

201329002B

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)

平成 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 長尾 哲二
平成 26 (2014) 年 3 月

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)

平成 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 長尾 哲二
平成 26 (2014) 年 3 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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)

平成 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 長尾 哲二
平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
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 -	
長尾 哲二	1
II. 分担研究報告	
1. 低用量暴露の標的臓器としての脳・神経系への影響評価系の確立	
1) 低用量ビスフェノール A の胎児期暴露が誘発する大脳皮質形成異常の解析	
2) 低濃度化学物質で曝露した培養細胞の機能に関する研究	
長尾 哲二	15
2. Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスを用いた化学物質の神経標的解析	
渡邊 肇	67
3. 周産期低用量暴露による免疫影響評価	
林 良夫	73
4. マウス雌性生殖器官の女性ホルモンシステムとその破綻の分子機構	
井口 泰泉	103
5. 化学物質による遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 対応	
菅野 純	139
6. 化学物質の子どもへの影響評価に関する研究 - 齧歯類一生涯試験の検証 -	
太田 亮	157
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	165
IV. 研究成果の刊行物・別刷	169

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）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
- 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）
（平成 23～25 年度）総合研究報告書

研究代表者 長尾 哲二 近畿大学理工学部生命科学科 教授

研究要旨

近年の「低用量暴露による遅発性影響」研究の進展により、bisphenol A(BPA)に代表される化学物質が女性ホルモン受容体 (ER) を介して作用しているか否かが問題となっている。即ち、確定試験としての齧歯類一生涯試験法の確立と併せて、「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) の拡充の必要性が問題となっている。

そこで本研究では、先行研究の成果を最大限に取り入れ、「試験スキーム」の網羅性拡充のために必要な基盤研究を進めた。国内外で生体影響の分子メカニズム解明が急がれているBPA及びdiethylstilbestrol (DES)を掲げ、①発生・発達期の脳神経系及び免疫系に対する低用量暴露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発性影響」、及び、②その分子標的としてのDNA修飾機構及びmRNA修飾機構を検討した。さらに厚生労働省の「齧歯類一生涯試験法」において遅発性影響を検証した。

その結果、①では低用量BPAの胎児期暴露による大脳皮質の神経新生促進による皮質発生の異常と出生児の大脳皮質における層構造の異常を明らかにし、またER遺伝子の発現部位を可視化したマウスを作製し、脳内ER発現の雌雄差を確認した。さらに妊娠期の胸腺細胞ではダイオキシン受容体 (AhR) を介したT細胞分化や機能に関与する遺伝子のエピジェネティックな影響が大きく関与し、TCDD暴露によりその変動が大きくなることが判明した。②からは臍組織の未成熟な時期のDES暴露による長期的かつ不可逆的な応答にPten/PI3K/Akt及びWnt/ β -カテニンシグナルが重要であることを明らかにした。また胚様体 (ES/EB) 培養系において低濃度BPA暴露によりnon-coding RNA Malat-1遺伝子の発現増加を認めた。Malat-1ホモ欠失ES細胞を用いた解析から、Malat-1がBPAに対し防御的に働くことが示唆された。一生涯試験法の検証では低用量BPAあるいはDES投与による遅発効果として性周期及びT細胞分化への影響を確認した。

これらの成果から、周産期低用量暴露が引き起こす高次生命維持系の組織構築かく乱による不可逆的遅発性影響について、個別の化学物質の毒性の検証に留まらず体系的かつ総合的な評価系の構築が期待される。また *in vitro* 評価法確立の検討成果ならびに一生涯試験法の検証結果から、厚生労働省「試験スキーム」の拡充の提案も併せて可能と考える。

研究分担者

渡邊 肇	大阪大学大学院 工学研究科 教授	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
林 良夫	徳島大学 名誉教授		毒性部 部長
井口泰泉	自然科学研究機構・岡崎統合バイ オサイエンスセンター 教授	太田 亮	財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 毒性部 部長

A. 研究目的

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)の網羅性の拡充と確定試験法の確立を目的とした。このために、①発生・発達期の脳及び免疫系に対する低用量暴露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発性影響」、及び、②その分子標的としてのDNA修飾機構及びmRNA修飾機構を検討した。①からは臓器～細胞レベルの遅発性影響の同定とその影響発現メカニズムを明らかにして評価系の確立を目指し、②からは発現メカニズムに共通する分子基盤を明らかにした。また、先行研究で培った③「齧歯類一生涯試験法」の検証を並行し、厚生労働省「試験スキーム」の拡充を提案することとした(図1)。

B. 研究方法

B-① 低用量暴露の標的臓器(脳、免疫系)への影響、とくに遅発性影響の同定とその発現メカニズムの解明

B-①-1 周産期の低用量化学物質暴露による大脳皮質形成への影響(長尾)

In vivo 実験に免疫組織染色法及びチミジン類似物質ラベル法を適用して、ニューロンの大脳皮質成熟後の数や位置を解析し、低用量化学物質の胎児期暴露によるニューロン新生及び神経細胞移動の障害による大脳皮質層構造の微小異常などを胎児期あるいは新生児期での検出のみならず成熟後の遅発性影響を検出する系の確立を目指した。さらに神経細胞分化への影響評価の「代替法」として中枢神経系細胞(神経上皮細胞)の分化モデルを用いた *in vitro* 評価法の確立を試みた。

B-①-2 Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスを用いた化学物質の神経標的解析(渡邊)

神経軸索内微小管結合蛋白 tau と β -ガラクトシダーゼを融合させて、ER α 発現神経細胞の樹状突起までを可視化した tau 融合 ER レポーター(Tau-ER) マウスを作製することを目指し

た。このマウスにより ER 遺伝子の発現部位を細胞レベルで明らかにすることが可能になる。すなわち、ホルモン様作用を有する化学物質を新生児期マウスに暴露し、ER の量的、機能的変化を観察して、新生児～幼若期特有の変化のメカニズム、とくに発生・発達期の脳・神経系が示す高感受性の作用メカニズムを明らかにすることができる。

B-①-3 周産期の低用量化学物質暴露による免疫影響評価(林)

新生児期に低用量のダイオキシン暴露により遅発性影響として自己免疫性病変が誘導されることから、周産期におけるダイオキシン受容体(AhR)を介した免疫反応を中心に検討し、標的臓器における組織異常の同定とそれに至る分子機構の解明により免疫系への低用量遅発性影響の評価系完成を目指した。すなわち、妊娠期における胸腺組織及びリンパ節での T 細胞分画の解析、AhR 発現及び AhR ノックアウトマウスの胸腺組織における免疫関連遺伝子のメチル化を検討し、さらに妊娠期における胸腺組織のダイオキシン暴露による影響を網羅的遺伝子発現解析により検討した。

B-② 「遅発性影響」の標的分子とその分子基盤の解明

B-②-1 化学物質による遅発性影響標的分子としての DNA 修飾機構の解析(井口)

膣、子宮などの女性生殖管はその発生期にホルモン様化学物質に暴露されると遅発性影響が観察されることから、雌性生殖管(膣上皮)をモデルとした。雌性生殖管に対する女性ホルモンの不可逆的かつ長期的影響など組織・個体レベルでのホルモン応答システムの破綻のメカニズムを明らかにすることを目指した。すなわち、周産期の化学物質暴露が誘導する組織不可逆化の発症メカニズムについて、ホルモン様作用を有する化学物質暴露によって誘導される組織異常の原因遺伝子の同定及びその遺伝子の発現制御メカニズムの解析により明らか

にした。特に多くの組織の発生・分化・細胞増殖などに関係する Wnt/ β -カテニン経路及び PI3K/Akt 経路に注目し、遺伝子改変マウスあるいは周産期 DES 暴露マウスを用いて解析した。

B-②-2 化学物質による遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 対応（菅野）

ES 細胞分化系において低濃度 BPA が Malat-1 (non-coding RNA) の発現を増加させ、胎児で Stat1、Egfr、ER α 等がこれと同期発現したことから、向神経因子としての解析意義が大きいと判断した。そこで *in vitro* 系においてホルモン様作用を有する化学物質による Malat-1 と細胞分化の関係を、また *in vivo* 系においてその発現局在を *in situ* hybridization 法により解析し、ホルモン様物質による遅発性影響の分子標的としての mRNA 修飾機構を検討した。さらに Malat-1 遺伝子の機能解析のためのノックアウトマウスの作製を試みた。

また、OECD/WHO 対応として OECD 関連会合などに出席し、低用量効果、遅発性影響あるいは評価試験法を含む内分泌かく乱問題の情報交換ならびにコメント対応を行った。

B-③ 齧歯類一生涯試験法の改良、及び OECD 対応（太田）

脳神経 - 内分泌 - 免疫系ネットワークの発生、発達、成熟、老化を考慮した厚生労働省の「齧歯類一生涯試験法」において低用量の性ホルモン様作用を有する化学物質 (BPA、DES) を適用し、改良の必要な問題点を明らかにし、OECD の延長一世代試験への反映を試みた。すなわち、これまで本試験法により見出された性周期、免疫機能及び体重における遅発性影響の再現性を確認する実験をさらに低用量域で試みた。

(倫理面への配慮)

各研究施設の倫理規定に従い、倫理委員会の

承認を得た上で適切に動物実験を実施した。マウスを用いた動物実験は各研究施設の動物実験規程に準拠し、かつ動物実験委員会の承認を受けた。実験は必要欠くべからざる場合にのみ行い、動物数を最小限にとどめ、サンプリングの際にはすべて麻酔下に行い動物に苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究結果

C-①-1 低用量暴露の標的臓器としての脳神経系への影響評価系の確立

胎児期の低用量 BPA 暴露による大脳皮質形成への影響を明らかにするために、C57BL 妊娠マウスの胎児脳神経系発生期に BPA を経口投与し、神経幹/前駆細胞の数や分布、増殖能や細胞周期の異常に着目して、免疫組織化学的手法と細胞ラベリング法を用いて解析した。その結果、胎児において皮質板の肥厚と神経幹/前駆細胞の減少が観察され、低用量 BPA は神経幹/前駆細胞の分化するタイミングを早めることで神経新生を促進すると同時に細胞周期の長さが短くなり、結果として増殖能が低下することを明らかにした (平成 23 年度)。さらに、大脳皮質形成への影響を、胎児脳に多く局在する ERR γ に BPA と同様、結合することが報告されている 4-ヒドロキシタモキシフェンの低用量胎児期暴露でも確認し、毒性発現メカニズムが BPA と同じであることを明らかにした (平成 24 年度)。また、低用量 BPA の遅発性影響の有無を検討するために出生児大脳皮質の層構造を、layer marker を用いて解析し、第 6b 層の減少を明らかにしたとともに、胎児期に生まれたニューロンを標識して、低用量 BPA はニューロンの移動・分布に影響を及ぼすことも明らかにした (平成 25 年度)。

In vitro 評価法 (代替法) の検討では、神経系細胞への低濃度 BPA の長期暴露が神経分化に影響を及ぼすことを明らかにした。

C-①-2 Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスの作成と化学物質の神経標的解

析

ER 遺伝子発現細胞を可視化したマウスを作成するために、BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子を組込むために、Red/ET 相同組換え法を用いた。BAC 側の挿入予定部位の配列を合成し、tau-lacZ レポーター遺伝子の両末端に PCR 法によって融合させたのちに、この DNA 断片をリコンビナーゼと共に RP23-7 D5BAC クローンを有する大腸菌に導入した。薬剤耐性を指標として、RP23-7 D5BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子が挿入されたクローンを得た。得られたクローンを大量精製し、塩基配列を確認したところ、予定通りの組換えが生じており、ER α 遺伝子の翻訳開始 ATG 以下が tau-lacZ に置換されていることを確認した（平成 23 年度）。構築したプラスミドをマウス受精卵にインジェクションし児を得た。トランスジーンを確認した結果、構築した遺伝子が導入されていることが確認できたので交配したところ、トランスジーンについては問題なく生殖系列に導入され、ER 発現部位において可視化用マーカー遺伝子の共発現を確認した（平成 24 年度）。次いで、ER 遺伝子発現細胞を可視化したマウスを解析して、視床下部腹内側核における X-gal シグナルの雌雄差を確認し、また新生児期 DES 暴露によりその発現細胞数が変化することを明らかにした（平成 25 年度）。

C-①-3 周産期の低用量化学物質曝露による免疫影響評価

妊娠期のリンパ節あるいは脾臓の T 細胞分画を解析したところ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞がリンパ節及び脾臓において非妊娠期に比較し増加した。妊娠マウスの胸腺細胞における AhR の mRNA 発現は非妊娠マウスの胸腺組織における発現に比べ増加した。AhR ノックアウトマウスの胸腺細胞では、Th1 及び Th2 関連遺伝子の DNA メチル化に変動がみられた。さらに妊娠マウス胸腺組織では autoimmune regulator mRNA も上昇した。アロマトマーゼノックアウトマウスの胸腺組織でも AhR mRNA 発

現が増進した（平成 23 年度）。次いでケモカイン、サイトカイン、それらの受容体、各種転写因子、Th1/Th2/Th17 関連遺伝子に加え、エピジェネティックな変化が想定される遺伝子について、妊娠マウス胸腺組織の *in vitro* での TCDD 暴露の結果、C57BL マウスと AhR ノックアウトマウスでの遺伝子発現に差はみられず、妊娠により増進した多くの遺伝子発現が TCDD 暴露により低下した（平成 24 年度）。妊娠期の胸腺組織での T 細胞分化、増殖あるいはアポトーシスに関与する遺伝子群が大きく変動し、*in vivo* でのダイオキシン投与により、特定の遺伝子群の変化が観察された（平成 25 年度）。

C-②-1 マウス雌性生殖管の女性ホルモンシステムとその破綻の分子機構

未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答について、女性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子の候補としての Wnt シグナルとのクロストークの解析を行った。 β -カテニンを構成的に活性化させた遺伝子改変マウスの膈上皮細胞において、女性ホルモン作用非依存の細胞増殖が誘導された（平成 23 年度）。さらに周産期に DES を投与したマウスの膈上皮の基底細胞の一部や腺様疾患部でも β -カテニンは高発現し、妊娠期女性ホルモン暴露によるホルモン応答システムの破綻時において、Wnt/ β -カテニン経路の関与が明らかとなった（平成 24 年度）。Pten CK0 マウスの新生児期に DES を投与し、その遅発性影響を観察したところ、基底細胞あるいは重層扁平上皮細胞において Pten が過剰な PI3K/Akt シグナルを抑え、過形成（腫瘍化）も抑えていることが分かった。また、膈上皮細胞の ER は、その細胞増殖には影響はないが、角質化への分化に必須であることを明らかにした（平成 25 年度）。

C-②-2 遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 会合出席

胚様体 (EB) における BPA 応答遺伝子の用量

反応解析を行い ER α 及び ERR γ の発現増加を認めた。EB 培養系において、BPA 暴露により RNA スプライシングに関与する Malat-1 が BPA の低濃度で増加することをマイクロアレイ解析により確認した（平成 23 年度）。そこで、Malat-1 の発現機構を調べるためにプロモーター解析ベクター及びノックアウトマウス作製のためのターゲティングベクターを構築した。さらに同遺伝子の定量的 *in situ* hybridization を行い、マウス胎児脳での高発現を確認した（平成 24 年度）。次いで Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を用いた解析から Malat-1 は BPA に対して防御的に働いていることが示唆された。Malat-1 遺伝子のプロモーター解析から BPA により活性低下がみられた。また *in situ* hybridization 法では、マウス胎児脳における Malat-1 発現に BPA 投与の影響は認められなかった。（平成 25 年度）。

OECD 対応では、内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関する OECD/EDTA 第 3 回アドバイザーグループ会合に出席して厚生労働科学研究の進捗状況を報告した（平成 23 年度）。また米国国立環境科学研究所に於いて開催された BPA 会合に出席し、BPA 低用量問題などについて情報収集と情報交換を行うとともに、OECD の TG443 付随ガイダンスドキュメント 151 について意見交換を実施した（平成 24 年度）。

C-③ 齧歯類一生涯試験における遅発影響としての性周期変化及び免疫学的変化の検証

齧歯類を用いる一生涯試験の検証として、さらに低用量の BPA（5 及び 50 μ g/kg）あるいは DES（0.002 及び 0.02 μ g/kg）を C57BL マウスの新生児に経口投与し、遅発性影響を検索した。8 週齢までの体重推移には BPA あるいは DES 投与の影響は認められず、雌の膈開口の時期及び雄の陰茎包皮分離の時期を指標とした性成熟にも影響はみられなかった（平成 23 年度）。14 週齢で各種の免疫学的検査、24 週齢から性周期を観察し、体重測定を実施した。性周期への明らかな遅発性影響は認められなかったが、

BPA 投与により 14 週齢以降の雌に T 細胞分化の影響が観察され、また両物質とも雌で体重推移に遅発性の肥満を示唆する変化が観察された（平成 24、25 年度）。DES を新生児に投与してみられた遅発性の性周期異常の誘発要因を明らかにするため、視床下部-下垂体-性腺軸の反応性が異なるラット 2 系統を使用して検討した結果、遺伝的要因の関与が示唆された（平成 25 年度）。

D. 考察

脳・神経系の影響評価研究では、低用量 BPA の胎児期暴露が細胞周期の異常を引き起こすことにより、胎児大脳皮質の分化に影響を及ぼすことを明らかにした。胎児期に生まれた神経細胞移動の異常の有無と併せて、大脳皮質にみられた異常が生後も維持されることも明らかにしたが、成熟後に行動などの高次脳機能に影響を及ぼすか否かを今後明らかにする必要がある。さらに皮質板の肥厚（過形成）がヒトで報告されている自閉症児の脳肥大傾向と関連があるのか否かなど、毒性学的意義についても今後明らかにする必要がある。また、脳・神経系の影響評価研究においては、中枢神経系の培養細胞を用いた *in vitro* 研究を並行し、化学物質の毒性発現メカニズム解明のみならず、化学物質の標的分子の同定とそれを活用した「代替評価法（神経分化評価系）」の開発に結びつく成果も得た。以上から、今回毒性学の分野に応用した高感度免疫組織化学的手法と細胞ラベリング法は胎児、新生児あるいは成熟期の脳・神経系への低用量影響評価系として有用であると結論される。

ER は大脳皮質形成に重要な役割を果たすため、本研究において ER 遺伝子発現神経細胞を可視化したマウスの作製に成功したことは意義が大きい。このトランスジェニックマウスの新生児期に BPA などのホルモン様化学物質を暴露し、脳・神経系を中心とした ER 発現部位の変化を詳細に解析することが可能になったことから、発生・発達期の脳が示す高感受性の

作用メカニズムが解明され、さらに脳・神経系への遅発性影響の同定においても、このマウスを組み合わせ、複合的に解析することにより、解析確度の向上が期待できる。

免疫影響評価では AhR を介した免疫反応を中心に検討した。妊娠期には胸腺細胞の AhR を介した T 細胞分化制御機構が存在し、さらにアロマターゼのノックアウトマウスの胸腺細胞における AhR mRNA 発現の亢進からアロマターゼ及び性ホルモンと AhR シグナルがリンクしていることが示唆された。また妊娠期の胸腺組織での T 細胞分化に関与する遺伝子発現の変動がダイオキシン暴露により著しく低下したことは、ダイオキシンが T 細胞分化に極めて重要な遺伝子群の発現に影響を及ぼしていることを示す。すなわち、本研究から妊娠期における胸腺組織での AhR を介した T 細胞分化や機能に関与する遺伝子のエピジェネティックな影響が大きく関与し、ダイオキシンの暴露によりさらにその変動は大きくなることが判明した。

雌性生殖管におけるホルモン応答システムの破綻についての解析では、 β -カテニン活性化マウスの膈上皮細胞に女性ホルモン作用非依存の細胞増殖が誘導され、さらに新生児期 DES 投与マウスの膈上皮基底細胞にも β -カテニンの蓄積を認めたことから、未成熟期のホルモン作用を有する化学物質の暴露によるホルモン応答システムの破綻に Wnt/ β -カテニン経路が関与していることが示唆された。本研究では未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的応答（すなわち遅発性影響）について、女性生殖管をモデルとして、女性ホルモンとその作用をメディエイトするシグナル因子として Pten/PI3K/Akt 及び Wnt/ β -カテニンシグナルの重要性を明らかにした。これらは今後、遅発性影響における、組織レベルでの女性ホルモン受容体の寄与を解析する上で重要な知見である。

遅発性影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析では、低濃度 BPA により発現増加がみられた non-coding RNA の Malat-1 を中心に解析

し、マウス胎児脳において高発現することを確認した。Malat-1 遺伝子の機能解析のために Malat-1 ノックアウトマウス作製を行い、キメラマウスを得たが、germline transmission は確認できていない。さらに Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を用いた解析により、Malat-1 は生体外物質から生体を防御していることが示唆されたことから、今後、低用量 BPA による Malat-1 発現増加の生物学的、毒性学的意義が明らかになり、この遺伝子が遅発性影響の分子標的の 1 つであるか否かが結論できると思われる。

さらに低用量域の BPA あるいは DES を用いた厚生労働省「齧歯類一生涯試験」の検証では性成熟ならびに性周期に遅発性影響がみられず、BPA 投与のみに T 細胞分化への影響が確認された。暴露マウスに抗体産生能の低下はこれまでのところみられていないが、成熟が進行し抗体産生能の低下などが確認されれば、極めて低用量域での内分泌かく乱作用の指標として、免疫学的検査が有効な手段となり得ると期待される。また、大脳皮質の層構造異常など脳・神経系への遅発性影響についても本試験系による検証を行い、確定試験法の確立をめざすとともに、OECD が提唱する延長一世代試験 (TG415) のガイドライン策定にも情報提供ができるものと期待される。

E. 結論

本研究の成果から、周産期低用量暴露が引き起こす脳・神経-内分泌-免疫系に代表される高次生命維持系の組織構築かく乱による不可逆的遅発性影響を、個別の化学物質の毒性の検証に留まらず受容体原性毒性あるいはシグナル毒性として、体系的、総合的、かつ GLP ガイドライン化が可能な評価系の構築が見込まれる。これは従来行なわれてきた各種の毒性試験法による検査の及んでいない影響指標を明示し、この分野の研究に新しい視点を提供するものであり、国内はもとより、OECD 等の国際的なテストガイドライン策定の際の具体的かつ科学的な基盤情報としての大きな意義を有する。

いずれの分担研究も当初計画した研究成果を概ね得たことから、以下に示す結論を導いた。

●胎児期の低用量BPA暴露は、胎児、新生児あるいは成熟個体の脳・神経系に影響を及ぼし、その影響評価法として高感度免疫組織化学的手法と細胞ラベリング法が有用である。

●神経上皮細胞を用いた *in vitro* 実験系は、神経細胞分化への影響評価法の「代替法」として提示できる可能性をもつ。

●ER 遺伝子の発現部位を可視化したマウスの作製が成功したことから、脳・神経系が示す遅発性影響を確度高く検出することが今後可能であるとともに、標的臓器が示す高感受性のメカニズムを明らかにすることが期待できる。

●周産期における AhR を介した免疫反応では、ダイオキシン暴露により著しく低下した胸腺での T 細胞分化に関連する遺伝子発現の分子機構がある程度解明され、これらの成果が今後免疫系への低用量遅発性影響評価系の完成に役立つ。

●遅発性影響の標的分子に関する解析から、子宮、膣など女性生殖管をモデルとして DES など女性ホルモン剤とその作用をメディエイトするシグナル因子を明らかにした。この遅発性影響発現のメカニズムは、組織レベルでの女性ホルモン受容体の寄与を解析する上で重要な知見である。また non-coding RNA の Malat-1 遺伝子が遅発性影響の分子標的の一つであるか否かについて結論することはできないが、生体外物質から生体を防御する役割を持つことが示唆される。

●厚生労働省「嚙歯類一生涯試験法」の検証では、低用量BPAあるいはDESの胎児期、新生児期投与は遅発性影響として性周期と T 細胞分化に異常を示すことを認めた。今後さらに本試験法による遅発性影響を検出するための鋭敏な毒性指標の提案と検証を行い、また短期確定試験などの提案により試験スキームの拡充に協力したい。

本研究成果から、周産期低用量暴露が引き起

こす高次生命維持系の組織構築かく乱による不可逆的遅発性影響について、個別の化学物質の毒性の検証に留まらず体系的かつ総合的な評価系の構築が期待される。また *in vitro* 評価法確立の検討成果ならびに一生涯試験法の検証結果から、厚生労働省「試験スキーム」の拡充の提案も併せて可能と考える。

F. 研究発表 (本研究と深く関連する発表に限定)

1. 論文発表

Nagao T, Kawachi K, Kagawa N, Komada M. Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A. *J Toxicol Sci.* (2014) *in press*

Nishimura Y, Nakai Y, Tanaka A, Nagao T, Fukushima N. Long-term exposure of 3T3 fibroblast cells to endocrine disruptors alters sensitivity to oxidative injury. *Cell Biol Intl* (2014) *in press*

Kagawa N, Saito Y, Nagao T. Early to middle gestational exposure to diethylstilbestrol impairs the development of labyrinth zone in mouse placenta. *Cong Anom* (2014) doi: 10.1111/cga.12031.

Nagao T, Komada M, Kagawa N. Newly developed mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants. *J Appl Toxicol.* (2013) 33:1514-1519

Nagao T, Kagawa N, Saito Y, Komada M. Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *J Appl Toxicol* (2013) 33:1213-1221

Komada M, Asai Y, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology* (2012) 295 (1-3):31-38

Nagao T, Takada N, Onoda N. Transgenerational teratogenesis by prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals. *Genes and Environ.* (2011) 33:50-60

Hotta K, Nashimoto K, Yasumura E, Suzuki M,

- Azuma M, Izumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H and Handa H.
Vesnarinone Suppresses TNF α mRNA Expression by Inhibiting Valosine-Containing Protein. *Mol Pharmacol.* (2013) 83: 930-938
- Kakuta H, Tanaka M, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T and Sato T.
Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Reprod Toxicol.* (2012) 33: 35-44
- Taylor JA, Richter CA, Suzuki A, Watanabe H, Iguchi T, Coser KR, Shioda T, Vom Saal FS.
Dose-related estrogen effects on gene expression in fetal mouse prostate mesenchymal cells. *PLoS One* (2012) 7(10):e48311
- Oura R, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Tanaka E, Hayashi Y, Ishimaru N.
Induction of rapid T cell death and phagocytic activity by Fas-deficient *lpr* macrophages. *J Immunol* (2013) 190:578-585
- Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y.
CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3⁺ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. *Am J Pathol* (2012) 180:199-208
- Watanabe M, Ishimaru N, Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Ichikawa T, Hayashi Y.
A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on nickel allergy in mice. *PLoS One* (2011) 6:e19017
- Miyagawa S, Sato M and Iguchi T.
Molecular mechanisms of induction of persistent changes by estrogenic chemicals on female reproductive tracts and external genitalia. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2011) 127: 51-57
- Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R, Motoyama J, Iguchi T, Nakagata N, Hui CC and Yamada G.
The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology* (2011) 152: 2894-2903
- Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi K-I, Takeuchi T, Iguchi T and Ohta Y.
WNT family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. *Toxicology* (2012) 296:13-19
- Nakajima T, Iguchi T, Sato T.
Hedgehog signaling plays roles in epithelial cell proliferation in the neonatal mouse uterus and vagina. *Cell Tiss. Res.* (2012) 348:239-247
- Guillette LJJr, and Iguchi T.
Life in a contaminated world. *Science* (2012) 337: 1614-1615
- Bergman Å, Heindel JJ, Kidd KA, Jobling S, Zoeller RT, Becher G, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, Brian JV, Kortenkamp A, Muir D, Ochieng R, Skakkebaek NE, Iguchi T, Toppari J and Woodruff TJ.
The impact of endocrine disruption: A consensus statement on the state of the science. *Environ. Health Perspect.* (2013) 121: A104-106
- Bergman Å, Andersson AM, Becher G, van den Berg M, Blumberg B, Bjerregaard P, Bornehag C-G, Bornman R, Brandt I, Brian JV, Casey SC, Fowler PA, Frouin H, Giudice LC, Iguchi T, Hass U, Jobling S, Juu A, Kidd KA, Kortenkamp A, Lind M, Martin OV, Muir D, Ochieng R, Olea N, Norrgren L, Ropstad E, Ross PS, Rudén C, Scheringer M, Skakkebaek NE, Söder O, Sonnenschein C, Soto A, Swan S, Toppari J, Tyler CR, Vandenberg LN, Vinggaard AM, Wiberg K, Zoeller RT.
Science and policy on endocrine disruptors must not be mixed: a reply to a “common sense” intervention by toxicology journal editors. *Environ. Health* (2013) 12, 69
- Katoh T, Hayashi S, Iguchi T and Sato T.
Epithelial-stromal interactions in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo* (2013) 27:333-337
- Miyagawa S, Sato M, Sudo T, Yamada G and Iguchi T.
Unique roles of estrogen-dependent Pten control in epithelial cell homeostasis of mouse vagina. *Oncogene* (2014) *in press*

Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y.

Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone*. (2013) 60C:68-77

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y.

Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci*. (2013) 38:643-654

Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y.

Autoimmune regulator, Aire, is a novel regulator of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*.(2013) 437(4):579-584

Fujimoto, N, Takagi, A, Kanno, J.

Neonatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the mRNA expression of prostatic proteins in C57BL mice. *J Toxicol Sci*. (2013) 38(2):279-283

Fujimoto N, Kitamura S, Kanno J.

Androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94: Involvement of estrogen receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. (2011) 127(3-5):301-306

Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N.

Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*.(2011) 412(2):366-372

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y.

Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. *Biol Reprod*. (2011) 84(4):734-742

Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata T, Ono H.

Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol. *Reprod Toxicol*. (2012) 34(3):323-330

Ohta R, Takagi A, Ohmukai H, Marumo H, Ono A,

Matsushima Y, Inoue T, Ono H, Kanno J.

Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. *J Toxicol Sci*. (2012) 37 (5):879-889

2. 学会発表 (2011~2013)

河内宏太、長尾哲二

低用量ビスフェノール A はマウス大脳皮質異常と新生児行動異常を誘発する 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会 東京、12 月、2013 年

Komada M, Nagao T.

Behavioral abnormalities and neocortical structure anomalies in newborn mice induced by chemical exposure during the embryonic period.

日本先天異常学会 第 53 回学術集会 東京、7 月、2013 年

福嶋伸之、西村侑華、長尾哲二

神経系細胞への低濃度ビスフェノール A の長期曝露は神経分化に影響を及ぼす Neuro2013 京都、6 月、2013 年

大浦律子、新垣理恵子、山田安希子、林良夫、石丸直澄

Fas 分子を介したマクロファージによる末梢 T 細胞の維持機構 第 101 回日本病理学会総会 東京、4 月、2012 年

石丸直澄、山田安希子、新垣理恵子、林良夫

自己免疫疾患における CCR7 を介した制御性 T 細胞のパトローリング機能 第 101 回日本病理学会総会 東京、4 月、2012 年

Akihiko Iwasa, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Eiji Tanaka, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru.

Acritical role of aromatase in the pathogenesis of Sjogren's syndrome.

第 40 回日本免疫学会総会・学術集会千葉、12 月、2011 年

Ritsuko Oura, Rieko Arakaki, Masahiro Hiasa, Akiko Yamada, Eiji Tanaka, Yoshio Hayashi,

Naozumi Ishimaru.

In vivo T cell apoptosis via interaction with CD11b+ macrophages in Fas-deficient host.

第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 千葉、
12 月、2011 年

新垣理恵子、石丸直澄、山田安希子、林良夫
エストロジェン欠乏によって誘導されるシェ
ーグレン症候群病態増強への Th17 細胞の関与
第 100 回日本病理学会総会 横浜、4 月、2011
年

Iguchi T and Kawashima Y.

Endocrine disruptors issues in Japan. 2nd
International Conference on Endocrine Disruptors,
Holiday Inn Frankfurt Airport (Germany), June 7-8,
2011.

井口泰泉、宮川信一

毒性とエピジェネティクス 第 28 回日本医学
会総会 東京、4 月、2011 年

井口泰泉

内分泌かく乱物質の生物影響に関する研究
日本動物学会第 82 回大会 旭川、9 月、2011
年

Miyagawa S, Ohta Y and Iguchi T

Indispensable roles of estrogen receptor α for
persistent vaginal change induced by neonatal
5 α -dihydrotestosterone exposure. Gordon Research
Conferences, Environmental Endocrine Disruptors,
Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA, June
3-8, 2012.

中島忠章、井口泰泉、佐藤友美

胎仔期から成熟期にかけての子宮と膣の分化
におけるレチノイン酸シグナルの役割 第 83
回日本動物学会、大阪、9 月、2012 年

中村 武志、宮川 信一、平川 育美、井口 泰泉、
太田 康彦

新生時期に DES 暴露を受けた成熟マウスの膣
における p21、p53 及び Notch 関連遺伝子の発

現 日本獣医学会 岩手、9 月、2012 年

Iguchi T, Miyagawa S and Ogino Y.

Establishment of transactivation assays using
hormone receptors from various animal species for
screening of environmental chemicals. SETAC
Asia Pacific, Special lecture, Kumamoto, Sept.
24-27, 2012.

Ohta Y, Miyagawa S and Iguchi T.

External genitalia development in male and female
rats given flutamide in utero. SETAC Europe 23rd
Ann. Meet. Glasgow, UK, May 12-16, 2013.

宮川信一、佐藤優、井口泰泉

マウス膣上皮における Pten の役割 第 84 回日
本動物学会 岡山、9 月、2013 年

太田泰彦、村田清香、宮川信一、井口泰泉

妊娠中に投与したフルタミドの雄ラット生殖
輸管系への影響 環境ホルモン学会第 16 回研
究発表会 東京、12 月、2013 年

Jun Kanno, Progress in Japanese Percellome
Project and incorporation of TGP data, 11th
International Conference of Environment
Mutagens (11th ICEM), (2013.11.4), Fos do
Iguassu, Brazil, invited

菅野 純

受容体シグナル毒性としての内分泌かく乱化
学物質の影響について 第 86 回日本内分泌学
会学術総会 仙台、教育講演 (招待)、4 月、
2013 年

Katsuhide Igarashi, Noriko Moriyama, Kentaro
Tanemura, Maki Otsuka, Yusuke Furukawa,
Hirotugu Asano, Kinichi Nakashima and Jun
Kanno, Glucocorticoid Receptor (GR) enhances
the astrocytic differentiation of neural stem cells
via LIF-STAT3-GFAP pathway by a ligand
dependent binding of GR to STAT3 at the STAT3
responsive element of GFAP promoter, 15th
International Congress on Hormonal Steroids and
Hormones & Cancer (2012.11.16) Kanazawa,
poster

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima,

Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Endocrine disruptor as receptor mediated signal toxicity. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer (2012.11.16) Kanazawa, invited

2012-148848、出願日 2012年7月2日 (出願中)

Jun Kanno, Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain." the 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2012.3.15) San Francisco, USA, poster

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343、出願日 2012年7月17日 (出願中)

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純

2. 実用新案登録
なし

中枢神経系の発生-発達期における神経活動かく乱による遅発性中枢影響解析—幼若期雄マウスへのアセフェートによる成熟後の脳高次機能障害について— 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 口演 横浜、7月、2011年

3. その他
なし

種村健太郎、五十嵐勝秀、佐藤英明、菅野 純
発生・発達期のビスフェノールA暴露による遅発中枢影響解析 第29回内分泌代謝学サマーセミナー ポスター 仙台、7月、2011年

太田亮、根倉司、大向英夫、新藤智子
Hatano 高および低回避雌ラットの性成熟、性周期および体重推移に及ぼす新生児期ジエチルスチルベストロール暴露の影響 環境ホルモン学会第16回研究発表会 東京、12月、2013年

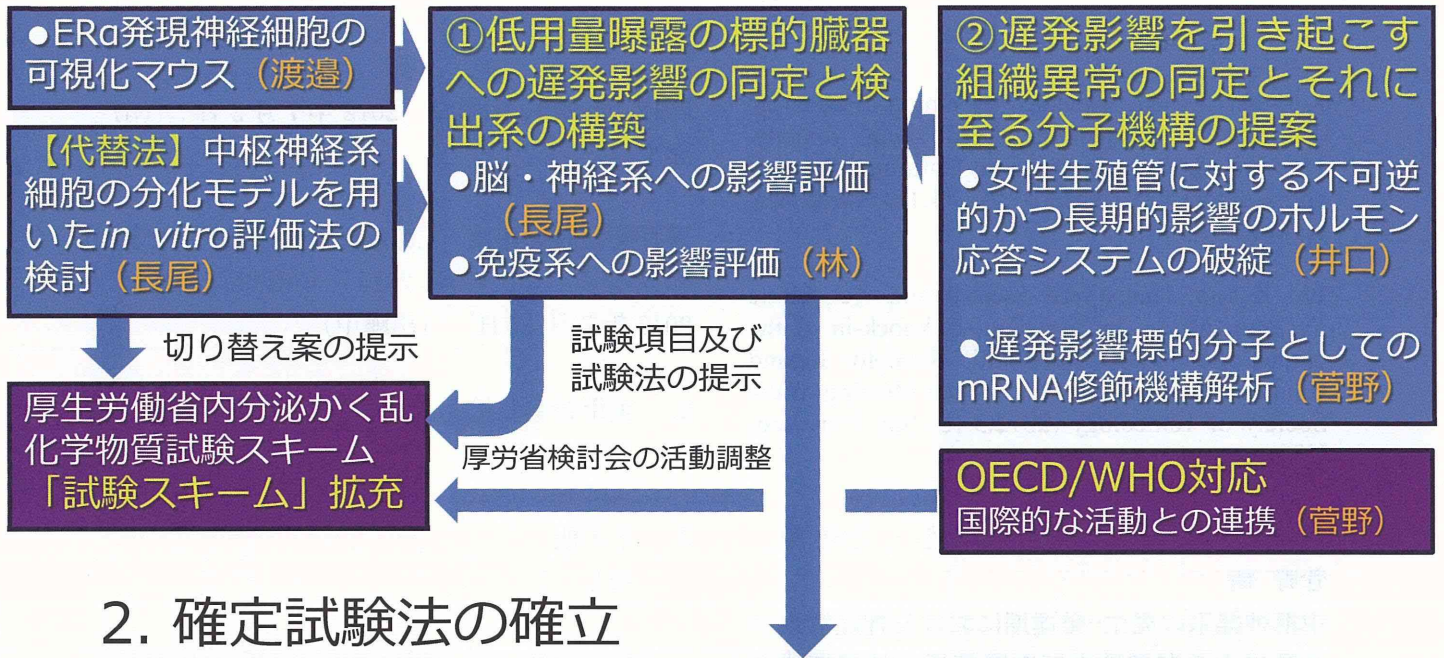
G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

特許第5177712号、2013年1月18日登録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究所、NTTデータ、発明者：菅野純、相崎健一ら、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」特願

1. 「試験スキーム」の網羅性の拡充



2. 確定試験法の確立



図1. 個別の研究テーマの位置づけと、それらを体系的に総括する道筋

本研究課題は、「2つの柱試験スキーム」の網羅性の拡充と確定試験法の確立から構成されている。1つ目の柱では脳・神経系と免疫系を低用量曝露の標的臓器として、その遅発性影響の同定と検出系の構築を目的とした。またエストロゲン受容体発現の神経細胞を可視化したマウスを作製したことから、今後脳・神経系への影響の検出系の精度向上が期待できる。さらに遅発性影響を引き起こす組織異常の同定とそれに至る分子メカニズムを解明し、その成果を検出系の構築に役立てた。2つ目の柱の「確定試験法の確立」では、先行研究において認められた遅発性影響を、「げっ歯類一生涯試験法」により検証し、得られた成果をOECD「延長一世代試験」の完成に生かせるよう、試験項目、指標の観察時期などの提案をする予定である。

研究(H23-化学-一般-002)成果から提示可能なこと

脳・神経系における遅発性影響の同定と発現メカニズム

- ・高感度免疫組織染色と細胞ラベリング法による脳・神経系の発生・発達評価法が有用である。
- ・ER発現部位可視化マウスの作製により脳・神経系が示す低用量遅発性影響を高い確度で検出が可能である。
- ・神経細胞分化への影響評価法の「代替法」を提示できる。

周産期低用量暴露による免疫影響評価

- ・免疫系への低用量遅発性影響評価系の完成に役立つ。

遅発性影響の標的分子とその分子基盤

- ・組織レベルでの女性ホルモン受容体の寄与を解析する上で重要な知見となる。
- ・non-coding RNA遺伝子は生体外物質から生体を防御する役割をもつ。

嚙歯類一生涯試験法の検証

- ・嚙歯類一生涯試験において、性周期、T細胞分化、あるいは体重推移（肥満）は低用量遅発性影響を検出する重要な指標となることを提示できる。
- ・OECD延長一世代試験ガイドライン策定の際の具体的かつ科学的な基盤情報として提供できる。

OECD対応

- ・厚生労働科学研究成果の国外への継続発信と化学物質の低用量遅発性影響などについての情報交換と情報収集ならびに意見交換などの国際貢献が今後も可能である。

試験スキームの網羅性の拡充

確定試験法の確立

図2. 本研究により得られた分担研究成果とそれらから提示できること

本研究の3年間の成果および先行研究の成果から、周産期低用量化学物質が引き起こす脳・神経系、免疫系、生殖器系など高次生命維持系の組織構築かく乱による不可逆的遅発性影響について、個別の化学物質の毒性の検証に留まらず、体系的かつ総合的な評価系の構築が期待できる。また、*in vitro* 評価法確立の検討成果ならびに一生涯試験法の検証結果から、厚生労働省「試験スキーム」の拡充のための提案も併せて可能であると考えられる。

Ⅱ. 分担研究報告書

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)

(平成 23～25 年度) 総合研究報告書

低用量曝露の標的臓器としての脳・神経系への影響評価系の確立

1. 周産期の低用量化学物質曝露による大脳皮質形成異常の解析

研究分担者 長尾哲二 近畿大学理工学部生命科学科 教授
研究協力者 駒田致和 愛知学院大学歯学部 助教

研究要旨：本研究課題では、低用量化学物質の胎児期あるいは新生児期曝露により誘発される大脳皮質形成異常の特に神経新生及び大脳皮質層構造の異常に着目した組織学的検出法の確立を目指した。実験動物を用いた研究から、胎児期低用量ビスフェノール A (BPA) 曝露が神経分化の促進や神経細胞移動の異常を引き起こし、大脳皮質の発生に重篤な異常を引き起こすことが報告されているが、神経幹・前駆細胞の増殖や分化に関する詳細な解析は実施されておらず、表現型や発症メカニズムの解明が必要である。そこで、胎児期の低用量 BPA 曝露による大脳皮質形成への影響を明らかにするために、マウスの妊娠期に連続して BPA を投与して胎児脳の組織学的な解析を行った。特に、神経幹・前駆細胞の数や分布、増殖能や細胞周期の異常に着目して、高感度免疫組織学的手法とチミジン類似物質を用いた細胞のラベリング法を用いて解析を行った。その結果、皮質板の肥厚と神経幹/前駆細胞の減少が観察され、低用量 BPA は、神経幹/前駆細胞の分化するタイミングを早めることで神経新生を促進すると同時に細胞周期の長さが短くなり、結果として増殖能が低下することが明らかになった。さらに 4-ヒドロキシタモキシフェンについても同様の結果を得た。次いで、神経細胞の移動障害など大脳皮質の層構造に着目した解析を行い、layer marker を用いた観察法により新生児の大脳皮質第 6b 層の低形成と birth-date analysis により神経細胞の大脳皮質における分布と数の異常を認めた。これらのことから、免疫組織染色法やチミジン類似物質のラベリング法を用いた観察法が、胎児期及び発達期大脳皮質における神経分化や細胞増殖あるいは層構造ならびに神経細胞移動・分布に対する低用量化学物質曝露の毒性影響を検出する組織学的試験法として有用であることが明らかになった。

A. 研究目的

ヒトは生活環境下において様々な化学物質に接する機会があり、特に胎児期、発達期における曝露が中枢神経系の形態異常、さらには脳機能障害を引き起こすことが報告されている。さらに近年、これまでは毒性学的影響がないとされていた低用

量の化学物質の妊娠期あるいは授乳期母体曝露による出生児の脳機能発達への影響が注目されている。食品などに含まれる化学物質の低用量曝露により誘発される脳の形態学的変化は微細であると考えられるため、その毒性影響をこれまでの毒性試験法により評価することは難しい。そのため、