

研究課題名: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

研究分担者 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 毒性部部長

研究協力者 高木篤也、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 毒性部室長

五十嵐勝秀、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 毒性部室長

安彦行人、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 毒性部主任研究官

研究要旨

これまでの研究で ES/EB(胚様体)培養系において低濃度(1nM)BPA 投与により non-coding RNA の Malat-1 が増加することをマイクロアレイ解析の実験で観察した。Malat-1 遺伝子の機能解析のための CRISPR 法による同遺伝子ノックアウトマウスの作製を行いキメラマウスを得た。Wild 及び CRISPR 法で作製した Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞(KO)に対する BPA の影響解析の結果、Wild に対しては、BPA は添加2日後に EB のサイズを増加させた。マイクロアレイデータのパスウェー解析では2日目に細胞増殖に関連する遺伝子群の増加が認められ、BPA が EB の分化初期に Malat-1 の作用と関連性をもって増殖促進に働いたことが示唆された。この作用は KO には誘発されなかった。他方、KO は BPA 添加8日後に用量依存的な萎縮像が見られた。この作用は Wild に対しては認められないことから、Malat-1 が BPA の毒性に対して防衛的に働いている可能性が示唆された。Malat-1 の上流 9kb、下流 3.6kb を含むルシフェラーゼ・レポーターベクターを構築、ES 細胞に導入し BPA 反応性を検討した結果、抑制傾向が認められた。妊娠期に BPA を投与し、胎生 14 日の胎児を対象に Malat-1 の *in situ* hybridization を実施した結果、本条件下では変化は認められなかった。

A.研究目的

本研究は、胚様体(EB)において、低濃度ビスフェノール-A (BPA)で発現が増加することを見出した non-coding RNA の Malat-1 を中心に解析し、以って、エストロゲン様物質による遅発影響の分子標的としての mRNA 発現修飾機構を明らかにするものである。また、太田研究分担員と共に先行研究で培った「齧歯類一生涯試験法」の検証

研究を並行し、OECD の「拡張一世代試験」の完成を促すとともに、厚労省「試験スキーム」の拡充を提案する。

B.研究方法

1.Malat-1 ノックアウトマウスの作製

Malat-1 発現増加の意義を明らかにするため、Malat-1 ノックアウトマウスの作成

を行った。ターゲティングベクターを構築し、相同組み替え ES 細胞を得た。また、新たに遺伝子 targeting の効率が高いことが知られる CRISPR 法を導入して、ノックアウトマウスの作製を行った(図 1)。

2. Malat-1 欠失 ES 細胞を用いた BPA の影響解析

上記 CRISPR 法によるノックアウトマウス作製過程で得られた Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞に対する BPA の影響を解析した。BPA (1、10、100、1000nM) を DMSO (final 0.1%) に溶解し、LIF を除いた ES 培地に添加した。Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を、最初の 2 日間は天井培養法、次の 6 日間は浮遊培養法にて計 8 日間培養した。培養開始から 2 日間隔で EB を採取し、形態を観察した。

3. Malat-1 遺伝子のプロモーター解析

ゲノム配列データベースから、Malat-1 遺伝子(転写産物コード領域)の上流約 10kb はヒトとマウスの間で保存性が高いことが分かっている。この領域に、BPA に応答して Malat-1 発現を上昇させる制御配列が存在する可能性は高い。Malat-1 遺伝子発現機構解析のため、この上流及び下流域を含むルシフェラーゼ発現ベクターの構築を行い、ES 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを実施した。

4. BPA 暴露マウス胎児における

Malat-1 の *in situ* hybridization 法による発現検索

マウス組織に於る Malat-1 遺伝子発現の高感度検出を Veritas 社の QuantiGene 法を用いて実施した。その結果、胎児の脳組織の核にシグナルが特に強く発現していることを確認した。次いで、長尾哲二研究班班長が実施した実験、即ち、BPA 20、200 μ g/kg を C57BL/6J マウスの妊娠 0~13 日に強制経口投与し、妊娠 14 日に帝王切開により胎児をサンプリングしたものを得た。なお、胎児は雌雄判別し、雄胎児を使用した。同様に BPA を交配開始時から C57BL/6Ncr 妊娠マウスに 0.1、1、10ppm の濃度で飲水投与し(10、100、1000ug/kg BW/day に相当)、胎生 14.5 日の時点で胎児をサンプリングした。これらから得た胎児全身の矢状断組織切片について、Malat-1 probe を用いた *in situ* hybridization を実施した。なお、胎児の雌雄は Y 染色体遺伝子に対する PCR genotyping によって確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、当該施設の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用など苦痛の少ない方法を用いる。

C. 研究結果

1. Malat-1 発現増加の生物学的意味を明らかにするため、Malat-1 ノックアウトマウスの作成を行った。得られた相同組み替え ES 細胞を aggregation し、キメラマウス

スが得られたが、germline transmission は確認出来なかった。そこで、新たに CRIPPR 法を導入し、相同組み替え ES 細胞を得た。このうち 3 クローンを用いて aggregation を行ったが、2 クローンではキメラ率の高いマウスは得られなかった。1 クローンからはキメラ率の高いマウスが得られた。現在、germline transmission を確認中である。

2. Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞 (KO) を用いた BPA の影響解析

培養開始から 2 日間隔で形成された胚葉体 (EB) を採取し、形態を観察した。BPA は添加 2 日後に Wild の ES 細胞の EB のサイズを増加させることが明らかとなった (図 2)。これに関連して、以前に実施したマイクロアレイデータのパスウェー解析では 2 日目に細胞増殖に関連する遺伝子群の減少が認められ、特に、AKAP9、ATRX、CENPE、ESCO1、SMC2、SMC4、WNK など染色体分離に関与する遺伝子が多く含まれていた (図 3、4)。この増加反応は KO には誘発されなかった。他方、KO に対しては BPA 添加 8 日後に用量依存的な萎縮像の増加が見られ (図 5、6)、特に 1000nM BPA 添加群で顕著であった (図 7)。この反応は Wild には見られなかった。

3. Malat-1 遺伝子のプロモーター解析

5' 側 9kb と 3' 側 3.6kb を両方組み込んだルシフェラーゼ reporter を導入した ES 細胞を用いてプロモーター解析を実施した。BPA で活性の低下傾向が認められたが、用量依存性は明らかではな

かった (図 8)。

4. Malat-1 の *in situ* hybridization 法の検討

Veritas 社の QuantiGene 法を用いて BPA を妊娠期に投与した 14 日のマウス雄胎児頭部矢状断面の Malat-1 発現の検討を行った結果、BPA 投与による影響は認められなかった (図 9)。同様に BPA を交配開始時から C57BL/6 妊娠マウスに 0.1、1、10ppm の濃度で飲水投与した (10、100、1000 μ g/kg BW/day に相当する。胎生 14.5 日の時点の胎児において全身を調べた結果、明らかな BPA の影響は認められなかった (data not shown)。

5. 厚労省「試験スキーム」の拡充に関連し、米国 NIEHS における内分泌かく乱化学物質研究費研究班成果発表会にコメンテータとして参加し、情報収集と情報交換を行った。また、OECD の拡張型第一世代繁殖試験をサポートするための TG443 に付随するガイダンスドキュメント 151 (GD151) の内容に関する意見交換を実施した。以上の活動を基盤に、厚労省「試験スキーム」の拡充に関わる厚労省検討会の活動について化学物質安全対策室との調整を開始した。

米国国立環境衛生科学研究所ビスフェノール A 研究費取得者研究会 (NIEHS BPA Grantee Research Meeting) (非公開) (日時: 2013 年 1 月 29 日、30 日、会場: ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク NIEHS 一階講堂) に招待され、米国における内分泌かく乱化学物質、特に低用量問題に関する研究の状況を視察した。ここ数カ月で論文投稿を行う予定の未発表データを中心

に発表とディスカッションが行われた。企画、司会は、Program Officer の Jerry Heindel 氏（元 NIEHS 生殖毒性研究者）。研究内容は大きく、人暴露評価研究（疫学的研究を含む）と、*in vivo* 低用量毒性研究（動物実験を含む）とからなる。

後者は、BPA の周産期暴露（早期暴露）～遅発影響に沿ったプロトコールでの研究が殆ど全てで、これは、我々の進めている方向性と一致していた。メカニズムも、Epigenetics、即ち、DNA メチル化、ヒストンアセチル化などの DNA 修飾にその機構を求めている点も同一である。用量は、前立腺などは BPA 1~10 μ g/kg 体重付近での有害性の報告が中心。この濃度は、ER α を介したシグナル毒性として計算上容易に想定される用量域である。成熟個体に対する生殖毒性などは更に上の用量で有害影響を観測している。ただし、シグナル毒性という観点からの一般化は遅れている印象があり、標的によりなぜ用量域が違うのかという、シグナル毒性の概念からは自明と思われる論議が行われていた。現象論のみの論議から脱し、Epigenetics に関わる物証を伴って評価できるところに来たところであるという認識は共通している。逆に言うと、受容体の同定の段階がスキップされていて、投与と有害事象発現を繋ぐ遺伝子発現制御に目が向いている結果である。この部分については、我々の方が理論的には綺麗に研究を進めているところである。

使用している技術の項目は、高速シークエンサーによる DNA メチル化測定、プロモーターチップなど各種新チップ使用、そこから IPA など有料インフォマティクスサイトの情報から絞り込んで、Bisulfite 法でメチル化部位確定、等、我々と同等であるが、量的に米国に先を越されていた。論議

の中で、「BPA を測定できない（尿など）のに、影響が明らかに表れること」があると複数の研究者が指摘。尚、BPA の標的は多岐にわたり、乳腺、前立腺、中枢神経、その他、心血管系、肥満・代謝病、免疫（喘息）まで及ぶ。

暴露の方は、症例数は少ないものの、胎児肝を直接測ったり、ボランティアによる PK、尿、血清の測定など。暴露源のひとつに、感熱紙（スーパーなどのレジの紙：日本では非使用）からの経皮、間接経口暴露が一つのトピックになっていた（感熱紙に BPA や代替の Bisphenol S のモノマーが顔色剤として大量に塗布されている）。

日本で、OECD 等、国際的な対応を取るには、エピジェネティクス研究と、それによる網羅的な標的受容体同定（明らかに、エストラジオールと違う作用がある、また、代替品の BPS や BPF が異なった標的を持つことが想定されている）の研究の組織的な推進が必要であろう。

D. 考察

Malat-1 ノックアウトマウス作製のために新たに CRISPR 法を導入し、効率よく相同組み替え体を得ることに成功した。現在、キメラマウスが生まれ germline transmission を確認中である。

Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を用いた BPA の影響解析の結果、Wild において BPA は添加 2 日後に EB のサイズを増加させた。マイクロアレイデータのパスウェー解析では 2 日目に細胞増殖に関連する遺伝子群の増加が認められ、特に、AKAP9、ATRX、CENPE、ESCO1、SMC2、SMC4、WNK など染色体分離に関

与する遺伝子が多く含まれていた。このことから、BPAがEBの分化初期に増殖促進に働いたことが示唆された。また、BPA添加8日後にはMalat-1ホモ欠失EBで用量依存的に萎縮している様な像が見られた。一方、WildのEBではそのような変化は認められなかったことから、Malat-1がBPAの毒性に対して防御的に働いている可能性が示唆された。これに関しては、現在遺伝子レベルでの解析を進めている。

5'側9kbと3'側3.6kbを両方組み込んだreporterを導入したES細胞を用いてプロモーター解析を実施した結果、BPAで活性の低下傾向が認められたが、用量依存性は明らかではなかった(図8)。これまでにEBの系ではMalat-1の発現は増加していた。相反する結果の可能性として今回使用したゲノム上にはBPAに反応する領域が含まれていなかったことが考えられた。一方、EBでのMalat-1の増加はRNA分解の抑制など遺伝子の転写増加によらない機序である可能性も考えられた。今後さらに検討する必要がある。BPAを妊娠期に投与した14日のマウス雄胎児頭部矢状断面のmalat-1発現の検討を行った結果、BPA投与による影響は認められなかった。同様にBPAを交配開始時からC57BL/6妊娠マウスに0.1、1、10ppmの濃度で飲水投与した胎生14.5日の時点の胎児において全身を調べた結果、明らかなBPAの影響は認められなかった。EBの系では分化開始1日目よりBPAによりMalat-1は増加しており、より早期の胎児で今後検索を進める。

E. 結論

CRISPR法による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。Malat-1ホモ欠失ES細胞を用いた解析からMalat-1はBPAに対し防御的に働いている可能性が示唆された。Malat-1の上流9kb、下流3.6kbを含むレポーターベクターを構築、ES細胞に導入しBPAによる反応性を検討した結果、減少傾向が認められた。妊娠中にBPAを投与し、胎生14日の胎児を対象にMalat-1の*in situ* hybridizationを実施した結果、本条件下では変化は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.doi: 10.1016/j.bone.2013.12.005. [Epub ahead of print]

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(4):643-54.
- 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):579-84.
- Takahashi Y, Yasuhiko Y, Takahashi J, Takada S, Johnson RL, Saga Y, Kanno J, Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo. *Dev Biol.* 2013 380(2):172-84. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.05.020.
- 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):279-83.
- Okubo Y, Sugawara T, Abe-Koduka N, Kanno J, Kimura A, Saga Y, Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans-repression of Notch signalling. *Nat Commun.* 2012 3:1141. doi: 10.1038/ncomms2133.
- 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 Oct;37(5):879-89.
- Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S., GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature.* 2011 Nov 27. doi: 10.1038/nature10656.
- 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 Nov;127(3-5):301-6.
- 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 Aug 26;412(2):366-72.
- Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S., PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B., *Nat Cell Biol.* 2011 Jun;13(6):668-75.

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 Apr;84(4):734-42.

2. 学会発表

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

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics, A Quantitative and Comprehensive Approach for Basic and Applied Toxicology. ICT2013 The XIII International Congress of Toxicology, (2013.7.2), Seoul, Korea, distinguished lecture

菅野 純、"Percellome Project ケミカルバイオロジーの視点からのトキシコゲノミクス—Percellome Project の進捗とその応用性—", 第 40 回日本毒性学会学術年会、(2013.6.18)、千葉、シンポジウム

菅野 純、網羅的絶対量化遺伝子発現解析による外来物質生体影響の動的ネットワークマーカー描出:Percellome Project、第 102 回日本病理学会総会、(2013.6.7)、札幌、シンポジウム

Jun Kanno, Percellome toxicogenomics for more comprehensive and quantitative

toxicology-extending the analysis among different organs and different species, the workshop on Moving Forward in Human Cancer Risk Assessment in the Genomics Era 2.0, (2013.5.16), Paris, France, 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、(2013. 4. 26)、仙台、教育講演 (招待)

Katsuhide Igarashi, Noriko Moriyama, Kentaro Tanemura, Maki Otsuka, Yusuke Furukawa, Hirotsugu 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 Homones & 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

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

該当なし

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、パーセローム(Percellome)法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、第 34 回日本高血圧学会総会 SHR 学会合同シンポジウム(2011.10.22) (宇都宮)、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、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 (2011.7.13) (横浜)、口演

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 (2011.7.8) (仙台)、ポスター

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

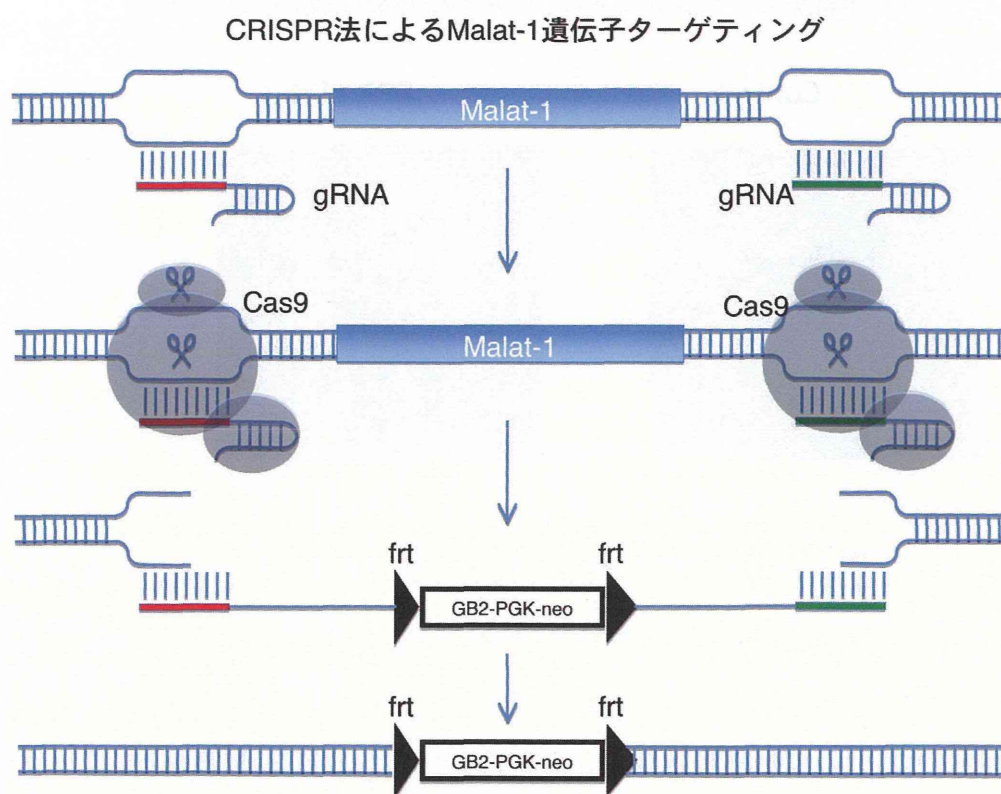


図 1. 標的 DNA 結合ガイド RNA (gRNA) とエンドヌクレアーゼ Cas9 により Malat-1 遺伝子部分をネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより完全に欠損させる。さらに、導入されたネオマイシン耐性遺伝子も最終的に DNA 組み替え酵素にて除去される。

Wild ES細胞から形成されたEBの実体顕微鏡写真 (2d)

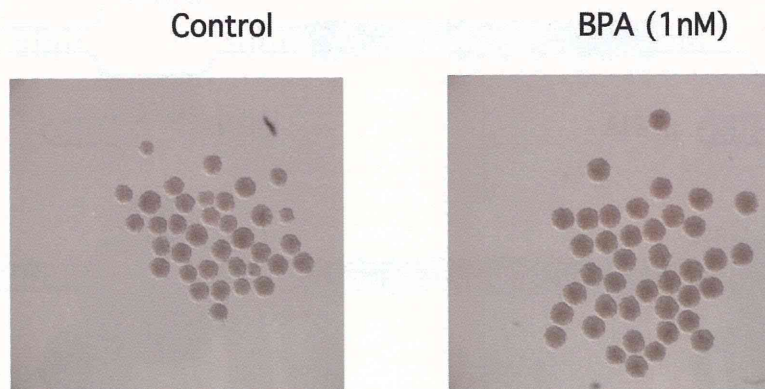


図 2. Wild ES 細胞から天井培養開始 2 日後に形成された EB の実体顕微鏡写真
1nM の BPA 添加によりサイズが増大している。

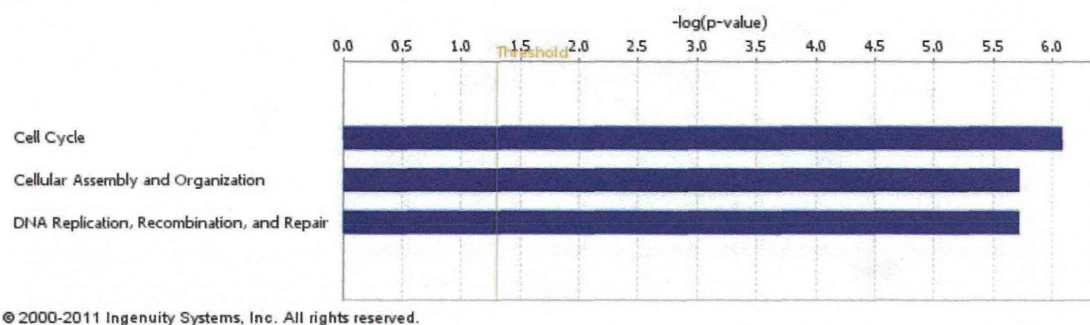
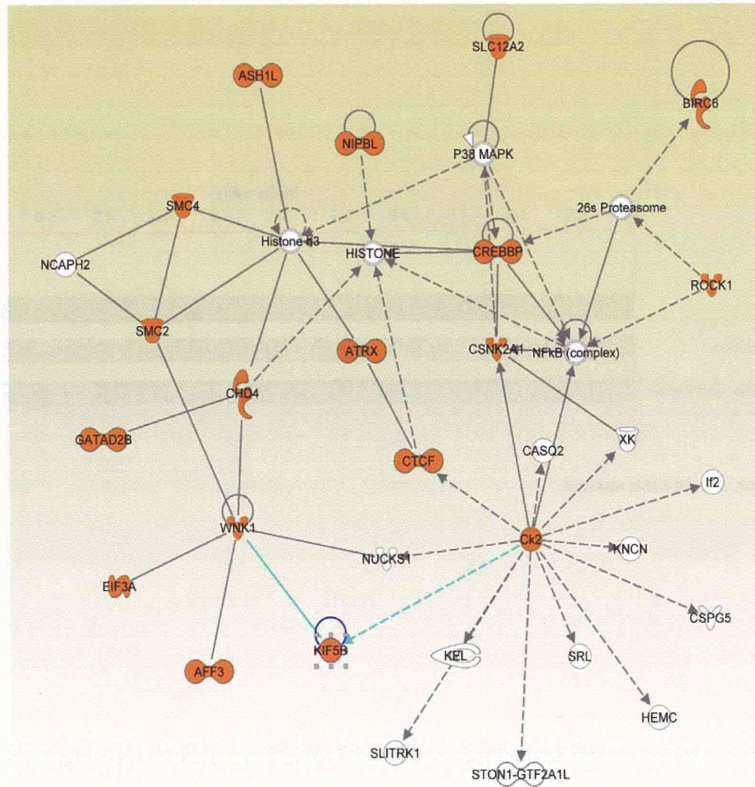


図 3. Wild ES 細胞に 1nM の BPA 添加 2 日後に形成された EB の増加遺伝子をパスウェー
ー解析した結果細胞増殖、DNA 複製に関するパスウェーが抽出された。



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 4. Wild ES 細胞に 1nM の BPA 添加 2 日後に形成された EB の増加遺伝子をパスウェー
一解析 (続き)

個別の遺伝子の関連を検索した結果、AKAP9、ATRX、CENPE、ESCO1、SMC2、SMC4、
WNK など染色体分離に関与する遺伝子が多く含まれていた。

Wild EBの実体顕微鏡写真 (8d)

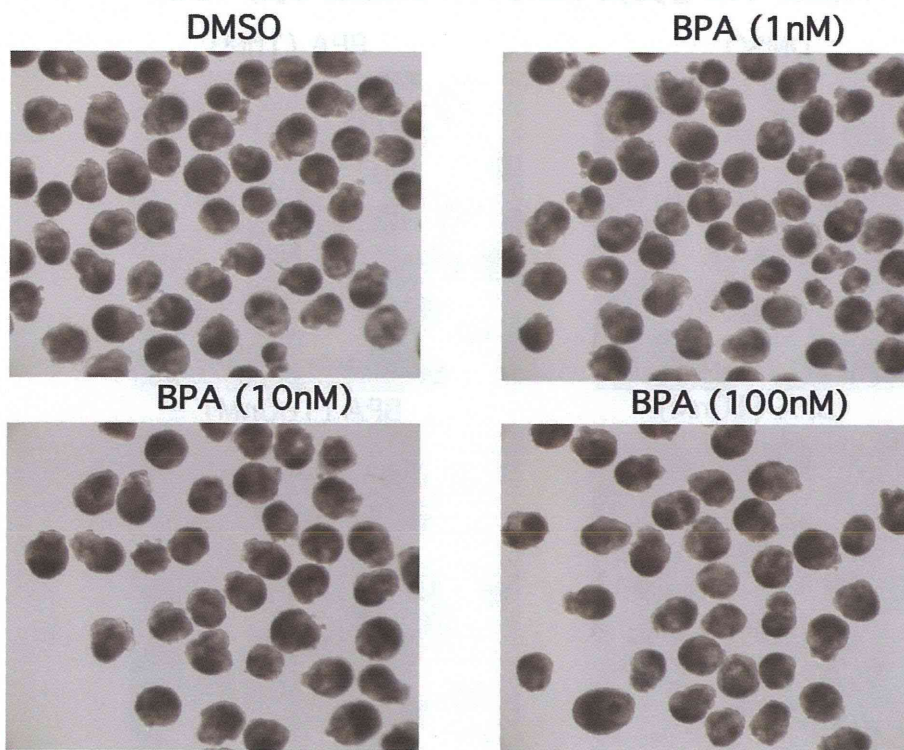


図 5. BPA 添加 8 日後の Wild EB の実体顕微鏡写真

Malat-1 ホモ欠失 EB の実体顕微鏡写真 (8d)

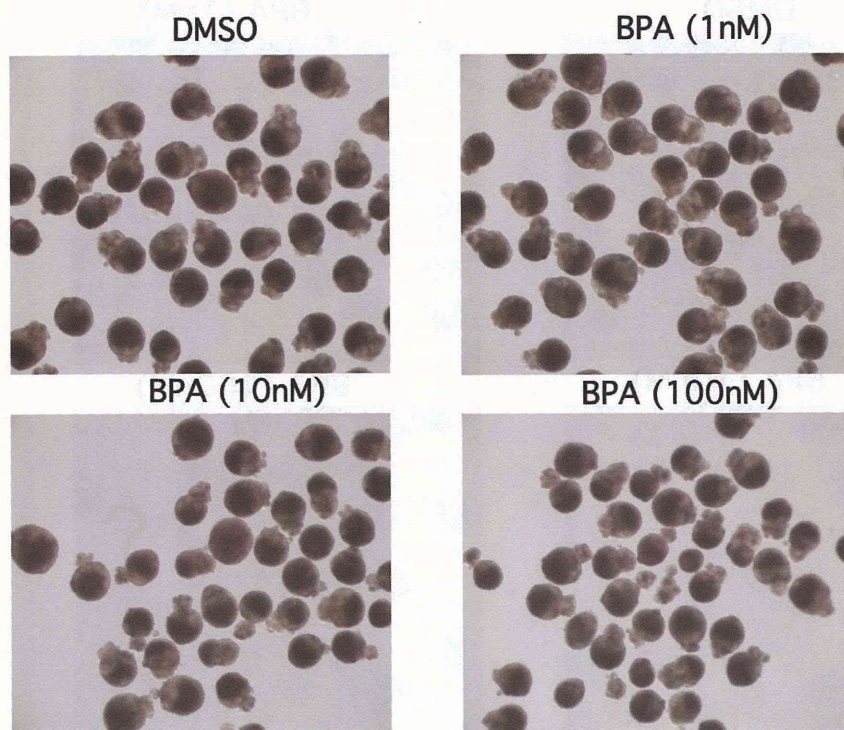
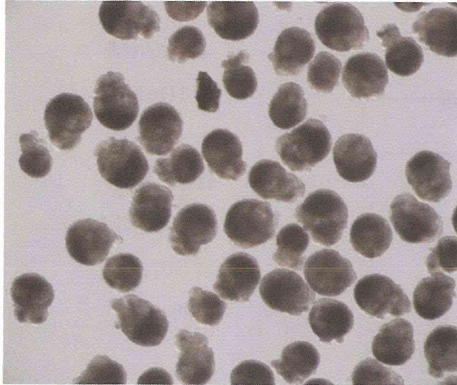


図 6. BPA 添加 8 日後の Malat-1 ホモ欠失 EB の実体顕微鏡写真

1000nM BPA添加8日後のEBの実体顕微鏡写真

Wild



Malat-1ホモ欠失



図 7. 1000nM BPA 添加 8 日後の Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 EB の実体顕微鏡写真

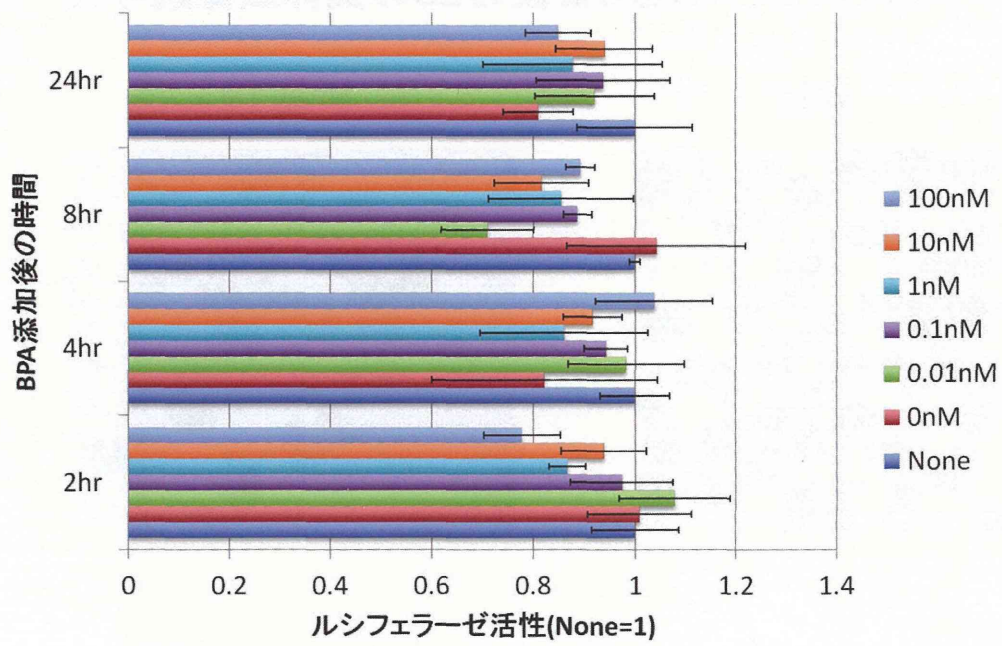


図 8. BPA 添加 ES 細胞を用いた Malat-1 遺伝子発現のルシフェラーゼアッセイ結果

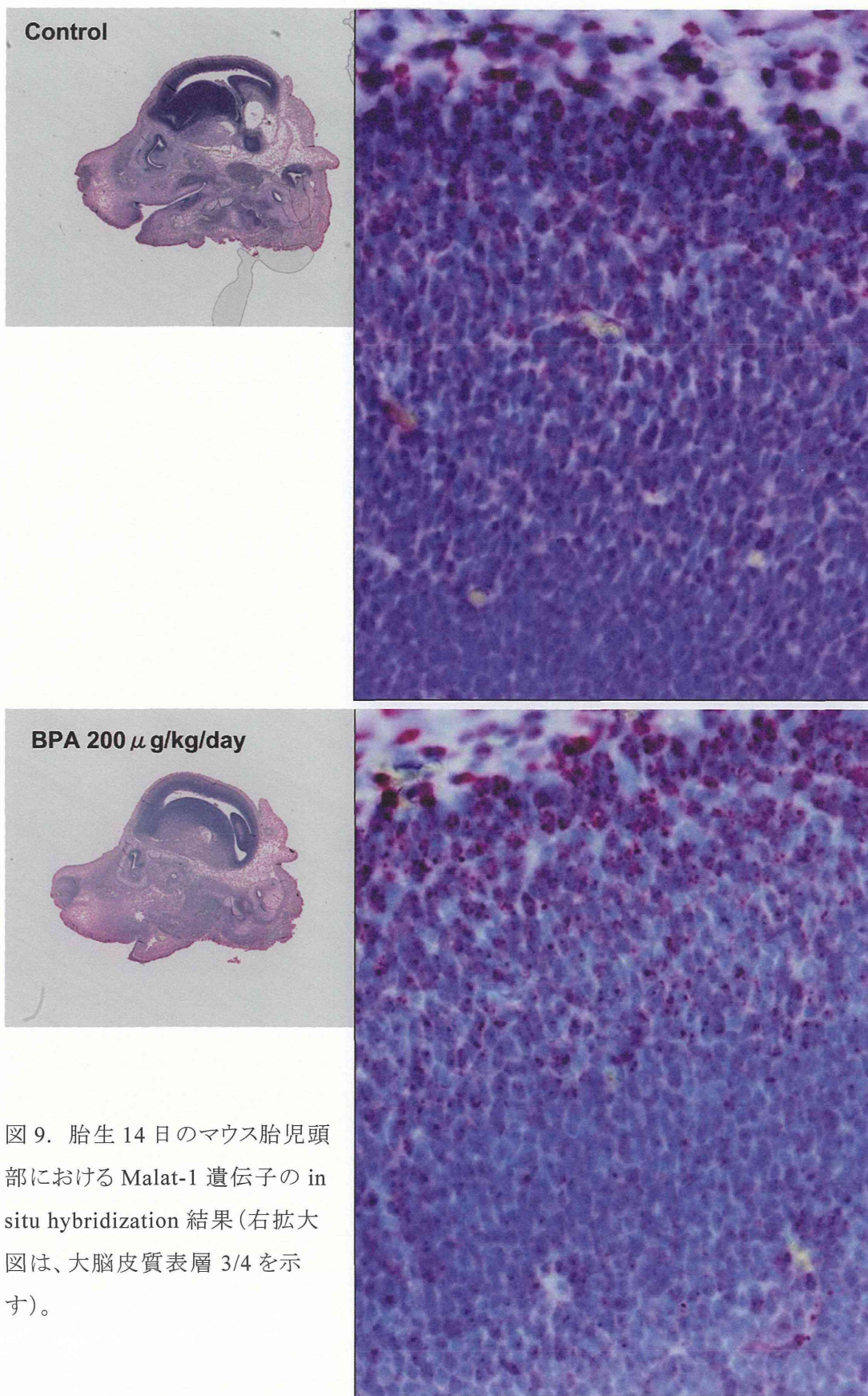


図9. 胎生14日のマウス胎児頭部における Malat-1 遺伝子の in situ hybridization 結果(右拡大図は、大脳皮質表層 3/4 を示す)。

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

-げっ歯類一生涯試験の検証-

研究分担者 太田亮 一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部長

研究協力者 根倉司、大向英夫、新藤智子 一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

子どもの発達期における化学物質の低用量暴露が成長後の性周期および免疫機能に及ぼす遅発影響を検証するため、5 または 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のビスフェノール A (BPA) あるいは 0.02 または 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のジエチルstilbestロール (DES) を C56BL/6J マウスの新生児期に強制経口投与し、性周期および免疫機能を検査した。その結果、遅発性の性周期異常はいずれの投与群においても観察されなかったが、BPA 投与群の雌マウスに T 細胞分化への影響を示唆する変化が観察された。次に、視床下部-下垂体-性腺軸の反応性が異なる近交系 (HAA および LAA) ラットを用いて、0.05 あるいは 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DES を新生児期に強制経口投与し、雌児の性成熟、体重、性周期、学習能力、握力の検査ならびに内分泌系器官の重量を測定した。その結果、膣開口時期の早期化および体重推移の上昇が LAA ラットの 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の DES 投与群で認められた。また、性周期異常、下垂体および副腎の重量増加は HAA および LAA ラットとも 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で認められたが、回避学習能および握力への影響は HAA および LAA ラットとも認められなかった。

以上の結果から、新生児期化学物質暴露の影響は性成熟、体重推移、性周期、免疫機能および内分泌系の器官重量にみられ、性成熟および体重への影響は遺伝的要因が関与することが示唆された。

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おり、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に、これまで「齧歯類一生涯試験法」により見出された性周期、

免疫機能、体重などにおける遅発影響の再現性を確認する実験を試みた。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

【実験 1】投与物質は、ビスフェノール A (関東化学工業株式会社) およびジエチルstilbestロール (シグマアルドリッチジャパン社) を用いた。日本チャールス・リバー社から入手した C57BL/6J マウスを温度 21.0～25.0°C、湿度 40.0～75.0%、明暗サイクル 7 時点灯、19 時消灯の条件下で、床敷としてペパークリー

ン(日本エスエルシー社)を入れたTPX樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm)に収容した。固型Phytoestrogen-low diet (PLD)および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させた。全ての実験操作は、「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」に基づき実施した(動物実験承認番号:1110278A)。投与量、群構成は以下の通りで、生後1~5日まで1日1回、マイクロシリンジおよび新生児用胃管を用いて、投与物質を強制的に経口投与した。

投与物質	投与量(μg/kg)	投与容量(mL/kg)	濃度(μg/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

哺育1~5(毎日)、7、14、21日に哺育児重量を測定し、同腹児数の調整は実施しなかった。哺育21日に母動物から全哺育児を離乳させ、一般状態、体重測定、性成熟(膣開口、包皮分離)を観察し、24週齢から2週間間隔で連日2週間、膣スミア標本を作製し、49週齢まで性周期を観察した。さらに14および50週齢の各時期に、雌雄とも6匹以上/群について、ヒツジ赤血球(SRBC)を静脈内投与し、血中のSRBC抗体価を測定した。また、14および50週齢の各時期に、雌雄とも6匹以上/群について、胸腺および脾臓の重量測定、イムノフェノタイピング、リンパ球幼若化反応、白血球数およびサイトカイン測定を行った。

【実験2】投与物質は、ジエチルスチルベストロール(シグマアルドリッチジャパン社)を用いた。食品薬品安全センターで自家繁殖しているHAA/FDSCラット、LAA/FDSCラットを温度21.0~25.0℃、湿度40.0~75.0%、明暗サイクル7時点灯、19時消灯の条件下で、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー社)を入れたラット用繁殖ケージ(350W×400D×180H mm)に収容した。固型CE-2(通常飼料)および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させた。全ての実験操作は、「一般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」に基づき実施した(動物実験承認番号:1120312A)。投与量および群構成は以下の通りで、生後1~5日まで1日1回、マイクロシリンジおよび新生児用胃管を用いて、投与物質を強制的に経口投与した。

系統	投与物質	投与量(μg/kg)	投与容量(mL/kg)
HAA	コーン油	0	10
HAA	DES	0.05	10
HAA	DES	0.5	10
LAA	コーン油	0	10
LAA	DES	0.05	10
LAA	DES	0.5	10

哺育1~5(毎日)、7、14、21日に哺育児体重を測定し、哺育1日に同腹児数を最大でも10匹を超えないように調整した。哺育22日に母動物から雌児のみを離乳させ、一般状態、体重測定、性成熟(膣開口)を観察し、8週齢から2週間間隔で連日2週間、膣スミア標本を作製し、37週齢まで性周期を観察した。さらに、49または50週齢時に、シャトルボックス能動的回避反応装置を用いて学習試験を実施した。また、50週齢時にラット・マウス用握力測定装置を用いて握力測定を実施した。52週齢に下垂体、副腎および卵巣の重量を測定した。

C. 研究結果

【実験1】雌の膣開口および雄の陰茎包皮分離の時期に、対照群とBPAあるいはDES投与群との間で有意差は認められなかった。28週齢以降の体重については、BPAおよびDES投与群の雄マウスに体重増加抑制、雌マウスに体重増加傾向が観察された。24週齢~49週齢まで実施した性周期観察(**Fig.1**)では、BPAあるいはDES投与の影響を示唆する変化は認められなかった。14週齢で実施した免疫学検査では、BPA投与群の雌マウスに胸腺細胞のT細胞分化への影響が示唆されたが(**Fig.2**)、DES投与群には同様の変化は認められなかった。

【実験2】性成熟の観察(**Fig.3**)では、0.05 μg/kg以上を投与したLAAラットの膣開口時期が同系統の対照群と比較して有意に早まった。HAAラットでは膣開口の時期にDES投与の影響は認められなかった。体重測定

(Fig.4)では、0.05 および 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の LAA ラットの体重が同系統の対照群より高値を示したが、HAA ラットの体重推移には、DES 投与の影響はみられなかった。性周期の観察 (Fig.5) では、性周期異常が HAA ラットおよび LAA ラットとも 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で認められた。能動的回避学習試験および握力測定では、両系統とも DES 投与の影響は認められなかった。器官重量の測定 (Fig.6) では、下垂体および副腎重量の有意な増加が、HAA および LAA ラットとも 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で認められた。

D. 考察・結論

【実験 1】子どもの発達期における低用量暴露が、成長後の性周期、免疫機能、体重推移などに及ぼす遅発影響を検証するために、実験 1 では 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た。その結果、BPA および DES 投与群の雌マウスに遅発性の体重増加傾向が観察され、BPA および DES 投与群の雄マウスに遅発性の体重増加抑制がみられた。以前に実施した 0.005~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DES を用いたマウス一生涯試験でも、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群の雌マウスに明らかかな体重増加が観察されていることから、新生児期の化学物質暴露は、成長後の体重推移に影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、今回の実験では 24 週齢~49 週齢までの性周期観察において、BPA あるいは DES 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。したがって、今回使用した被験物質の濃度では、性周期に遅発性影響を及ぼさないと推察された。以前に実施した DES を用いたマウス一生涯試験では IgM 抗体産生能が用量依存的に低下し、免疫機能への影響が示唆されているが、今回の免疫学検査においては DES 投与の影響は認められなかった。しかし、BPA 投与群では、14 週齢の雌マウスに T 細胞分化への影響が示唆されたことから、DES とは機序の異なる影響が、免疫機能に及んでいるものと推察された。

【実験 2】子どもの発達期における化学物質の低用量暴露が、成長後の性成熟、性周期、体重推移、学習能に及ぼす影響と遺伝的要因の関与を明らかにするために、0.05 または 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DES を HAA および LAA ラット

の新生児期に強制経口投与した。その結果、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の HAA および LAA ラットに遅発性の性周期異常が観察された。以前に実施した 0.05~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DES を SD ラットに経口投与した一生涯試験でも、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雌ラットに遅発性の性周期異常が観察されていることから、新生児期の DES 暴露により誘発される性周期異常は、ラットの遺伝的要因に関係なく発現する変化と推察された。一方、LAA ラットの 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群に体重増加が観察されたが、DES を投与した SD ラットや HAA ラットでは体重増加が認められていないことから、新生児期 DES 暴露の体重への影響は、遺伝的要因に左右され易いものと推察された。今回の研究では性成熟の観察において、LAA ラットにのみ DES 投与による早熟が認められた。したがって、DES 暴露の性成熟への影響も、遺伝的要因に左右されるものと考えられ、HPG 軸の発達の違いに依存するものと推定された。能動的回避学習試験および握力測定では、両系統とも DES 投与の影響は認められなかったことから、本研究で用いた DES の用量では、学習能および筋力への影響はないものと考えられる。その他、下垂体および副腎の重量増加が、HAA および LAA ラットとも 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で認められた。以前実施した 0.05~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DES を SD ラットに投与した一生涯試験においても、下垂体の重量増加が 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、副腎の重量増加が 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で観察されていることから、内分泌系の器官重量は、化学物質の低用量影響を評価する上で有用な指標の一つになると考えられた。

G. 発表論文、学会発表

1. 論文発表

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)

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. 34:323-330. (2012)

Ohta R, Takagi A, Ohmukai H, Marumo H, Ono A, Matsushima Y, Inoue T, Ono H, Kanno J.