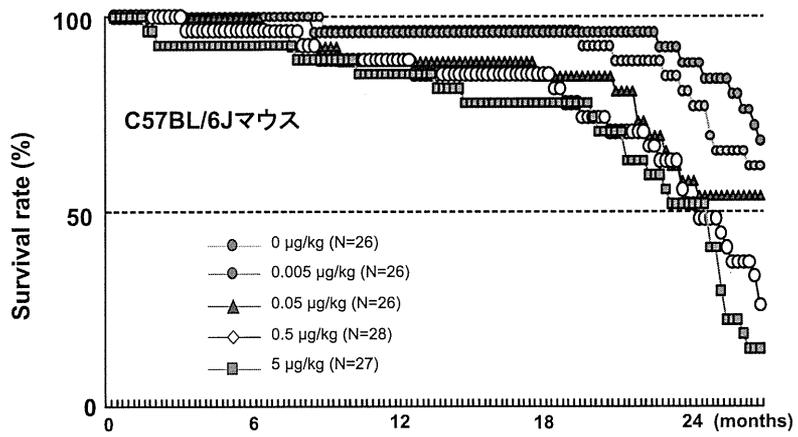
体重推移



性成熟



2. 新生児期にDESを強制経口投与したC57BL/6Jマウスに認められた腫瘍



2-106 肺腺癌

