

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第119号
NIES Research Project Report, No.119

SR - 119 - 2016

小児・次世代環境保健研究プログラム (先導研究プログラム)

Research Program on Environmental Health for Children
and Future Generations

平成23～27年度
FY2011～2015

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES
<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第 119 号

NIES Research Project Report, No.119

SR - 119 - 2016

小児・次世代環境保健研究プログラム (先導研究プログラム)

Research Program on Environmental Health for Children
and Future Generations

平成 23 ～ 27 年度

FY2011 ～ 2015

国立研究開発法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/>

先導研究プログラム「小児・次世代環境保健研究プログラム」

(期間：平成 23 ～ 27 年度)

プログラム総括：新田裕史（平成 23 ～ 26 年度）

野原恵子（平成 27 年度）

執 筆 者：中山祥嗣、山崎 新、磯部友彦、道川武紘、竹内文乃、野原恵子、前川文彦、
鈴木武博、岡村和幸、小池英子、柳澤利枝、Tin-Tin-Win-Shwe

編 者：中山祥嗣

序

本報告書は、平成 23～27 年度の 5 年間にわたって実施した先導研究プログラム「小児・次世代環境保健研究プログラム」の研究成果を取りまとめたものです。

「小児・次世代環境保健研究プログラム」は、環境要因と子どもの健康との関連性について、健康影響メカニズムを解明することにより疫学知見に生物学的妥当性を与え、また莫大な数に上る化学物質や健康影響の中から疫学研究で検討すべき対象物質や影響指標を提案することを目的として実施しました。以下の課題についての研究を通じ、大規模疫学調査との連携的研究を実施しました。

1. 化学物質の曝露評価モデルの開発及びヒト試料中化学物質の多成分一斉分析法の開発により、疫学研究に適用可能な総合的な曝露評価システムを確立する。
2. 小児の成長・発達を考慮した疫学的健康影響評価手法及び生物統計手法の高度化を行う。
3. 化学物質の胎児期・幼児期曝露が主要な生体機能に及ぼす影響とそのメカニズムを、ゲノムやエピゲノムの解析を通して明らかにする。
4. 小児期の化学物質の免疫・アレルギー疾患への影響を疾患モデル動物及び細胞を用いて解明する。
5. 簡易スクリーニングから詳細評価につながる体系的な評価システムを構築することにより、優先的に調査すべき対象物質やバイオマーカーを提案する。

本研究プログラムによって得られた成果は、当研究所が中心的機関（コアセンター）として実施する大規模疫学研究「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」に応用されています。また、エコチル調査で得られた成果と足し合わせることで、有害な環境因子から、現在の子どもたちと将来の世代の健康を守る政策立案に貢献できると期待しています。

最後に、研究を進める上で、大学、自治体、民間研究機関やその他多くの方々にご協力やご助言を頂きました。ここに感謝の意を表すとともに、引き続きご支援を賜りますようお願いする次第です。

平成 28 年 11 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

理事長 住 明 正

目 次

1 研究プログラムの概要	1
1.1 研究プログラム全体の構成	1
1.2 研究の概要	1
2 研究の成果	3
2.1 化学物質曝露による健康影響評価に係る 疫学調査手法の高度化に関わる研究（プロジェクト1）	3
2.1.1 日本人就学前小児の食事摂取量に関する研究	3
2.1.2 大規模疫学調査で必要な、超高感度、高速、低価格分析法の開発に関する研究	4
2.1.3 疫学調査手法・解析手法の高度化に関する研究	6
2.2 化学物質曝露による小児・次世代への健康影響の機構解明と 評価システムの構築に関する研究（プロジェクト2）	12
2.2.1 化学物質によって次世代に継承される健康影響とエピジェネティック変化の解明	12
2.2.2 無機ヒ素の発達神経毒性影響評価	26
2.2.3 環境汚染物質の免疫・アレルギーに及ぼす影響に関する作用機構の解明	35
[資 料]	
1 研究の組織と研究課題の構成	49
1.1 研究の組織	49
1.2 研究課題と担当者	50
2 研究成果発表一覧	51
2.1 誌上発表	51
2.2 口頭発表	54

1 研究プログラムの概要

1.1 研究プログラム全体の構成

国立環境研究所は、環境省事業である「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」において、調査実施主体（コアセンター）として参画し、メディカルサポートセンター及び全国15ユニットセンターとともに調査を実施している。エコチル調査は、胎児期及び小児期の様々な環境要因への曝露が子どもの健康に及ぼす影響を調査するコホート研究である。

本プログラムは、エコチル調査から得られると考えられる環境要因と子どもの健康との関連性に関する多くの知見に加えて、健康影響メカニズムを解明することにより、疫学知見に生物学的妥当性を与え、また莫大な数に上る化学物質や健康影響の中から疫学研究で検討すべき対象物質や影響指標を提案するなど、これを相補・補完する研究をあわせて推進することを目的とする。具体的には、以下の二つのプロジェクト研究を通じて、大規模疫学調査との連携的研究を実施した。

プロジェクト1：化学物質曝露による健康影響評価に係る疫学調査手法の高度化に関わる研究

目標：様々な要因を考慮した化学物質の曝露評価モデルの開発及びヒト試料中化学物質の多成分一斉分析法の開発により、疫学研究に適用可能な総合的な曝露評価システムを確立し、より効率的で精度の高い曝露評価を可能とする。さらに、小児の成長・発達を考慮した疫学的健康影響評価手法及び生物統計手法の高度化を行うとともに、実際の疫学研究への適用により得られた知見を予防等の施策に反映する。

プロジェクト2：化学物質曝露による小児・次世代への健康影響の機構解明と評価システムの構築に関する研究

目標：化学物質の胎児期・幼児期曝露が主要な生体機能に及ぼす影響と、影響に伴うジェネティック、エピジェネティックな変化、およびそれらの生体影響への寄与と誘導メカニズムを明らかにすることによって、化学物質の発達期曝露の小児・次世代健康影響に生物学的根拠を与える。また、小児・次世代を主対象に、化学物質の免疫・アレルギー疾患への影響を疾患モデル動物及び細胞を用いて解明する。また、簡易スクリーニングから詳細評価に繋がる体系的な評価システムを構築することにより、優先的に調査すべき対象物質やバイオマーカーを提案する。

1.2 研究の概要

プロジェクト1においては、食事由来の化学物質曝露推計のための食事調査票開発、大規模疫学調査で使用可能なハイスループットかつ安価な曝露評価方法の開発及び曝露の経時変化および曝露間の関連（経過的な曝露（繰り返し曝露）や部分的に中間変数の扱いとなるような曝露）を考慮した統計解析方法の開発を行った。食事調査では、より精度の高い食事調査票開発に利用可能なデータを食事記録法により収集した。分析法開発では、主にバイオマーカーを用いた曝露測定法を開発し、試料前処理の自動化、試料大量注入法などを開発し、高感度、ハイスループットかつ比較的安価な分析法を開発し、エコチル調査での応用を行った。統計解析手法開発においては、周辺構造モデルを活用（応用）する方法（主要曝露要因と主要アウトカムの関連性を直接効果と他の要因を介した間接効果に分けて算出できるもの）を実際のコホート研究に適用し、従来の方法（線形回帰分析）では検出できなかった関連性を検出した。

プロジェクト2においては、化学物質曝露の影響に主眼を置き、実験的研究によって化学物質の発達期（胎児期、乳児期、小児期）曝露の生体影響の評価およびその作用機構を明らかにすることを目的とし、胎児期曝露の子世代やさらに孫世代への影響に関する研究及び若齢期化学物質曝露によるアレルギー性喘息における免疫系、脳神経系への影響に関する研究を実施した。前者として、化学物質の中でも早い時期からエピジェネティック作用をもつことが報告されてきた無機ヒ素を対象として、その胎児期曝露が子世代やさらに孫世代の発癌増加に及ぼす影響の検出や分子メカニズム

の解析及び無機ヒ素の免疫系への影響と分子メカニズムの解明研究をマウスの実験系で行った。また化学物質に対する脆弱性が高い発達期の脳に着目し、無機ヒ素曝露の影響を *in vivo*、*in vitro* の両面から解析し、影響メカニズムの分子基盤の解明を試みた。後者としては、アレルギー性喘息モデルマウスを用いて、ベンゾ [a] ピレン (BaP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジイソノニル (DINP)、ビスフェノール (BPA) の若齢期曝露による影響を評価した。その結果、DEHP および DINP の影響は軽微であったが、BaP および BPA 曝露では、肺炎症や炎症病態に並行した縦隔リンパ節細胞の活性化と Th2 反応の亢進を認めた。また、BaP の乳児期曝露は、仔のアレルギー性喘息に対して軽微な増悪影響を示し、反応性には性差がある可能性を見出した。影響が最も顕著であった BPA の若齢期曝露においては、詳細な解析を行い、免疫応答の攪乱を介した炎症性・抗炎症因子の発現変動が炎症病態に寄与している可能性を示した。さらに、DEHP 若齢期曝露による視床下部における炎症性関連遺伝子の発現増加や、BPA 若齢期曝露による学習能力の低下および海馬における記憶関連遺伝子の発現の低下など、アレルギー性喘息における当該化学物質の脳神経系への影響を初めて明らかにした。本研究により、低用量の当該化学物質の曝露が、アレルギー性喘息における免疫系、脳神経系を攪乱する可能性とそのメカニズムの一端を解明した。

2 研究の成果

2.1 化学物質曝露による健康影響評価に係る疫学調査手法の高度化に関わる研究（プロジェクト1）

2.1.1 日本人就学前小児の食事摂取量に関する研究

(1) 目的と経緯

化学物質の子どもへの影響に関する疫学調査を行う際に、食事の影響を無視することはできない。しかしながら、日本において、就学前小児の大規模な食事調査は少なく、最適化された食事調査票も存在していない。食事からの化学物質摂取量を推計するため用いることができる食事調査票の開発は喫緊の課題であるが、子どもがどの食品をどれだけ摂取しているかの基礎的データは不足している状況である。そこで、本プロジェクトでは、全国の未就学児の食事記録調査を行い、食事調査票の開発のための基礎的データ収集を行うことを目的とした。

(2) 方法

全国13都道府県において、未就学児（1-6歳）をリクルートし、春夏秋冬の4季節においてそれぞれ3日間の食事記録を行うとともに、同時に食事調査票による調査を実施した。食事記録調査は、各実施地域の栄養士と協力して行い、秤量法により各食事の材料等の秤量、摂取量の秤量を行った。食事記録調査及び食事調査票データは、各地域において一次的に確認するとともに、すべてのデータについて二次的クリーニングを行い、データ確定を行った。

(3) 結果と考察

全国での未就学児のリクルート数は、454人であった。そのうち、食事記録調査及び食事調査票を完了したのは、441人であった。

食事記録調査において出現頻度の多い食品108品目（各群上位10%）について、食事調査票と比較したところ、62件（64%）が一致した。食事調査票では、限られた食品しか訪ねることができないが、実際の食事記録で多く出現した食品の64%がカバーされており、季節変動や地域差などを考慮すると、食事調査票の一義的な有効性が確認された。図1は、食事記録調査において多く出現した食事と食事調査票で尋ねている食品との関係を示している。ここから、食

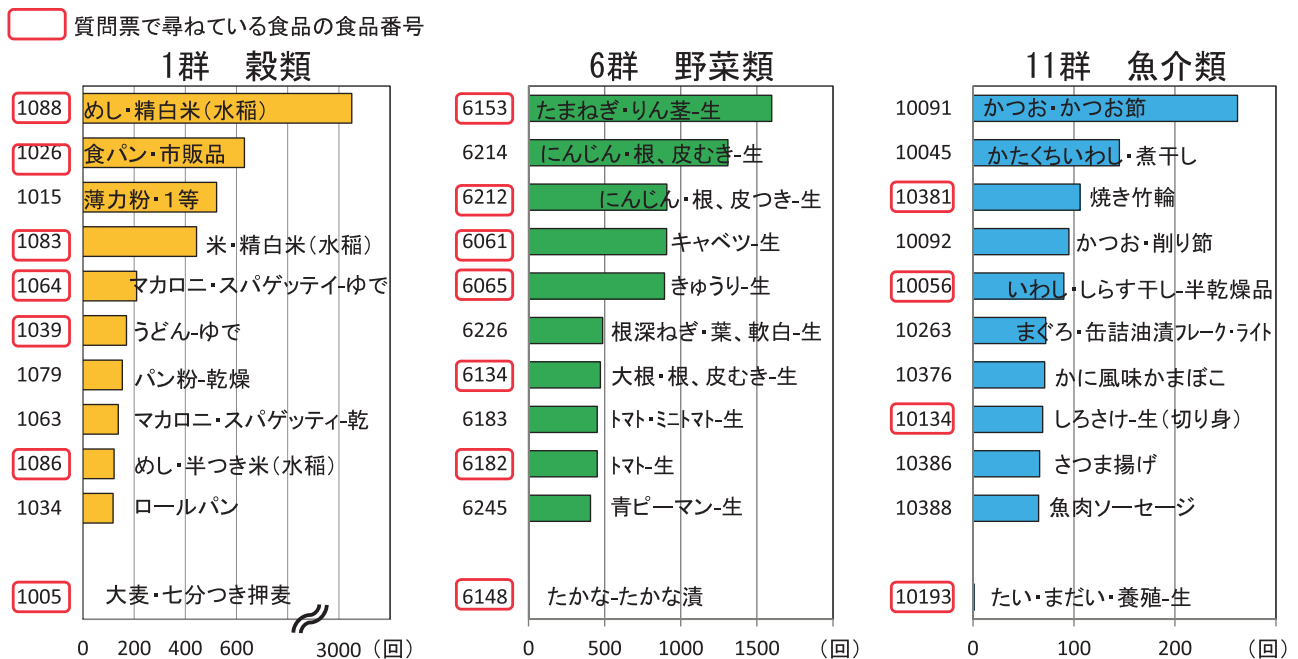


図1 食事記録調査における食品の出現頻度と食事記録票との比較

事記録調査で出現頻度が多いが食事質問票では使われていない食品として、ロールパン、ねぎ、かに風味かまぼこ等があり、食事記録調査ではほぼ出現がないが質問票で使われている食品として、大麦、たかな漬、まだい等があることがわかった。

この結果を用いて、さらに食事調査票の最適化を行うとともに、そこから化学物質の曝露量を推計できるシステムの構築を行うことが今後の課題である。

2.1.2 大規模疫学調査に必要な、超高感度、高速、低価格分析法の開発に関する研究

(1) 目的と経緯

大規模疫学調査における化学物質曝露評価には、多成分を低コストでハイスループットに測定できる一斉分析法が不可欠である。また、疫学調査参加者から得られる生体試料は量が限られるため、検出感度や選択性も同時に求められる。そのため、本研究では、尿や血液を対象としたハイスループットな多成分一斉分析法の開発、および限られた生体試料を活用するための微量分析法の開発を目的とした。確立した分析法は、生体試料の分析に適用して曝露評価を実施した。

(2) 結果と考察

A 血中金属の高感度・ハイスループット分析法開発

ICP-MS を用いた全血中鉛、カドミウム分析法を改良し、水銀、セレン、マンガンと同時に測定可能とし、胎児期曝露により精神神経発達異常をきたすことが示唆されている重金属の一斉分析法を開発した。開発した分析法では、0.2 mL の血液試料から鉛、カドミウム、水銀、セレン、マンガンの5種の金属を測定可能であり、年間数万検体の測定に適用できるため、エコチル調査の標準分析法として採用された。本分析法は、水銀を他の重金属と同時に分析でき、かつ低コスト、ハイスループットを実現した点は、既存の分析法では実現が困難であり新規性の高い方法である。

B 尿中コチニン・8-OHdG のハイスループット同時分析

喫煙マーカーであるコチニン（ニコチン代謝物）と酸化ストレスマーカーの8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン（8-OHdG）を尿試料から同時検出可能な分析法を開発した。喫煙は胎児・幼児の健康や発達に様々な影響を及ぼすことが指摘されているため、喫煙マーカーの測定が求められる。本研究で開発した分析法は、96穴プレートを用いた固相抽出を採用することでハイスループットを達成し、年間1万検体程度の測定が可能となった。この分析法についても、エコチル調査の標準分析法として採用された。

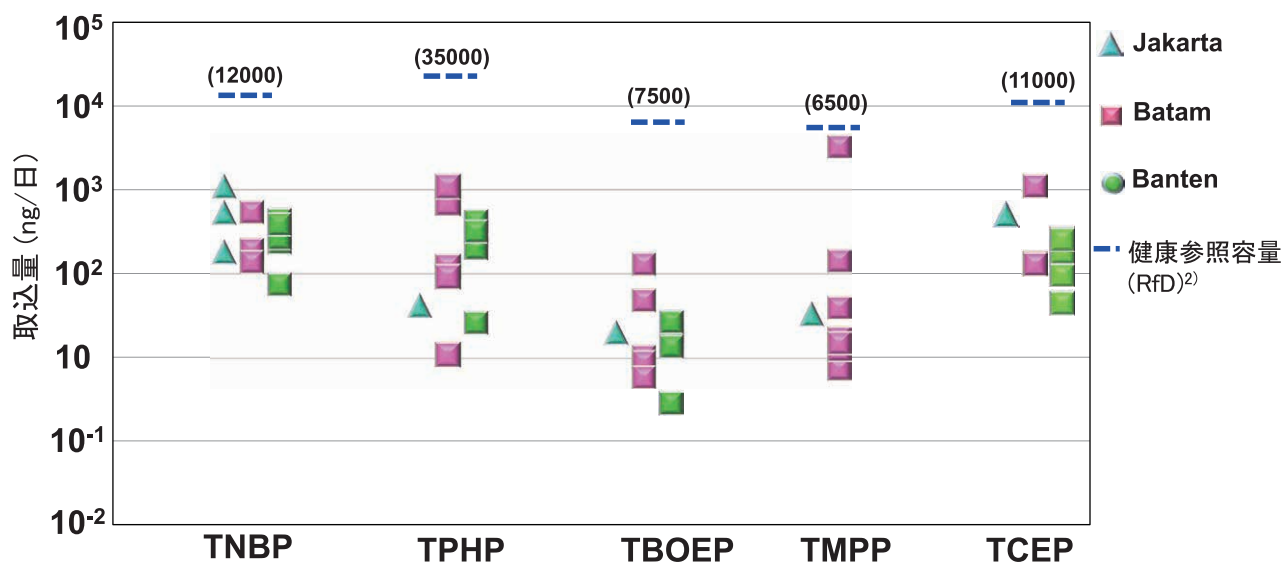
C 水道水中残留性フッ素化合物（PFAAs）の分析（US EPA との共同研究）

多成分一斉分析法として、オンラインで試料の精製や濃縮等の前処理を行うことで試料の全量を分析機器に導入することを可能にした自動前処理-液体クロマトグラフ質量分析法を開発した。本分析法により、従来法で水道水500 mL程度必要だったものが、10 mLで分析可能となり、試料量の削減と高感度化に成功した。本研究で開発した分析法を用いて、米国環境保護庁（US EPA）との共同研究として、水道水中PFAAsの測定を実施した。

D 母乳中リン酸エステル系難燃剤9種の一斉分析

臭素系難燃剤の規制に伴い、リン酸エステル系難燃剤の使用量増加が指摘されており、人の曝露評価が求められている。リン酸エステル系難燃剤はある程度脂溶性が高いものの、体内半減期は短いとされており、小児の曝露経路としては母乳が重要と考えられている。そのため、母乳試料中リン酸エステル系難燃剤の一斉分析法を開発し、アジア地域の母乳汚染モニタリングに適用した（図2）。インドネシアの都市部や廃棄物処分場地域等でボランティアから母乳試料の提供を受け、リン酸エステル系難燃剤を測定した。その結果、一部の検体で母乳を介したリン酸エステル系難燃剤摂取量がRfD値と同程度となることがあり、さらなるモニタリングと影響評価の必要性が示された。

取込量/日 = 各PFR濃度(ng/g 湿重量当たり) × 授乳量/日
 1日当たりの授乳量¹⁾:700 mL



1) Oostdam et al., 2005; 2) Van del Eede et al., 2011

図2 インドネシアにおける母乳を介したリン酸エステル系難燃剤の曝露評価

E PCBs の迅速分析法開発

微量迅速分析法として、前処理工程を小容量化し抽出液の全量を機器に導入することで、ごく少量の血液試料 (0.01-0.1 μL) から主要 PCB コンジェナーを検出する方法を開発した。この方法により、前処理および機器分析にかかる時間を従来方と比べて約 1/5 とすることができ、1 検体あたりの分析費用の低減が期待出来る。次期中期では、対象物質を他の POPs まで拡大し、ハイスループット化することでエコチル調査等に適用可能な方法へと改良を進める予定である。

F 生体試料中ネオニコチノイド農薬の分析

ネオニコチノイド系農薬は、近年、環境水や尿などから検出され、広域的な環境汚染と人への曝露が明らかになりつつあるが、哺乳類に対する慢性的な曝露の影響について十分な知見がなく、体内用量や体内動態に関する研究が求められている。本研究では、ネオニコチノイド系農薬の体内用量を評価するため、生体試料の分析法を開発した。測定条件を最適化し、LC-MS/MS 分析における機器検出下限値が 0.014-0.025 ng/ml となった。抽出操作の回収率は 90%-104% と良好だった。MRM 分析時のクロマトグラムを図 3 に示す。今後は、さらなる高感度化とハイスループット化を目指す。

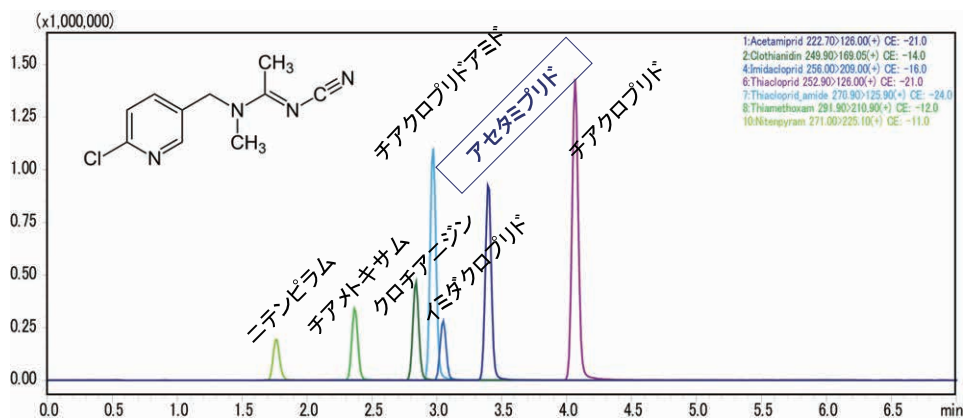


図3 ネオニコチノイド系農薬の MRM クロマトグラム

2.1.3 疫学調査手法・解析手法の高度化に関する研究

(1) 目的と経緯

従来の疫学研究の中でも古典的なコホート研究（追跡研究・観察研究）では、対象者の追跡開始時点でのリスク因子への曝露状況を唯一のリスクとし、対象者が興味ある疾患を発症するか否か、もしくは発症までの時間を評価項目・エンドポイントとしてリスクの定量を行ってきた¹⁾。従来の疫学研究の方法論上の検討は、このような疫学研究では「対象者の選択バイアス」、「未測定の交絡因子の存在可能性」、「あらゆるリスク因子に潜む測定誤差の可能性」の3点の存在を暗黙の仮定として置いており、なおかつそれらの仮定の正しさをデータから確認することができないと考え、それらもたらすバイアスの影響を評価したり、バイアスを補正したりすることが方法論的課題とされ方法論が進歩してきた²⁾。最近では、原爆被爆や災害などの特殊なリスク因子への単発の曝露（一時点のみ曝露）を除いて、人々の健康を脅かすリスク因子は、慢性的に生活の中に存在し、健康への影響も慢性的・累積的である場合が多いという考えに注目が集まっている。また、慢性的な曝露では、たとえば喫煙でよくみられるように、あるとき喫煙を始めたり、禁煙をしたり、また再開したりといった曝露状況がライフステージの途中で変化する可能性も考えられる。このような現実的な曝露の変遷・累積に対して、古典的なコホート研究では実際のデータに対するモデル化等で対処することはなく、誘導期間（induction period）等の考え方を導入して解析対象者や解析対象期間の除外を行い、因果関係の時間関係を明確にしたり、リスクを過大評価したりしないような対応を行ってきた³⁾。

疫学研究でリスクを評価する対象が、「喫煙と肺がん」、「高血圧や高脂血症と冠動脈疾患」といった、比較的強い因果関係である場合には上記のように過大評価をしないように保守的にリスクを定量していく対応でも十分に因果関係の立証およびリスクの大きさの定量が可能であった。また、リスク因子の影響が強いものでなかったとしても、「アスベスト曝露と中皮腫発症」や、「ジクロロプロパン曝露と胆管がん発症」など、曝露と疾患発症にある程度特異的関係にある場合も、上記のような解析結果を根拠とした因果関係の立証は可能であり、発がん性に限定すれば、実際に国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer）ではそのようなリスク評価に基づき発がんの確からしさを評価してIARC Monographとして出版している（<http://monographs.iarc.fr>）。ただ、リスク因子の影響が強くない場合にリスクの大きさを精度良く定量ができるかどうかは曝露者がどの程度存在するかに依存している。

一方で、近年の環境疫学で対象としているような、個々の影響が弱いリスク因子が複合的に影響しあって、非特異的に疾患発症に影響するような場合（複数の化学物質曝露が影響する可能性があるアレルギー・免疫系疾患や精神神経発達障害等）には、古典的疫学研究の手法では、リスクの大きさの定量だけでなく因果関係の立証も非常に困難になり、しばしば一貫性のある結果が得られない⁴⁾。

ただ、ヒトの健康に関する現実的な因果推論は、そもそも1時点の曝露状況と時点がある程度明確にわかる発症に限られることは少ない。実際には長期的・慢性的でしかも経時的に変化する曝露と、発症した・しないではなく経時的に変化する健康状態が興味の対象となる場合が多い⁵⁾。特に、曝露として環境要因をリスク評価の対象とする環境疫学の場合には、曝露に関しても健康状態に関しても、慢性的・経時的なデータとして得られることになる。

そのようなデータを扱うために、近年「ライフコース疫学」という概念が提案されている⁶⁾。ライフコース疫学は、社会疫学（計量社会学）の文脈で提案された概念であり、人生における生物学的、心理・社会的、社会・経済的な要因が、ヒトの人生全般にわたって、慢性的・経時的に影響し、さらには世代を超えて伝播し、子孫の健康状態に影響する可能性を定量することを目指している。ライフコース疫学では、従来のコホート研究（追跡研究・観察研究）の限界であった、経時的に変化する曝露状況および健康状態、また曝露要因間の関連や曝露要因と健康状態の関連を柔軟にモデル化し、定量的に評価することも目的としている。

また、近年では医療や手技、医薬品や医療機器を対象としてそれらによる治療の評価を目的とする臨床研究の領域においても、治療が結果に影響を与え、結果が次の治療の選択に影響を与えるといった、原因と結果が共に経時的に評価され、互いに影響しあっている状況での因果推論が積極的に議論され、その概念と解析手法は疫学領域にも輸入されてきている^{7,8)}。

そこで、本研究の目的は、ライフコース疫学および曝露と結果が影響し合う場合の統計解析手法（表1）について最

表1 ライフコース疫学で活用が検討されている（応用可能な）解析方法

条件付きモデル	同時モデル	周辺構造モデル
<ul style="list-style-type: none"> ・直接効果と関節効果の分離は不可能 ・時間依存的な交絡が存在する場合には妥当でない 	<ul style="list-style-type: none"> ・直接効果と関節効果の分離が可能 ・時間依存的な交絡が存在する場合には妥当でない ・線形モデルに限定 	<ul style="list-style-type: none"> ・PW法で重みづけをして二重ロバスト推定量を算出 ・直接効果と関節効果の分離が可能 ・交絡因子が経時測定されている場合に拡張可能

新の知見をレビューし、小児環境疫学領域への適用可能性を提示すること、および、提示した方法を、現状で利用可能な実際の小児環境疫学データに適用し、解析結果について考察することである。

(2) レビューのまとめ

A 因果パス図による記述

曝露および結果が経時的に測定されている（もしくは測定しようとしている）場合には、しばしば、互いの関連を因果パス図として記述することになる⁹⁾。このような因果パス図のうち、因果関係の方向を矢線で表し（矢線の元が原因で矢が結果）、結果が元の原因に戻ってくるような循環がないパス図のことを特に有向非巡回グラフ（Directed Acyclic Graph; DAG）と呼ぶ。DAGは計量社会学等でしばしばパス解析をする際に記述されるものだが、疫学研究においても今回のような複雑な因果関係を評価する際には可能な限り事前にDAGを記述することがのがぞましい。DAGを記述することで、興味ある曝露と結果のパスの間に存在する要因が交絡因子なのか中間変数なのか明らかになる。一般に、交絡因子はその因子が中間変数でないことがその要件として挙げられ、中間変数は単純にモデルの説明変数として調整してしまうと、新たな矢線（パス）が開いてしまい、因果関係を歪める結果になる（バイアスをもたらす）ため、DAGを記述することでどの変数をモデルで調整するかどうかの解析計画を立案することができる。また、興味ある曝露と結果の関連について、曝露から結果にかけてのパスのうち、中間変数を介した効果（間接効果）と曝露が中間変数を介さずに、直接結果に与える効果（直接効果）を評価することで、より具体的に興味のある効果（間接効果、直接効果、もしくは、その和として得られる総合効果）を定量することができる¹⁾。このように、曝露が結果に与える影響を直接効果と間接効果に分離することが可能になると、当該曝露を抑えた場合（当該曝露物質の使用禁止や環境基準の設定など）に、どの程度の予防効果が得られるのかをより厳密に評価することが可能になるため、公衆衛生的意義が大きく、さらには曝露物質の抑制にかかるコストとその効果の関係を評価する費用効用分析のための判断材料としても役に立つことが考えられる。また、研究開始前にDAGを記述することで、さまざまな専門性を持つ研究メンバー全員で仮説を具体的に共有した上で議論することが可能となる。特に、臨床研究ではDAGが臨床家と統計担当者のコミュニケーションツールとして活用可能であり、このような効果はより複雑で専門性が多岐にわたる主体が関わる疫学研究では更なる効果を発揮すると期待できる。さらに、研究開始前におけるDAG活用の長所は、測定すべき変数が明らかに行えること（測定項目候補を検討する際の重要性（実施可能性と予算面の制約からの優先順位など）の吟味を含む）が、データの収集および評価すべき事項を明示できることがあげられる。

B 条件付モデルとライフコースプロット

曝露が経時的に測定され、変化すると考えるライフコース疫学研究では、従来の疫学研究ではモデルに含めてはならないと考えられてきた中間変数であっても、さらに時系列的にあとの結果から見ると原因となっていることがあり、モデルに加える必要がでてくる。その場合の対処の1つとして条件付モデルの利用が考えられる⁹⁾。たとえば、ある因子がベースライン（時点0）、それ以降の時点1、時点2で測定されていたとすると、ベースラインと中間変数である時点1および時点2の要因を同時にモデルに含めるために「[時点1の要因] - [ベースラインの要因]」および「[時点2の要因] - [時点1の要因] - [ベースラインの要因]」という新しい変数をモデルに含め、その回帰係数を時点間の要因の変化が結果に与える影響と解釈していく。また、このようにして複数時点にわたって測定されている要因の時間変化が結果に与える影響をプロットしたものをライフコースプロットと呼び、どの時点での要因の変化が結果に大きな影響を

与えるかを可視化することができるため、子どもの成長における曝露の critical window となるタイミング（曝露していることが大きく結果に影響する時期）を探索するために大いに利用することができる。ただし、この手法に関しては結果が経時的に変化する場合は想定されておらず、ある時点での1つの疾患発症を結果変数とする¹⁰⁾。たとえば、水銀への曝露と自閉症(Autism Spectrum Disorders; ASD)の関係はある程度知られているが、妊娠初期の水銀曝露が重要なのか、中後期の曝露が重要なのか、出産後の乳幼児期の曝露が重要なのかについては諸説ある¹¹⁾。実際に因果関係の評価およびその平均的なリスクの定量だけでなく、最も気をつけるべき時期(critical window)を見つけることは、ASD発症を効果的に予防しようとする観点からは極めて重要であると考えられる。

C 同時モデル

条件付モデルと同様に、中間変数をモデルに含める際のモデル化として、同時モデルの利用が考えられる。同時モデルは、疾患(結果)を結果変数としてモデルと、中間変数を結果変数としたモデルを同時に評価する手法で、中間変数は結果変数に影響すると考えられることから階層モデルもしくは構造モデルの一種である⁹⁾。したがって、同時モデルでは中間変数を介する効果(間接効果)と介さない効果(直接評価)を実際に定量することができ、双方の大きさを比較することが可能となる。一方、同時モデルによって直接効果と間接効果が分解できるのは線形モデルの場合に限られ、疫学研究でよく利用されるロジスティック回帰モデルなどの場合には定義どおりの直接効果、間接効果を推定できない。また、時間依存性交絡因子が存在する場合にはその結果にバイアスが含まれることが知られている¹²⁾。時間依存性交絡因子が存在しなかった場合でも、中間変数と結果変数に影響する交絡因子が存在する場合、それが測定されているかどうかにかかわらず、その因子で調整をしないと直接効果の推定にバイアスが生じることもまた同時モデルの欠点として挙げられる¹³⁾。さらに、未測定 of 交絡因子を無視しているという問題は、本件に限った話ではなく、古典的な疫学研究を解析する段階から検討されてきた課題ではあるが、例外なく本件でも同様に存在し、妥当な外部情報を用いた感度解析が必要となる¹⁴⁾。

D 周辺構造モデル

周辺構造モデル(Marginal Structural Model; MSM)は、曝露を受ける確率(傾向スコア)を交絡因子が複数存在する場合に拡張した因果モデルである⁸⁾。具体的には、傾向スコアの逆数で重み付け(Inverse Probability Weighting; IPW)をした重み付け回帰を実行することでIPW推定量と呼ばれる効果の推定量(リスク比、リスク差、オッズ比等)を得ることができる。IPW推定量は、一般化線形モデル全般に対して得ることができるため、従来の古典的疫学研究に適用されてきた統計モデルに対してそのまま拡張・利用することが可能である。通常の回帰モデルでは、結果変数に対する曝露・共変量のモデル化が正しい必要があると同様に、MSMを利用する上での重要な点は、傾向スコア推定のための回帰モデルが正しく得られているかどうか(データに対して適切にあてはまっているか)が重要になる。また、経時的に得られた結果変数間の関係の評価(共分散の推定)が正しいことも重要である。この両者のどちらかが正しければ、統計的に正しい(バイアスのない不偏な)推定量が得られるようにMSMを拡張して提案されたのが二重ロバスト推定量である¹⁵⁾。

(3) 実際のデータへの適用と解析結果の考察

本研究でレビューしてきた統計解析手法のうち、特に、周辺構造モデルについて、国立研究開発法人国立成育医療研究センターが実施している、約1,700人の妊婦に研究に参加してもらい、生まれた子どもを追跡していく出生コホート研究である「成育母子コホート研究」から得られたデータを題材として、その解析結果について考察した。

A 成育母子コホート研究の概要

成育母子コホート研究は2003年に始まり、2015年度現在まで追跡を実施している出生コホート研究で、対象者を妊娠中にリクルートし、生まれた子どもを定期的な健康診断および調査票による調査により経時的に健康状態や子どもの

発達をフォローアップしている。対象者は2003年10月から2005年12月のクルート期間に成育医療研究センターを受診し、研究に同意をした1,703名の妊婦およびその後生まれた子どもである。また、健康診断では、5歳時点ではアレルギー疾患を含めた各種検査のための採血も実施されており、採尿も定期的に行われている。定期的な健康診断も行われており、2015年度には、追跡している子どもの先頭集団が9歳に達し、対象者全員に対して9歳児健診が実施された。

疾患発症に関して、成育母子コホート研究では、ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Child-hood) 調査票を利用して、経時的に対象者の喘息やアトピーをはじめとするアレルギー性疾患の状況を把握している。すなわち、経時アウトカムを調査している。また、曝露に関しては、妊娠中の生活習慣や生活環境や服薬状況といったベースラインの情報の他に、毎年調査票で対象者の生活環境について評価しており、ペットの有無や使用する暖房器具、生活習慣などを経時的に評価することが可能である。

B 本研究における検証仮説

本研究においては、主たる要因を出生体重、主たるアウトカムをアレルギー発症とし、この関連性を解明するために、交絡要因や中間変数を含めたDAGで表現した(図4)。アレルギー発症(Y)は、経時的に評価されている疾患発症である(ISAAC評価によるアレルギー疾患の有無)。経時的に評価されている交絡因子として「ペットの保有」、中間変数として離乳食開始時期(6ヶ月以前か以降か)、その他のリスク因子として両親の喘息等アレルギーの有無を利用した。アレルギー発症に影響するリスク因子としては出生時体重(2,500g以上か未満か)を評価した。因果的直接的効果は、出生体重が2,500g未満で離乳食開始が早いときに観測されるであろうアレルギー発症リスクと、出生体重が2,500g以上で離乳食開始が早いときに観測されるであろうアレルギー発症リスクの比とし、従来の回帰モデル、すなわち、交絡因子と中間変数を調整したモデル(モデル1)、および、交絡因子、その他リスク因子、中間変数のすべてを調整したモデル(モデル2)の解析結果と、本研究において提案する回帰モデル、すなわち、周辺構造モデルを用いてIPW法で交絡調整をした場合の解析結果を比較した。

C 解析結果と考察

本研究における解析対象者数は、成育母子コホート研究参加者のうち、追跡が継続されており、なおかつ必要な変数をすべて測定している解析対象者は1,342人であった。解析対象者の背景要因を表2に示した。

本研究で検討した手法を適用した結果、出生体重(2,500g以上の場合)のアレルギー疾患発症リスク比は、周辺構造モデルの総合効果(直接効果+間接効果)では1.35(95%CI: 1.18-1.48)であった(表3)。これを直接効果と間接効果に分離したとき(周辺構造モデルを用いてIPW法で特定したとき)、直接効果の推定リスク比は1.13(95%CI: 1.01-1.45)

検証する因果ダイアグラム

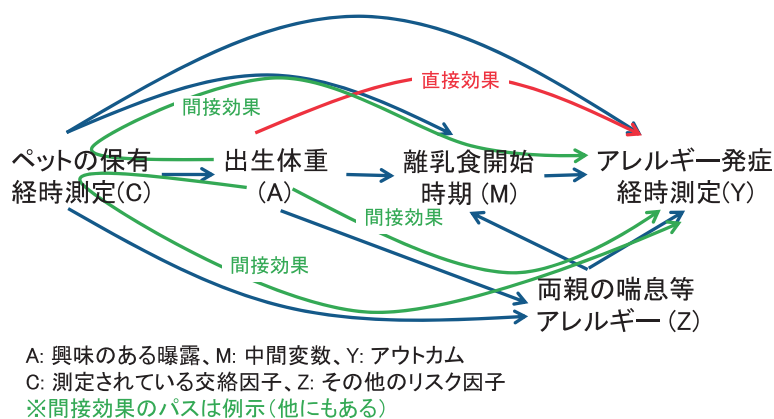


図4 小児次世代研究プログラムにおける統計手法の高度化で設定した検証仮説

表2 解析対象者の背景要因

	アレルギー児 (201名)	非アレルギー児 (1,141名)
低出生体重児	48名 (24%)	251名 (22%)
ペットの保有	62名 (31%)	297名 (26%)
離乳食開始時期	7.32月 (SD = 1.2)	6.92月 (SD = 1.4)
父アレルギー有	20名 (10%)	103名 (9%)
母アレルギー有	28名 (14%)	137名 (12%)

表3 出生体重とアレルギー疾患発症の関連性のバリエーション (リスク比と95%信頼区間)

	周辺構造モデル 総合効果	周辺構造モデル 直接効果	モデル1 (直接効果)	モデル2 (直接効果)
出生体重				
2,500 g 未満	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
2,500 g 以上	1.35 (1.18-1.48)	1.13 (1.01-1.45)	1.02 (0.93-1.24)	1.00 (0.91-1.22)

であり、単純な回帰モデル (モデル1 およびモデル2) による推定リスク比はいずれも過小評価 (それぞれ 1.02 (95%CI: 0.93-1.24) および 1.00 (95%CI: 0.91-1.22)) になっていた。

本研究により、従来の回帰モデル (モデル1 やモデル2 など) に全交絡因子・中間変数を入れて調整してしまう手法では妥当な結果が導けないことが明らかになった。また、既存の統計パッケージでは実施できない高度化されたモデルが必要であることが明らかになった。

本研究の課題は、より現実的な因果ダイアグラムに基づく解析の必要性である。例えば、時間依存性の交絡因子 (住環境や暖房器具など) も因果ダイアグラムに加える必要があることなどである。また、未測定 of 交絡因子を調製する項をモデルに組み入れるなどの検討も今後の課題としてあげられる。

この手法は、最終的には化学物質をはじめとする各種環境曝露の小児健康影響評価を目指したコホート研究である、子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) のデータへの適用を目指している。本研究により、エコチル調査においては検証仮説ごとに DAG を描いて解析モデルを吟味する必要があること、交絡因子および中間変数を単純にモデルに含めると、状況によっては誤った推定結果を導く可能性があることが示唆された。

引用文献

- 1) Rothman K.J., Lash T.L., Greenland S. (2012) Modern Epidemiology, Third Edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- 2) Greenland S. (2005) Multiple-bias modelling for analysis of observational data, Journal of the Royal Statistical Society: Series A, 168(2): 267-306.
- 3) Rothman K.J. (1981) Induction and latent periods, American Journal of Epidemiology, 114(2): 253-9.
- 4) Taubes G. (1995) Epidemiology faces its limits. Science, 269(5221): 164-9.
- 5) Pearl J. (2009) Causality: Models Reasoning and Inference, 2nd Edition, Cambridge University Press.
- 6) Kuh D., Ben-Shlomo Y., Lynch J., Hallqvist J., Power C. (2003) Life course epidemiology, Journal of Epidemiology and Community Health, 57(10): 778-83.
- 7) Robins J. (1986) A new approach to causal inference in mortality studies with sustained exposure periods-application to control of the healthy worker survivor effect, Mathematical Model, 7: 1393-512.
- 8) Robins J.M., Hernan M.A., Brumback B. (2000) Marginal structural models and causal inference in epidemiology, Epidemiology, 11: 550-60.
- 9) De Stavola B.L., Nitsch D., Silva I.S., McCormack V., Hardy R., Mann V., Cole T.J., Morton S., Leon D.A. (2005) Statistical

issues in life course epidemiology, *American Journal of Epidemiology*, 163(1): 84-96.

- 10) Carlin J.B., Gurrin L.C., Sterne J.A.C., Morley R., Dwyer T. (2005) Regression models for twin studies: A critical review, *International Journal of Epidemiology*, 34(5): 1089-99.
- 11) Mutter J., Naumann J., Schneider R., Walach H., Haley B. (2005) Mercury and autism: Accelerating Evidence? *Neuroendocrinology*, 26(5): 439-46.
- 12) Baron R.M., Kenny D.A. (1986) The moderator-mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic and statistical considerations, *Journal of Personality and Social Psychology*, 51: 1173-82.
- 13) Cole S.R., Platt R.W., Schisterman E.F., Chu H., Westreich D., Richardson D., Poole C. (2010) Illustrating bias due to conditioning on a collider, *International Journal of Epidemiology*, 39: 417-β20.
- 14) Ben-Shlomo Y., Kuh D. (2002) A life course approach to chronic disease epidemiology: conceptual models, empirical challenges and interdisciplinary perspectives, *International Journal of Epidemiology*, 31(2): 285-93.
- 15) Lunceford J.K., Davidian M. (2004) Stratification and weighting via the propensity score in estimation of causal treatment effects: a comparative study, *Statistics in Medicine*, 23; 2937-60.

2.2 化学物質曝露による小児・次世代への健康影響の機構解明と評価システムの構築に関する研究（プロジェクト2）

2.2.1 化学物質によって次世代に継承される健康影響とエピジェネティック変化の解明

(1) 目的と経緯

発達期の中でも特に胎児期は化学物質に対する感受性が高いことが知られており、妊娠期の母親への化学物質曝露による子への影響が懸念されている。その影響は生後すぐに顕在化する場合や、また思春期や成人後に後発的にあらわれる場合がある。さらに近年では、動物実験による研究から、母親の妊娠期の曝露による影響がその子のみならず孫以降の世代においても成長後に後発的に現れる例が報告され、メカニズムをはじめとして未解明な部分が多い課題として新たな懸念となっている。このような後発的な影響をもたらすメカニズムとして、DNAの塩基配列の変化を介さない遺伝子機能の調節機構であるエピジェネティクスの関与が多くの研究で示唆されている¹⁻³⁾。一方で、多くの化学物質曝露の影響に関して、どのようなエピジェネティック作用がどのような遺伝子機能を調節することによって影響が現れるのか、具体的な分子メカニズムが不明のままとなっている。

本研究では、化学物質の中でも早い時期からエピジェネティック作用をもつことが報告されてきた無機ヒ素を対象として、その妊娠期（胎児期）曝露による子世代の影響、およびその分子メカニズムを明らかにすることを目的として、*in vivo*（マウス）や*in vitro*での研究を進めた。影響としては、無機ヒ素の妊娠期曝露による発がん増加の実験系に着目した。また本研究ではさらに、孫世代への影響とメカニズムについても検討を行った。またこれまでの研究で、無機ヒ素が免疫細胞（リンパ球）において特徴的な遺伝子発現変化を誘導し、リンパ球の増殖を抑制することを明らかにしてきた。免疫系の抑制は発がん等各種の疾患と結びつくことから、本研究ではさらに無機ヒ素によるリンパ球増殖抑制の分子メカニズムについても検討を行った。

(2) 方法

A マウス妊娠期無機ヒ素曝露によるF1での肝腫瘍増加のメカニズム

C3Hマウス雌の妊娠中8-18日に亜ヒ酸ナトリウム85 ppmを含む水を自由摂取させ、生まれた雄の子の肝臓組織について検討した。

Line-1発現量

肝臓組織からRNA画分を調製した。ゲノムDNAを除くために2回DNase処理を行い、逆転写前にPCRを行ってLine-1の増幅がないことを確認しRNA画分の精製度を確かめた。RNA画分からcDNAを調製し、リアルタイムPCRによってLine-1 ORF1およびORF2の発現量を測定した。

Ha-ras突然変異

肝臓組織からフェノール-クロロホルム法によってゲノムDNAを調製した。Ha-rasの変異がある領域（コドン12/13および61）をそれぞれPCRで増幅し、電気泳動して目的のバンドを切り出し、サンガー法によってシークエンスした。

B マウス妊娠期無機ヒ素曝露によってF1で増加した肝腫瘍のMeDIP-アレイ法による網羅的DNAメチル化解析

妊娠8-18日に85 ppmのヒ素を含んだ水を自由に摂取したC3Hマウスから生まれた74-84週齢の雄の仔から、正常な肝臓および腫瘍がある肝臓の非腫瘍組織と腫瘍組織を採取した。採取した肝臓組織からゲノムDNAとtotal RNAを抽出した。

Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CpG island microarray 法

対照群の正常肝臓ゲノムDNAを3匹分まとめたサンプルと、胎児期ヒ素曝露群の肝腫瘍組織ゲノムDNAを3匹分まとめたサンプルを調製した。それぞれのゲノムDNAサンプルを抗5メチルシトシン抗体で免疫沈降後、免疫沈降後

の DNA を Cy5 で、インプット DNA を Cy3 でそれぞれラベル化した。12573 遺伝子を網羅する 97652 個のプローブを搭載したアジレントテクノロジー社の CpG island microarray にラベル化 DNA をハイブリダイゼーションし、アジレント社のスキャナーでスキャンした。スキャンしたデータを解析し、各プローブのシグナル強度を Me-value に変換した。Me-value とは、完全にメチル化されている状態を 1、完全に非メチル化状態を 0 とした値である⁴⁾。MeDIP に使用したサンプル間で Me-value を比較し、メチル化が異なる領域を検出した。

リアルタイムメチル化特異的 PCR (MSP) 法

コントロール DNA として、NIH3T3 細胞由来の完全メチル化 DNA、NIH3T3 細胞由来のゲノム DNA を GenomiPhi DNA Amplification Kit で 2 回増幅した完全非メチル化 DNA を用いた。コントロール DNA および肝臓組織 DNA を EcoRI で制限酵素処理後、バイサルファイト反応を行った。バイサルファイト反応後の DNA および、領域特異的な完全メチル化配列に対応する M プライマーと完全非メチル化配列に対応する U プライマーを用いてリアルタイム MSP を行った。メチル化レベルは、以下の式より算出した。

$$\frac{M\text{プライマーで増幅したDNA量}}{M\text{プライマーで増幅したDNA量} + U\text{プライマーで増幅したDNA量}} \times 100$$

バイサルファイトシーケンス

バイサルファイトシーケンス用のプライマーで、バイサルファイト反応後の DNA を PCR 増幅し、得られた PCR 産物を pGEM T Easy vector にクローニングした。14 個から 16 個のクローンをとり、Applied Biosystems 3730 DNA analyzer で塩基配列を解析した。

リアルタイム PCR

正常肝臓および腫瘍がある肝臓の非腫瘍組織と腫瘍組織から抽出した total RNA から逆転写反応により cDNA を得た。LightCycler 480 を使用してリアルタイム PCR を行った。

C マウス妊娠期無機ヒ素曝露が F2 肝腫瘍に及ぼす影響

C3H マウス雌の妊娠中 8-18 日に亜ヒ酸ナトリウム 85 ppm を含む水を自由摂取させ、F1 雌雄を得、これを交配して F2 を得た。同時期に対照群妊娠マウスから F1 雌雄を得、交配して F2 を得た。対照群およびヒ素群の F2 雄を実験に用いた。

網羅的遺伝子発現解析

対照群およびヒ素群 F2 の正常肝臓または腫瘍肝の非腫瘍組織、腫瘍組織、各群それぞれ 4 サンプルから ISOGEN RNA isolation kit (Nippon Gene) を用いて RNA を調製し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。Agilent Technologies 社のプロトコルに従ってラベル化 cRNA を調製し、SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8 × 60K (Agilent Technologies) を用いて発現量のデータを得た。得られたデータについて、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った。

ヒト肝細胞癌と C3H マウス肝腫瘍で共通して発現が変化する遺伝子の選抜

ヒト肝細胞癌の遺伝子発現データは The Cancer Genome Atlas Data Portal (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>) の RNA-seq データより、非癌部と癌組織のデータセットが揃っている各 50 検体分のデータを使用した。C3H マウス肝腫瘍については、対照群 F2 正常肝臓および肝腫瘍組織とヒ素群 F2 の腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析の結果を利用した。ヒト肝細胞癌と C3H マウス肝腫瘍で非癌部に対して共通して発現が上昇または低下している遺伝子を選

抜した。

D 無機ヒ素曝露によるリンパ球増殖抑制のメカニズム

細胞培養と化学物質曝露

マウス B リンパ腫細胞株 A20 細胞を用いた。培地は、RPMI 1640 (Sigma) に、10% FBS、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、10 mM 2-mercaptoethanol、1 mM ピルビン酸ナトリウム、2M HEPES (pH 7.1) を加えた Complete medium を用い、37 °C、CO₂ 5% 条件下にて培養を行った。亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO₂, 純度 ≥ 98%, Sigma) は超純水に溶解し、終濃度 10 µM で培地に添加し、6 時間から 14 日間培養した。プロテアソーム阻害剤である MG-132 (Sigma) は、DMSO にて溶解後、超純水にて希釈し、終濃度 5 µM (DMSO 濃度 0.5% 未満) で培地に添加し、6 時間培養した。過酸化水素は、濃度 30% 溶液 (Wako) を滅菌水にて 100 mM に調製し、終濃度 100 µM で培地に添加し、24 時間培養を行った。

siRNA によるノックダウン

ターゲット遺伝子の siRNA および対照実験に用いた scramble siRNA を、エレクトロポレーション法を用いて A20 細胞に導入した。その後、培地に亜ヒ酸ナトリウムを終濃度 10 µM になるように添加し、細胞を 24 時間培養した。培養終了後、細胞を集め、遺伝子発現量、タンパク質量、細胞周期を測定した。

遺伝子発現量の測定

細胞から抽出した RNA から逆転写反応により cDNA を得た。得られた cDNA を Thermal cycler 9700 (Applied Biosystems)、もしくは LightCycler 480 (Roche) を使用して PCR を行った。

タンパク質量の測定

細胞から抽出したタンパク質の濃度を、BCA 法を用いて測定後、ウエスタンブロット法により目的のタンパク質量を測定した。

タンパク質間の複合体形成量の測定

細胞から抽出したタンパク質の濃度を BCA 法で測定後、免疫沈降法によって複合体の形成量を測定した。

活性酸素種の測定およびヒ素曝露と過酸化水素曝露との比較

DCFH-DA (終濃度 10 µM) 入りの PBS に細胞を懸濁し、37 °C、CO₂ 5% で 30 分培養した。培養後、上清を除き、亜ヒ酸ナトリウム (終濃度 10 µM) または過酸化水素 (終濃度 100 µM) を含んだ培地で 24 時間培養した。培養終了後、細胞を集め、活性酸素種による蛍光の測定を行った。

細胞周期の測定

細胞を PBS にて洗浄後、ヨウ化プロミジウムによる核染色を行った。染色された DNA 量は、FACS Canto II cell sorter (BD Bioscience) を用いて測定した。

細胞増殖の測定

テトラゾリウム塩である XTT が還元されて生じるホルマゼン色素の吸光度を検討した。加えて、上記の曝露後に培地からヒ素を除いた場合の増殖の回復具合も検討した。

細胞老化の特徴の検出

細胞の形態学的変化を、倒立顕微鏡を用いて観察した。細胞老化マーカーである senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) 染色を行った。

(3) 結果と考察

A マウス妊娠期無機ヒ素曝露による F1 での肝腫瘍増加のメカニズム

実験系について

ヒ素は国際がん研究機関 (IARC) がグループ 1 に分類するヒトに対する発癌物質であるが、その発癌誘導メカニズムについては不明な部分が多く残されている^{5,6)}。現在、中国、インド、バングラデシュなどの国々では天然由来の無機ヒ素が混入した地下水を飲用することによる慢性ヒ素中毒が発生し、発癌を含む大きな健康被害が発生している。化学物質の発癌性に関する研究において動物実験モデルは重要な役割をもつが、マウスやラットはヒ素の発癌に関する作用に対して抵抗性が大きく、これらの実験動物を用いて無機ヒ素の発癌性を探る 1900 年代初頭からの研究は長らくポジティブな結果を得ていなかった。1990 年代になって、無機ヒ素の代謝産物であるジメチルアルシン酸 (DMA^v) をマウスやラットに高用量投与することによって、その発癌促進作用が報告されている。マウスでは、400 ppm の DMA^v を含む水を 25 週間連続投与することによって、イニシエーション物質である 4-ニトロキノン 1-オキsid を投与したマウスにおける発癌促進作用が確認されている⁷⁾。

一方、米国の Michael Waalkes らのグループは、C3H マウス雌の妊娠中 8 日から 18 日の 10 日間のみ亜ヒ酸ナトリウム 85 ppm を含む水を自由摂取により投与すると、生まれたオスの子が成長後 74 週令において、対照群と比べて高率に肝腫瘍を発症することを報告した^{8,9)}。C3H マウスは、成長後に雄では肝臓と副腎に腫瘍を自然発症しやすい系統で、74 週令付近の雄では 30-40% が肝腫瘍を発症する。上記の Waalkes らの実験系で、比較的低用量の無機ヒ素の短期間の投与で腫瘍の促進作用が観察された理由として、腫瘍を発症する素因をもった系統のマウスを用いたこと、および化学物質に感受性が高い胎児期への曝露を行ったことの 2 つが考えられる。本研究では、Waalkes らの実験系において妊娠期ヒ素曝露による子 (F1) 雄での肝腫瘍増加のメカニズムの検討を行った。

我々は、これまでに Waalkes らの実験系において、妊娠期ヒ素曝露群 F1 雄の腫瘍を発症していない肝臓の正常組織での遺伝子発現変化やエピジェネティック変化を検出し、すでに「エピジェネティクス作用を包括したトキシコゲノミクスによる環境化学物質の影響評価法開発のための研究(特別研究)」報告書(SR-94-2011)で報告した。一方本研究では、腫瘍を発症した肝臓の変化を含めて解析を行った。

肝臓の Line-1 トランスポジション活性

Line-1 トランスポゾン(トランスポゾン)はヒトやマウスのゲノムで最も多く存在する転移因子(transposable element)である。多くの転移因子は不活化されているが、Line-1 は逆転写反応を介してゲノムに挿入されたり、二重鎖切断を起こしたりすることによって変異やゲノム不安定化を誘導する。Line-1 は RNA 結合たんぱく質をコードする ORF1 とエンドヌクレアーゼ活性と逆転写酵素活性をもつたんぱく質をコードする ORF2 からなり、両方のたんぱく質が Line-1 のトランスポジションに必要である。Line-1 の発現はプロモーター領域の DNA メチル化によって抑制され、低メチル化になることによって発現することが報告されている^{10,11)}。

本研究では、妊娠期ヒ素曝露群の 74 週令 F1 雄の正常肝および腫瘍肝の非腫瘍組織及び腫瘍組織で、対照群の対応する組織と比較して、ORF1 および ORF2 の発現増加傾向が認められ、特に腫瘍肝の非腫瘍部分では ORF1、ORF2 ともに対照群と比較して有意に発現が増加していることが検出された(図 5)。6 週令および 49 週令の肝臓では、Line-1 の発現は対照群とヒ素曝露群で差がなく、Line-1 の発現増加は後発的に起こることが明らかとなった¹²⁾。

肝腫瘍の Ha-ras 突然変異

C3H マウスの肝腫瘍では、癌遺伝子 Ha-ras のコドン 12、13 または 61 に高頻度に点突然変異が見つかることが報告

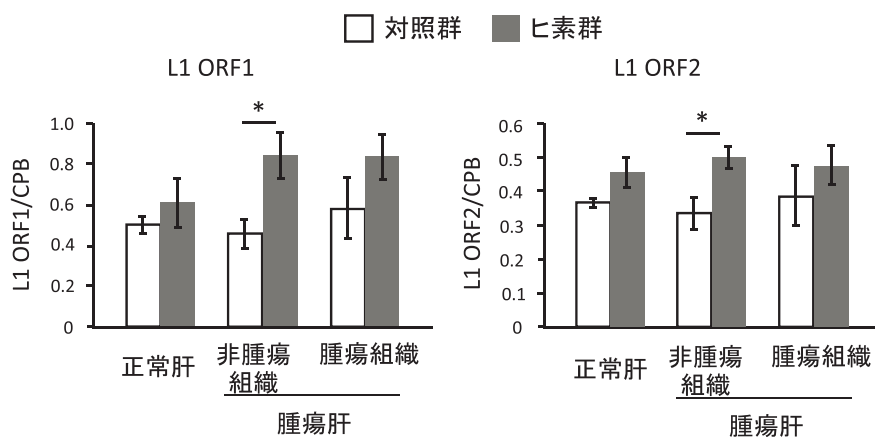


図5 妊娠期ヒ素曝露によるF1肝臓でのLine-1の発現増加

正常肝、腫瘍のある肝臓の非腫瘍組織と腫瘍組織のORF1およびORF2の発現をreal-time PCRで測定し、CPBを内部標準として補正した。結果は平均値±SE (n=6)。*p<0.05

されている。Rasファミリー (Ha-, Ki-, N-Ras) タンパクは、遺伝子のコドン12、13または61の点突然変異によるアミノ酸置換によって活性化型となり、活性化型Rasは下流のMAPキナーゼ経路の活性化等を介して、発癌のイニシエーションに関与し、癌細胞のクロナルな増殖を亢進すると考えられている¹³⁾。

本研究では、対照群と妊娠期ヒ素曝露群F1雄の肝腫瘍組織のHa-ras突然変異について検討した。その結果、ヒ素曝露群ではHa-rasコドン61に突然変異をもつ腫瘍の発生頻度に増加傾向が観察された。またHa-rasの突然変異は腫瘍肝の正常組織では検出されず、体細胞突然変異がであることが確認され、Ha-rasに突然変異が入った腫瘍細胞がクロナルに増殖したと考えられた。また興味深いことに、主に増加する変異は、酸化ストレスによって誘導されることが知られているG:C to T:A transversionであった¹²⁾。

考察

本研究では、妊娠期ヒ素曝露群F1雄の腫瘍を発症した肝臓において、対照群の腫瘍肝と比較して、非腫瘍組織におけるレトロトランスポゾンLine-1の有意な発現増加を観察した。この結果から、妊娠期ヒ素曝露によってF1雄の肝臓でLine-1の発現が活性化しゲノム不安定性が増加することが、肝腫瘍増加に関与することが示唆された。Line-1の発現はプロモーター領域のDNAメチル化によって制御されることが報告されている。現在ヒトのLine-1プロモーターに関しては配列情報が報告されておりDNAメチル化解析が可能であるが、マウスに関しては十分な情報が得られておらず、本研究で解析を試みたが成功しなかった。Line-1プロモーターのDNAメチル化解析条件が整った時点で、妊娠期ヒ素曝露による子世代での肝腫瘍とLine-1プロモーターのDNAメチル化との関連を検討し、エピジェネティクスの関与に関する知見を得ることは今後の課題である。

また本研究において、妊娠期ヒ素曝露群F1雄においてHa-rasコドン61にG:C to T:A transversionをもつ肝腫瘍が増加する傾向が観察された。G:C to T:A transversionは酸化ストレスによって増加する変異であり、筆者らがこれまでに報告したように、本実験系では酸化ストレスマーカーであるHO-1の発現がヒ素曝露群F1の74週令の正常肝臓および腫瘍肝の非腫瘍組織で増加することが観察されている。Ha-rasの突然変異に関してはサンプル数を増やして詳細に検討する必要があると考える。

「エピジェネティクス作用を包括したトキシコゲノミクスによる環境化学物質の影響評価法開発のための研究(特別研究)」(SR-94-2011)と本研究の結果から、妊娠期ヒ素曝露によるF1雄での肝腫瘍増加に関与することが示唆された影響経路を図6にまとめた。すなわちLine-1の発現増加などヒ素の新たな作用が明らかとなり、これらが腫瘍増加を誘導する多因子の構成要因であることが示唆された。

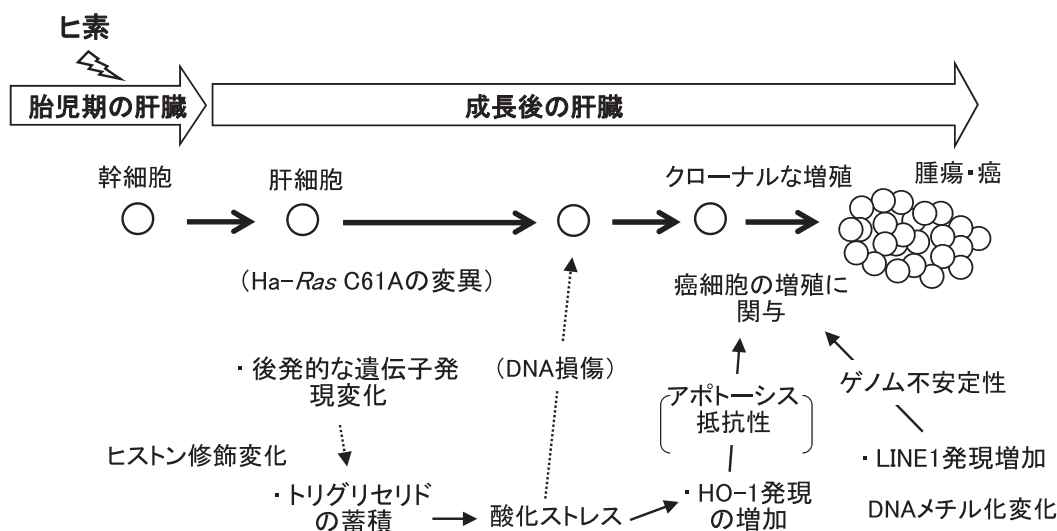


図6 妊娠期ヒ素曝露による子の肝腫瘍増加に関する経路

B マウス妊娠期無機ヒ素曝露によってF1で増加した肝腫瘍のMeDIP-アレイ法による網羅的DNAメチル化解析
MeDIP-CpG island microarrayによる網羅的DNAメチル化解析

ヒ素は腫瘍発症率を増加させることが知られていたため、ヒ素は腫瘍で影響を受けるゲノム領域のDNAメチル化を大きく変化させるのではないかと考え、対照群正常肝臓とヒ素曝露群腫瘍組織のサンプルを用いてMeDIP-CpG island microarrayを行った。97652個のプロープのMe-valueをもとに以下の条件でメチル化変化領域を選択した。その結果、16遺伝子領域を同定した(表4)。

- 一方のサンプルのMe-valueが0.2以下
- 2サンプル間のMe-valueの差が0.3以上
- 上記2つの条件を満たすプロープが連続で2つ以上存在

表4 MeDIP-CpG islandマイクロアレイにより同定した対照群の正常肝臓とヒ素曝露群の腫瘍組織でDNAメチル化に変化がある領域のリスト

遺伝子領域内部：プロープ位置が転写開始点から10キロベース以内の下流かつ翻訳領域に存在。

ヌクレオチド番号：NCBI (NCBI36/mm8)におけるヌクレオチド番号。

プロモーター：プロープ位置が転写開始点の10キロベース以内の上流に存在。

ゲノム上での位置		遺伝子名	遺伝子領域のどの部位がメチル化されているか	Me-valueの平均値		
染色体番号	ヌクレオチド番号			ヒ素曝露群腫瘍組織	対照群正常肝臓	差
1	111810301-111810709	<i>Cdh7</i>	プロモーター	0.52	0.19	0.33
1	040211362-040211474	<i>Il1r1</i>	遺伝子領域内部	0.18	0.54	-0.35
3	086633247-086633682	<i>Mab21l2</i>	遺伝子領域内部	0.64	0.17	0.47
3	124313191-124313473	<i>Tram1l1</i>	遺伝子領域内部	0.55	0.19	0.36
6	118559274-118559490	<i>ENSMUST0000078320.4</i>	不明	0.49	0.16	0.34
6	030889400-030889519	<i>ENSMUST00000101589.1</i>	不明	0.54	0.12	0.41
6	110611869-110612025	<i>Grm7</i>	遺伝子領域内部	0.48	0.17	0.32
7	018463460-018463833	<i>Fosb</i>	遺伝子領域内部	0.60	0.18	0.42
8	102305418-102305602	<i>Cdh8</i>	遺伝子領域内部	0.50	0.16	0.34
11	102590006-102590400	<i>Adam11</i>	遺伝子領域内部	0.18	0.71	-0.54
11	033413037-033413188	<i>Ranbp17</i>	遺伝子領域内部	0.48	0.18	0.31
12	077324539-077324770	<i>Hspa2</i>	遺伝子領域内部	0.53	0.17	0.36
14	030490675-030491319	<i>Btd</i>	遺伝子領域内部	0.62	0.18	0.44
16	030520656-030520955	<i>Fam43a</i>	遺伝子領域内部	0.20	0.69	-0.49
18	020888422-020888579	<i>B4gal16</i>	遺伝子領域内部	0.17	0.51	-0.34
19	037764225-037764481	<i>Cyp26a1</i>	遺伝子領域内部	0.54	0.18	0.35

得られた結果から、今回選択した遺伝子領域は、ほとんどが遺伝子領域内部でメチル化が変化した領域であることが明らかになった。

個々のサンプルを用いたリアルタイム MSP 解析

網羅的解析より選択した遺伝子領域から、対照群正常肝臓とヒ素曝露群腫瘍組織で Me-value の差が大きい遺伝子領域において、腫瘍で Me-value が高い *Mab21l2*、*Fosb*、*Btd* と、腫瘍で Me-value が低い *Il1r1* について、個々のサンプルを用いてリアルタイム MSP を行った。

図 7 に示すように、*Fosb* と *Mab21l2* ではヒ素曝露群の非腫瘍組織と比較して腫瘍組織でメチル化レベルが有意に増加した。*Il1r1* では、ヒ素曝露群に加えて対照群においても非腫瘍組織と比較して腫瘍組織でメチル化レベルが有意に減少した。*Fosb* では、対照群の腫瘍組織と比較してヒ素曝露群の腫瘍組織においてもメチル化レベルの有意な増加がみられた。また、バイサルファイトシーケンスにより対照群とヒ素曝露群の腫瘍組織で *Fosb* の DNA 領域のメチル

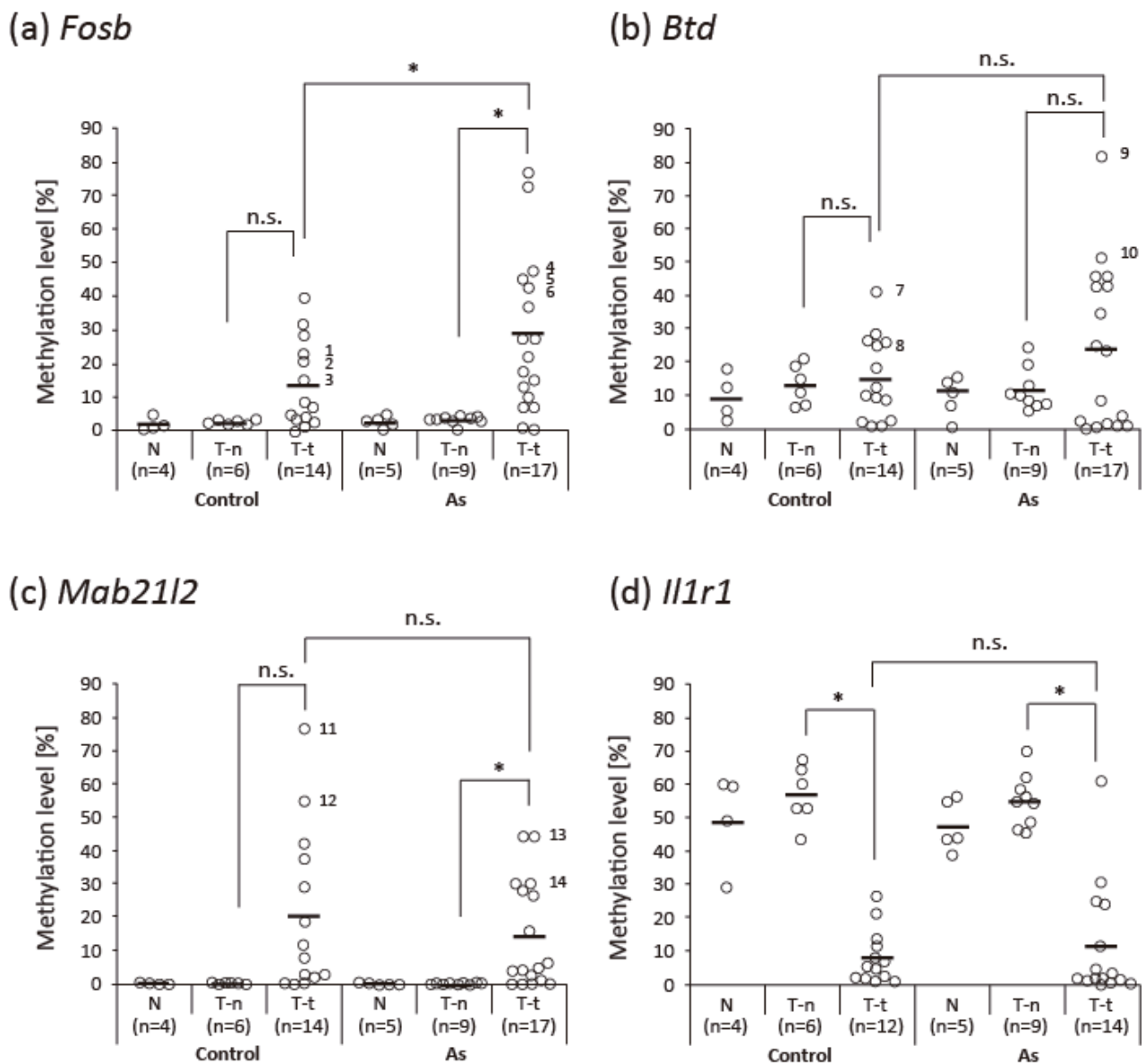


図 7 対照群とヒ素曝露群の肝臓組織における DNA メチル化レベルの変化

N: 正常肝臓、T-n: 腫瘍が存在する肝臓の非腫瘍組織、T-t: 腫瘍が存在する肝臓の腫瘍組織における (a) *Fosb*、(b) *Btd*、(c) *Mab21l2*、(d) *Il1r1* の領域の DNA メチルレベルをリアルタイム MSP により測定した。n はサンプル数で、横太線は各サンプルのメチル化レベルの平均値を示している。2 群間で t 検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意な差がある (*) と判定した。n.s. は、有意差がないことを示している。1-6 は、図 8 のサンプル番号に対応している。

化状態を調べたところ、リアルタイム MSP により得られた DNA メチル化レベルとほぼ等しい値が得られた (図 8)。Fosb のメチル化レベルとヒ素曝露との ROC カーブをプロットしたところ、特異度 0.64、感度 0.65、カットオフ値 0.15 であった。

Cui らは、雄の A/J マウスに無機ヒ素を含んだ水を 1 年半与え続けると、対照群と比較して肺腫瘍が発症するマウスが増加することを報告した¹⁴⁾。また、MSP により、癌抑制遺伝子である p16 と RASSF1A のプロモーター領域のメチル化がヒ素曝露群で高くなることも報告した¹⁴⁾。本研究では、新たに Fosb 遺伝子領域内部のメチル化が、妊娠期ヒ素曝露した C3H マウスの肝腫瘍組織において、対照群の腫瘍組織と比較して増加することを明らかにした。Fosb 遺伝子

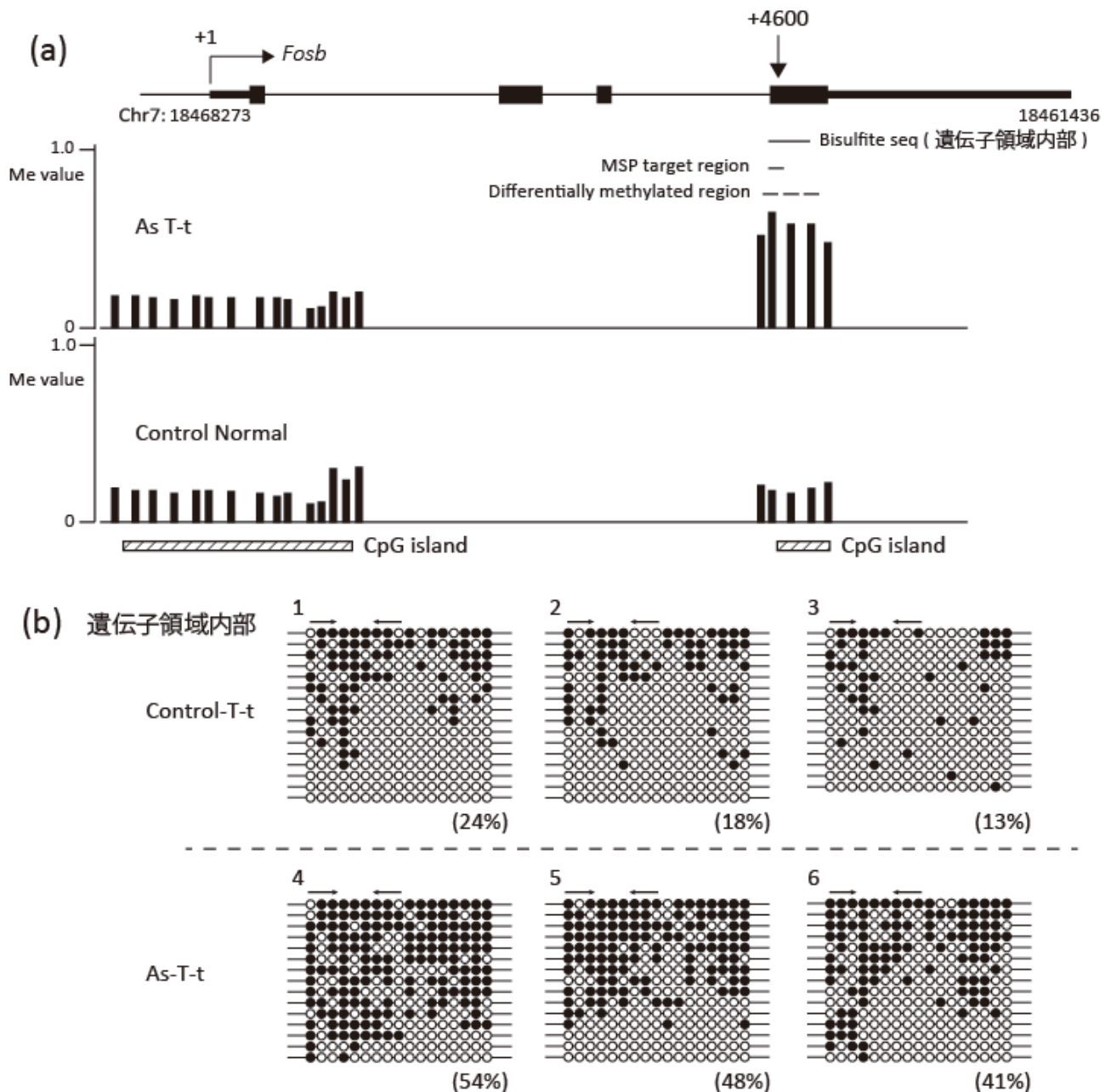


図 8 対照群腫瘍組織 (Control T-t) とヒ素曝露群腫瘍組織 (As T-t) における Fosb 領域のバイサルファイトシーケンス (a) Fosb 遺伝子領域の模式図。黒太線は mRNA、黒四角はエクソンを示す。縦の矢印は、MSP プライマーの転写開始点からの位置を示す。縦棒は、ヒ素曝露群腫瘍組織 (As T-t) と対照群正常肝臓 (Control Normal) における CpG island マイクロアレイの各プローブの Me value を示している。破線は、MeDIP-CpG island マイクロアレイで、本研究の条件でメチル化変化ありと判断したプローブの位置を示す。白の斜線は、CpG island を示す。(b) 図 7 のサンプル 1-6 のバイサルファイトシーケンス。●がメチル化シトシン、○がシトシンを示す。矢印は MSP プライマーの位置を、括弧内の数字はメチル化シトシンとシトシンの数から計算したメチル化シトシンの割合を示す。

領域内部の DNA メチル化は、ヒ素曝露群の腫瘍組織で増加することから、この領域の DNA メチル化は他の原因で発症した肝腫瘍とヒ素が原因で発症した肝腫瘍を区別可能な DNA メチル化マーカーになる可能性が示唆された¹⁵⁾。しかし、ROC カーブから求めた特異度および感度がそれほど高くないため、ヒ素が原因で発症した肝腫瘍を高確率で判定するためには、*Fosb* 遺伝子領域内部のメチル化に加えて、他の複数の領域も検討しそれらを合わせて DNA メチル化マーカーとする必要性が考えられた。

リアルタイム PCR による *Fosb* 遺伝子発現解析

Fosb の DNA メチル化レベルが対照群とヒ素曝露群の肝腫瘍組織で変化することが明らかになったため、リアルタイム PCR により *Fosb* の遺伝子発現を検討した。その結果、ヒ素曝露群の肝腫瘍組織における *Fosb* の発現は対照群及びヒ素曝露群の他の肝臓組織よりも約 10 倍高いことが明らかになった (図 9)。

一般的に、遺伝子プロモーター領域の CpG island の DNA メチル化は、その遺伝子発現の抑制に働くことが知られている。一方、最近になり、遺伝子領域内部の DNA メチル化とその遺伝子発現の増加が対応することが報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。本研究では、ヒ素曝露群で *Fosb* の遺伝子領域内部のメチル化は増加していたが、*Fosb* プロモーター領域は対照群と比較して変化がなく完全に非メチル化状態のままだった。したがって、ヒ素曝露群の肝腫瘍組織における *Fosb* 発現の増加は、*Fosb* 遺伝子領域内部の DNA メチル化と関連があることが示唆された。遺伝子領域内部の DNA メチル化と発現増加の対応については、いくつかのメカニズムが報告されている^{18,19)}。たとえば、遺伝子領域内部の DNA メチル化はアンチセンス鎖の転写産物の発現を抑制し、その結果センス鎖の転写産物の発現を抑制することなどが考えられているが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

Fosb は、転写因子 AP1 を構成する Fos ファミリータンパク質の 1 つである。AP1 は ERK リン酸化により活性化され、腫瘍形成に関連があることが報告されている²⁰⁾。我々の最近の研究から、ヒ素曝露群では *Ha-ras* の変異をもった腫瘍が高率に発症していることが明らかになっている¹²⁾。変異により *Ha-ras* は活性化され、Raf-ERK 経路を活性化することが報告されている¹³⁾。ERK 経路は AP1 活性化に関与するため²¹⁾、*Fosb* の発現増加は *Ha-ras* 変異の下流であることが

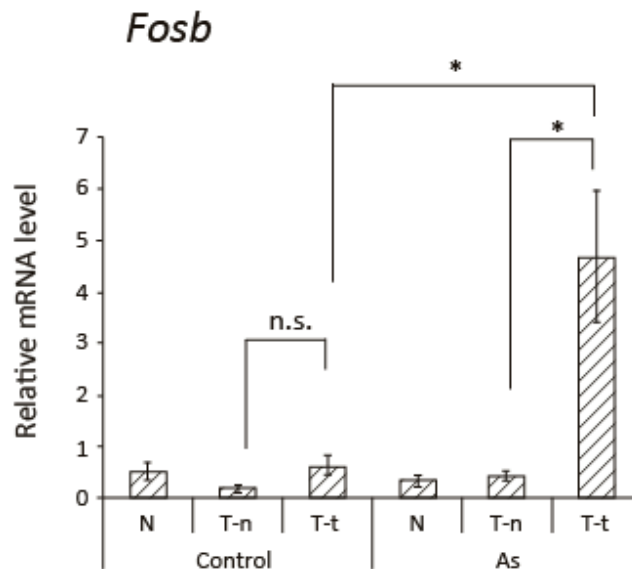


図 9 ヒ素曝露群腫瘍組織における *Fosb* 遺伝子発現変化

N: 正常肝臓、T-n: 腫瘍が存在する肝臓の非腫瘍組織、T-t: 腫瘍が存在する肝臓の腫瘍組織 (各 6 個体) における *Fosb* 遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。*Fosb* の遺伝子発現量は 18S rRNA の遺伝子発現量でノーマライズした。2 群間で t 検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意な差がある (*) と判定した。n.s. は、有意差がないことを示している。

考えられ、ヒ素曝露群で肝腫瘍が増加するメカニズムに関与する可能性が示唆された。

C マウス妊娠期無機ヒ素曝露がF2肝腫瘍に及ぼす影響

上述のC3Hマウスの妊娠期無機ヒ素曝露の実験系は、妊娠8日から18日に母親に無機ヒ素を投与するというプロトコルである。マウスの胎児(F1)では、妊娠7.25日に孫世代(F2)を形成する生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞が体内に出現する。始原生殖細胞は盛んに増殖しながら分化するが、分化に伴ってゲノムのDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾(エピゲノム)は大きな変化を起こす。このエピゲノムは次世代を作るために重要であり、この修飾が攪乱されると次世代を形成するプログラムが変化する可能性がある。そこで本研究では、C3Hマウスの妊娠8日から18日の無機ヒ素投与によるF2への影響について検討した。

はじめに小規模実験によって、対照群の雌雄を交配して得たF2雄22匹および妊娠期ヒ素曝露群雌雄を交配して得たF2雄19匹について74週令以降に肝腫瘍の発症率を調べたところ、対照群F2で32%、ヒ素群F2で47%のマウスに肝腫瘍が観察され、ヒ素群F2雄で腫瘍の増加傾向が観察された。また先に行った研究で、妊娠期無機ヒ素曝露によってF1雄の正常肝臓で対照群と比較して発現が2倍以上変化する遺伝子が4つ見つかったため、53週令と80週令のF2雄の正常肝臓でこれらの遺伝子発現の変化を調べたところ、F2でもCC群と比較してAA群で統計的に有意に発現が変化しており、胎児期ヒ素曝露の影響がF2に現れていることが確認された(図10)。ただし、F1とF2で妊娠期ヒ素曝露による変化の方向は逆であった²²⁾。

次に対照群F2およびヒ素群F2の正常肝および腫瘍肝の非腫瘍組織と腫瘍組織について、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、対照群の腫瘍組織と比較してヒ素群F2の腫瘍組織では、酸化的リン酸化やミトコンドリア機能障害に関連する経路の変化が示され、またNF- κ B経路の活性化が示唆され、F2の肝腫瘍増加に関与する可能性が考えられた。

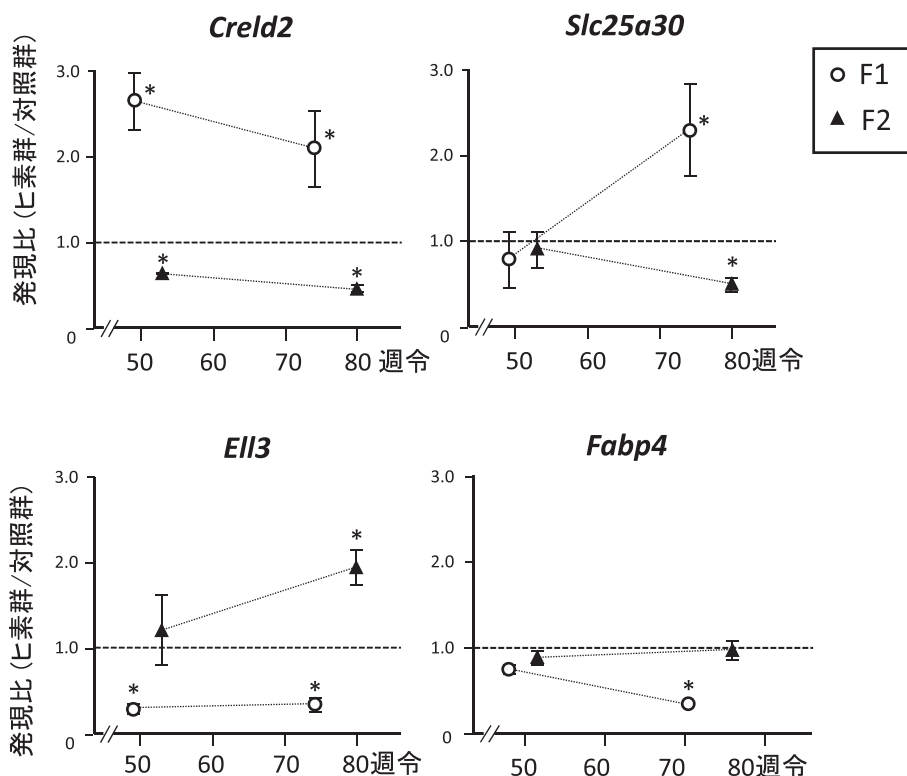


図10 妊娠期ヒ素曝露群F1およびF2で、対照群と比較して発現が変化する遺伝子
1群4-6匹の肝臓正常組織からRNA画分を調製し、遺伝子発現量をreal-time PCRで測定し、CPBを内部標準として補正した。グラフは対照群の値に対するヒ素群の比を示し、エラーバーはSEを示す。*は対照群とヒ素群で有意差(p<0.05)のある値。

また、C3H マウスの肝腫瘍で発現が変化する遺伝子の中から腫瘍増加に機能的に関与する遺伝子候補を抽出する方法の一つとして、ヒトの公開データベースである The Cancer Genome Atlas からヒト肝細胞癌における RNA seq データを取得し、本研究におけるマウス肝腫瘍の遺伝子発現変化と比較し、共通に変動するものを選抜した²²⁾。その結果、ヒトとマウスの腫瘍で共通に発現が増加する遺伝子 316 個、減少する遺伝子 135 個が見つかった(図 11)。これらの中から、妊娠期ヒ素曝露によってさらに発現が変動する遺伝子について引き続き検討を行っている。

本研究の結果から妊娠期ヒ素曝露によって F2 の肝臓で遺伝子発現変化が起こることが示され、また腫瘍が増加することが示唆されたことから、この結果を発展させて F2 への影響が F1 雌雄のどちらから F2 へ伝わるかの検討も合わせて、より大きな規模で対照群と妊娠期ヒ素曝露群 F1 雌雄の組み合わせ交配を行い、腫瘍の発症率を調べる研究に発展させた。その結果、妊娠期ヒ素曝露群 F1 雌の子である F2 と比較して F1 雄の子である F2 で肝腫瘍が有意に増加することが示され、すなわち F1 精子を介して肝腫瘍増加の形質が F2 に伝わることを示唆された。その結果については「環境化学物質の「多世代にわたる後発影響」の機序に関する研究(所内公募研究)」報告書で報告の予定である。

また妊娠期ヒ素曝露による F2 での肝腫瘍増加への DNA メチル化変化の関与、および F1 精子における DNA メチル化変化については、Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 法による解析を外部資金等によって実施し、研究を進展させている。

妊娠期の化学物質曝露による F2 (多世代) 影響や、さらに F3 以降の世代に受け継がれる継世代影響に関しては、分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究ではヒ素曝露が F2 世代のマウスで肝腫瘍を増加させるという多世代影響を見出し、遺伝子発現変化を中心に解析することにより、ヒ素の発癌促進作用に関して新たな影響を見出し、メカニズムの手掛かりを得ることができた。また、さらにエピジェネティクスの関与などを検討していくための基盤となる研究成果を得た。

D 無機ヒ素曝露によるリンパ球増殖抑制のメカニズム

ヒ素を含む地下水の摂取により免疫抑制が引き起こされることが報告されている²³⁾。これまでの研究で、無機ヒ素が免疫細胞(リンパ球)において細胞周期の制御に関連する E2F ターゲット遺伝子の発現変化を誘導し、リンパ球の増殖を抑制すること²⁴⁾、またその際に Rb ファミリータンパクである p130 が増加することを明らかにしてきた²⁵⁾。本研究では無機ヒ素によるリンパ球増殖抑制の分子メカニズムについてさらなる検討を行った。以下に無機ヒ素曝露によるリンパ球増殖抑制の詳細なメカニズムを解明するために、マウス B リンパ腫細胞株 A20 細胞への亜硝酸ナトリウム曝露を行った結果を示す。本研究は主に 24 時間曝露と慢性曝露を模した長期間曝露の影響を検討したため、24 時間曝露を行った場合と、8、14 日間の長期間曝露を行った場合に分けて述べる。

24 時間ヒ素曝露による p130 増加を介した細胞周期の停止

これまでに、A20 細胞への無機ヒ素曝露によって細胞周期の G0/G1 期が停止すること、RB ファミリータンパク質である p130 が増加することは明らかになっていたが、p130 の増加が G0/G1 期の停止に寄与しているかは不明であった。

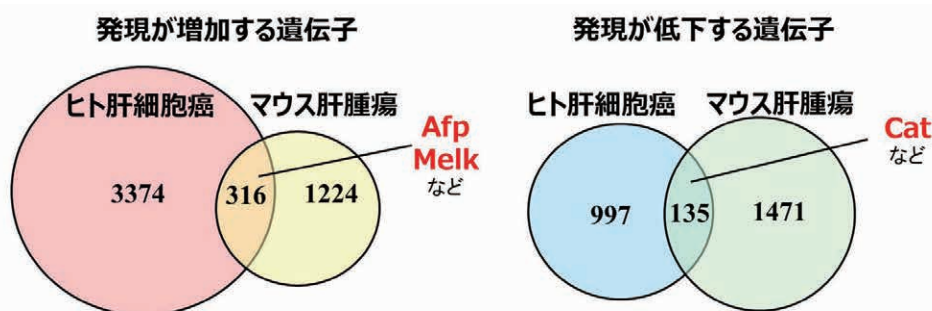


図 11 ヒト肝細胞癌と C3H マウス肝腫瘍で共通して発現が変化する遺伝子の選抜
選抜の方法は方法の項に記した。

そこで、まずはヒ素曝露によって誘導される p130 を抑制することで G0/G1 期の停止が減弱されるか検討を行った。ヒ素曝露によって増加する p130 を siRNA によってノックダウンすると、ヒ素曝露による G0/G1 期の停止が減弱された。このことから p130 はリンパ球においてヒ素曝露が誘導する細胞増殖抑制に寄与することが示唆された (図 12)。

p130 を含む Rb ファミリータンパク質はリン酸化・ユビキチン化を経てプロテアソームによって分解されることが報告されている^{26,27)}。そこで A20 細胞における p130 の制御にもこの経路が働いているか検討した。ユビキチン・プロテアソーム阻害剤である MG-132 を培地に添加すると、ヒ素曝露を行わない場合にも p130 が蓄積した。また、ウエスタンブロット法によって検出されたバンドに関し、ヒ素曝露によって増加する p130 は、MG-132 添加によって誘導された p130 のバンドよりも移動度が高かった。以上の結果から p130 はリン酸化・ユビキチン化経路によって分解をうけており、ヒ素曝露はリン酸化を阻害することで p130 を蓄積させることが明らかになった。

p130 を含む RB ファミリータンパク質のリン酸化制御機構としてはサイクリン依存性キナーゼインヒビターの関与が報告されている²⁸⁻³⁰⁾。本研究では予備検討でヒ素曝露によって遺伝子発現量が増加した p16 と p21 の関与を検討した。p21 と p16 それぞれを siRNA によってノックダウンし、ヒ素曝露による p130 増加への影響を検討したところ、p21 のノックダウンでは変化が認められなかったが、p16 のノックダウンによってヒ素曝露によって増加する p130 の蓄積が減弱されていた。さらに共免疫沈降法で、ヒ素曝露によって p16-cdk4 複合体の形成量が増加していることが明らかになった (図 13)。

以上の結果より、ヒ素が p16 を増加させ、p16 が cdk4 と複合体を形成することによって、p130 のリン酸化を阻害し、その結果ユビキチン化・プロテアソーム分解が抑制されることによって p130 が蓄積し、蓄積した p130 が G0/G1 期停止をおこすという、ヒ素による細胞増殖抑制の新規メカニズムを見出した (図 14)²⁵⁾。

さらに、無機ヒ素曝露の作用機序として活性酸素種の産生が報告されていることから⁵⁾、A20 細胞へ無機ヒ素曝露を行うことで、活性酸素種が増加しているか検討を行った。活性酸素種の検出には細胞内エステラーゼ活性によって脱ア

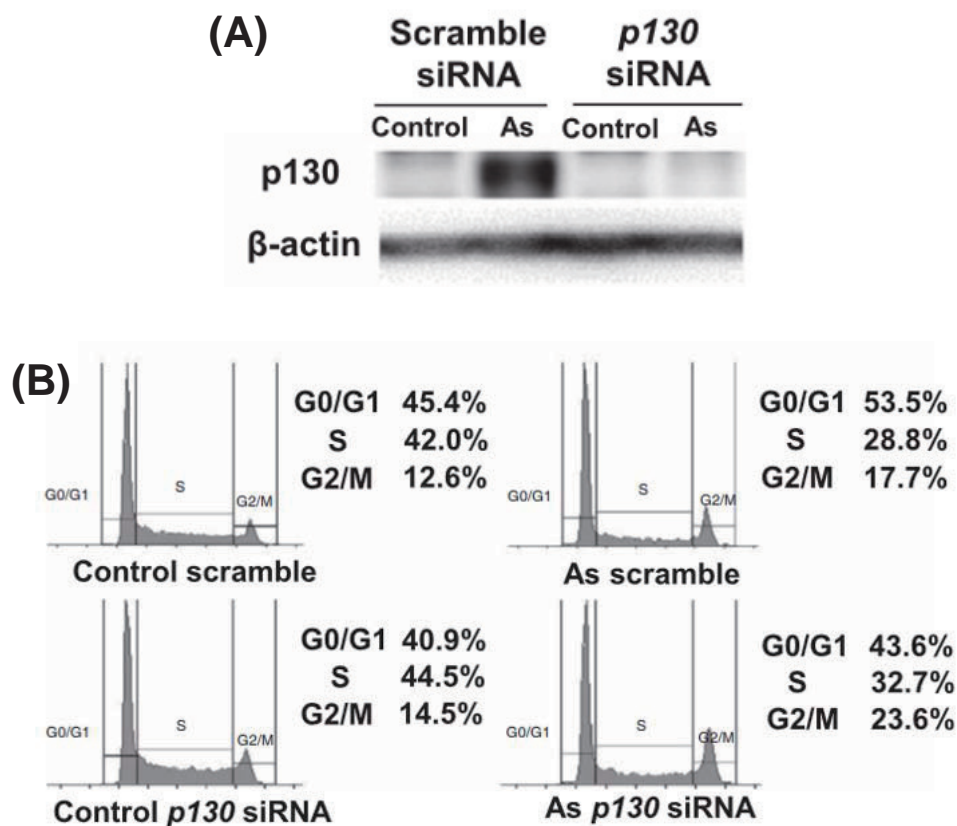


図 12 p130 ノックダウンによる細胞周期への影響

(A) タンパク質量の変化 (ハウスキーピングとして β-actin のタンパク質量を測定した)、
 (B) 細胞周期の変化 (縦軸：細胞数。横軸：核を染めた試薬による蛍光強度)

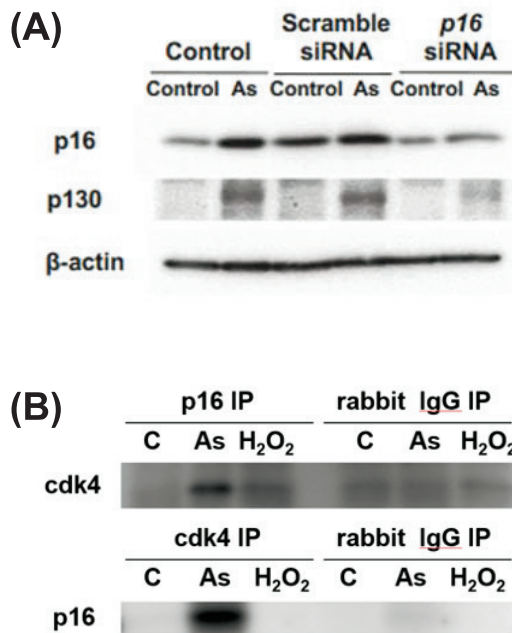


図 13 サイクリン依存性キナーゼインヒビターのノックダウンによるヒ素曝露が誘導する p130 への影響

(A) p16 ノックダウンによるタンパク質量の変化と p130 タンパク質量の変化、(B) p16-cdk4 複合体の形成 (上段: p16 抗体で免疫沈降をし、cdk4 抗体で検出した結果。下段: cdk4 抗体で免疫沈降をし、p16 抗体で検出した結果)

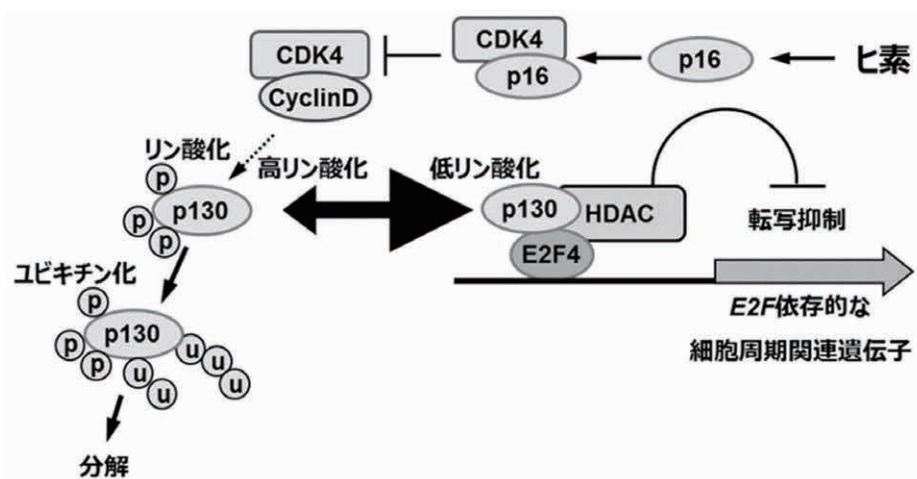


図 14 リンパ球における 24 時間ヒ素曝露による細胞増殖抑制の分子メカニズムの概図

セチル化後、活性酸素種によって酸化されることで蛍光を示す DCFH-DA を使用した。測定の結果、A20 細胞への曝露によって細胞内活性酸素種の増加が観察された。しかし、代表的な活性酸素種である過酸化水素の曝露では p16 が誘導されるものの、p16-cdk4 複合体は増加せず (図 13)、その下流の p130 増加および G0/G1 期停止も観察されなかった。さらに、エピジェネティックな制御機構においてもヒ素曝露と過酸化水素曝露を比較すると、ヒ素曝露でのみヒストン修飾酵素 Ezh2 の遺伝子発現量およびタンパク質量が抑制されていることが明らかとなった。

このことからヒ素曝露で誘導される細胞増殖の抑制は、過酸化水素曝露では誘導されず、ヒ素特異的な作用が存在する可能性が考えられた。

長期間ヒ素曝露による細胞老化の誘導

慢性ヒ素曝露による影響は長期間の曝露の影響なので、それを模した実験系として8、14日間の長期間ヒ素曝露を行った。長期間ヒ素曝露を行った場合には、24時間曝露を行った場合と同様に、細胞増殖の抑制が起きていた。また、培地からヒ素を除いた場合の細胞増殖を観察したところ、長期ヒ素曝露では細胞増殖の回復が24時間曝露と比較して遅れていた。また、細胞周期を観察した結果、長期間ヒ素曝露で顕著なG0/G1期の停止が認められ、p130のタンパク質量も顕著に増加していた(図15)。さらに、顕微鏡観察の結果、長期ヒ素曝露では細胞老化の特徴と一致する細胞の巨大化および扁平化が認められた。加えてSA-βgal染色を行った結果、24時間曝露では細胞は全く呈色しなかったが、長期曝露を行うことで、緑色に呈色する細胞が出現した(図16)。また、その他の細胞老化マーカーであるp21の遺伝子発現量も顕著に増加しており、これらの結果から、A20細胞は長期間ヒ素曝露を行うことによって不可逆的な細胞増殖の停止である細胞老化になることが新たに明らかになった³¹⁾。次に細胞老化を誘導する要因として、DNA損傷の蓄積が報告されているため³²⁾、DNA損傷関連遺伝子の発現量に着目した。シトシンをウラシルに変換する脱アミノ化酵素である*Aid*、*Apobec1*は長期間のヒ素曝露によって有意に発現が増加していた。一方DNA損傷修復遺伝子の遺伝子発現量を調べたところ、検討した遺伝子のうちヌクレオチド除去修復以外の全ての遺伝子でヒ素曝露によって発現が抑制されていた。このことから、リンパ球における長期間のヒ素曝露は、DNA損傷誘導遺伝子の活性化およびDNA損傷修復遺伝子の発現低下による修復能力の低下の双方の影響によりDNA損傷を蓄積することが示唆された³¹⁾。

以上の結果より、長期間の曝露では、24時間曝露で見られたG0/G1期の停止とp130の増加が顕著になり、新たに細胞老化がおこることが明らかになった。その細胞老化の誘導の要因として脱アミノ化酵素の遺伝子発現増加およびDNA損傷修復遺伝子の遺伝子発現抑制に伴うDNA損傷の蓄積が示唆された(図17)。

本研究によりリンパ球において長期間ヒ素曝露が細胞老化を誘導するというヒ素の新たな作用メカニズムを明らかにした。細胞老化は自身の増殖は不可逆的に停止させるが、炎症性サイトカインなどの分泌物により周囲の細胞を刺激し、発がんに関与することも報告されている。今後は他の臓器においても、ヒ素曝露が細胞老化を誘導し、その結果発がんを誘導するかどうか検討する予定である。

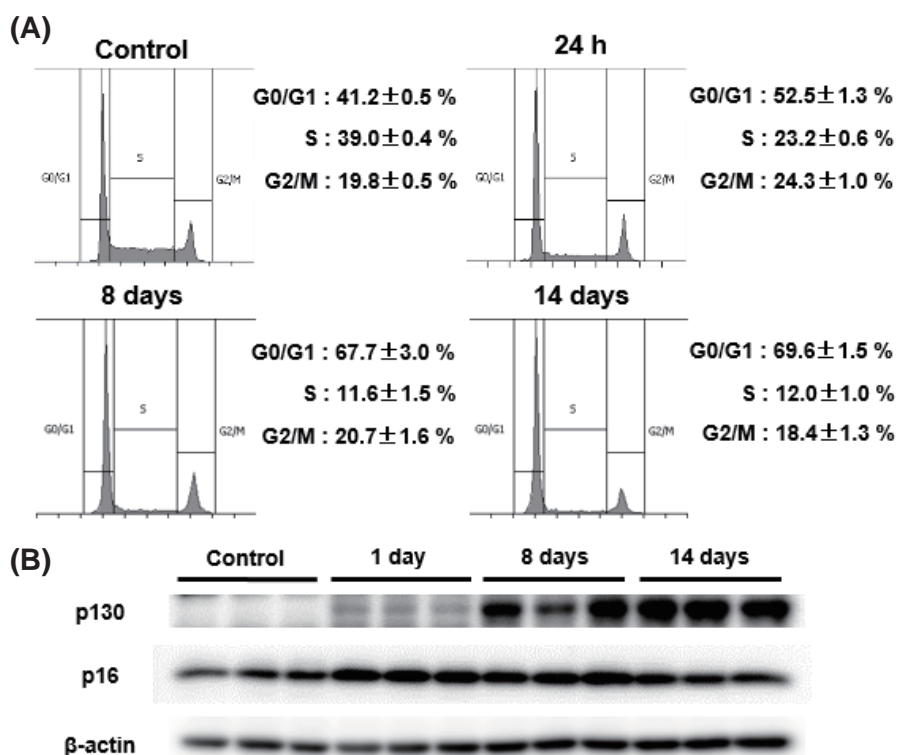


図15 長期間ヒ素曝露による細胞周期の変化とp130、p16のタンパク質量の変化
 (A) 細胞周期(縦軸:細胞数。横軸:核を染めた試薬による蛍光強度)、
 (B) p130、p16タンパク質量の変化

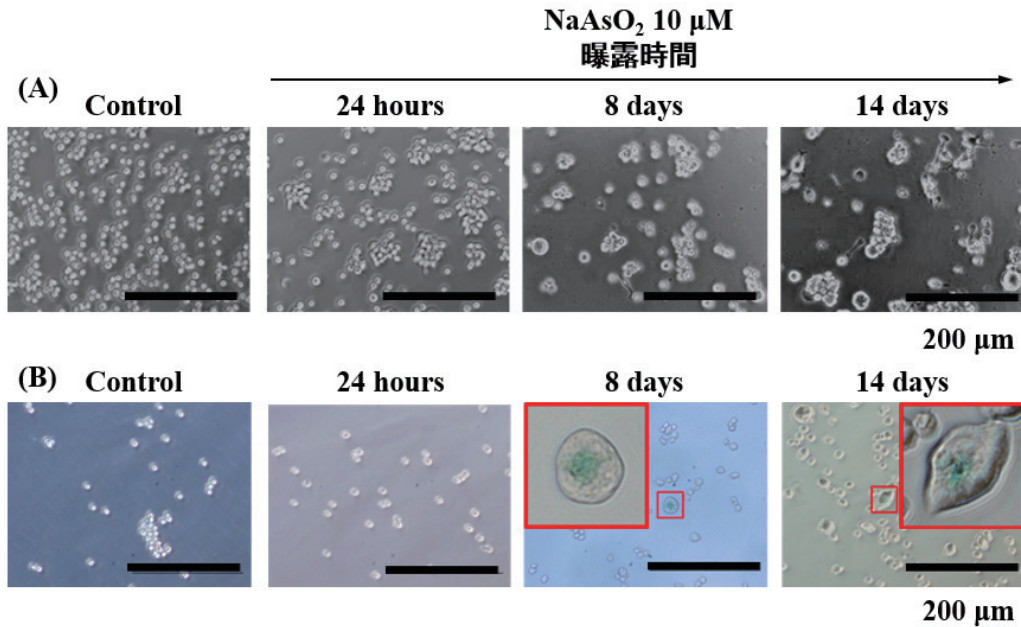


図 16 長期間ヒ素曝露による細胞の形態学的な変化と SA-β gal 陽性細胞の出現
(A) 細胞の形態学的な変化、(B) SA-β gal 染色

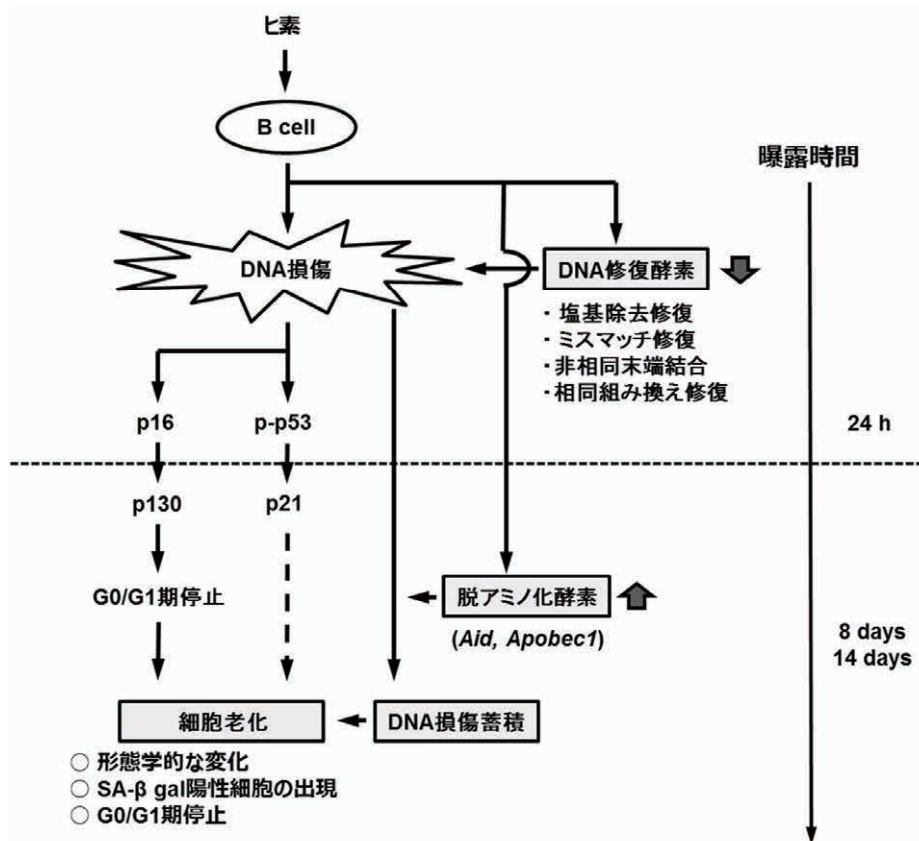


図 17 長期間ヒ素曝露による細胞老化誘導の概図

2.2.2 無機ヒ素の発達神経毒性影響評価

(1) 目的と経緯

胎児期や幼児期など発達期の脳は、金属類や残留性有機汚染物質などの有害化学物質に対して脆弱であり、その時期の化学物質曝露は脳機能に永続的な影響を与える可能性が指摘されている。我が国の森永ヒ素ミルク事件における中毒患者のフォローアップ研究から乳児期のヒ素の経口曝露が中枢神経障害の有病率を増加させる可能性が示されてい

る³³⁾。また、メキシコ、バングラデシュ、中国、台湾における疫学的研究からも、ヒ素の慢性曝露は子どもの認知機能を低下させることが示されている³⁴⁻³⁹⁾。一方、動物実験でも、胎児期や幼児期にヒ素に曝露されたラットやマウスは学習、記憶、情動行動、自発運動量などに関わる行動異常を示すことが報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。しかしながら、このような行動異常が脳のどの領域のどのような構造的・機能的な異常に起因するのかは十分に明らかになっておらず、ヒ素曝露に対する予防・治療法を確立する上での障壁となっている。

そこで、本研究ではマウスを動物モデルとして用いて、無機ヒ素の発達期曝露がどのような行動異常を誘導するのか、全自動行動・記憶解析システム IntelliCage で解析するとともに、脳の構造的変化に着目し、大脳皮質に存在する神経細胞にゴルジ染色を施して、神経突起やシナプス形成に必要なスパインの微細構造解析を行った。また、*in vivo* 解析に加えて、胎児期の大脳皮質から作製した初代培養神経細胞に対して無機ヒ素曝露を行い、*in vivo* 解析と類似の構造的異常が起こるか確認するとともに、異常に影響する分子基盤の解明を試みた。

(2) 方法

A 胎児期無機ヒ素曝露マウスの解析

曝露方法及び行動試験の概要

妊娠期 8-18 日目までの C3H マウスの飲水に 85 ppm の亜ヒ酸ナトリウムを添加することで、母体経由で無機ヒ素を曝露する胎児期無機ヒ素曝露群を作製した。対照群には、亜ヒ酸ナトリウムを含まない水を妊娠中に与えた母体から産まれた個体を使用した。それぞれの群が 60 週齢に達した後、全自動行動・記憶解析システム IntelliCage (TSE Systems, Germany) にマウスを導入して行動解析を行った。IntelliCage では、背中に RFID と呼ばれるマイクロチップを埋め込むことで、個々のマウスの行動を識別することが可能となる。IntelliCage には 4 隅に水飲み場も兼ねたコーナーと呼ばれる小部屋があり、マウスはどのコーナーにも自由に侵入することができる。コーナーにはセンサーが付いており、個体の侵入回数、滞在時間、飲水量といった一連の行動がリアルタイムで記録できる (図 18 A)。

IntelliCage を用いた行動柔軟性に関する検討

IntelliCage 内部にあるコーナーは一般的な学習試験で用いられるオペラント・チャンバーの役割も果たす。コーナーの内部にはマウスが鼻で押すことができるスイッチがあり、水へのアクセスはシャッターで制御ができるため、マウスは特定のコーナーに行くとスイッチを押すと飲水できるが、他のコーナーでは飲水できないといった条件を設定することで、飲水可能なコーナーを覚えさせる空間記憶課題を負荷することができる。行動柔軟性試験では、このような空間記憶課題の特徴を応用し、学習獲得期には 4 つのコーナーのうち 2 つを往復すると水が飲めることを学習させる。次に反転学習期には、今まで正解だったコーナーを不正解に、不正解だったコーナーを正解に設定を変え、さらに次々とコーナーの設定を変化させることで、課題変更が行われるという法則自体をマウスが学習し、課題の変更に対応できるか検討した (図 18 B, C)。

ゴルジ染色を用いた脳の構造的変化の検討

行動試験後のマウスの脳にゴルジ染色を施し、クリオスタット (Leica Microsystems, Germany) を用いて 60 μm の脳切片を作製し 0.1% Cresyl Fast Violet で対比染色を行った。大脳皮質の中でも特に行動柔軟性に関わると考えられている前辺縁皮質に注目して微細構造解析を行った。StereoInvestigator software (MicroBrightField Bioscience, USA) を用いて Space Ball probe analysis により神経突起長を推計した。また、NeuroLucida と Spiso-3D automated dendritic spine analysis software を用いて単位神経突起長あたりのスパイン数の検討を行った。

B 初代培養神経細胞の解析

初代培養神経細胞作製法

妊娠 17 日目の胎仔マウスより大脳皮質を取り出し、初代培養神経細胞を作製した。その際、Amata Nucleofector

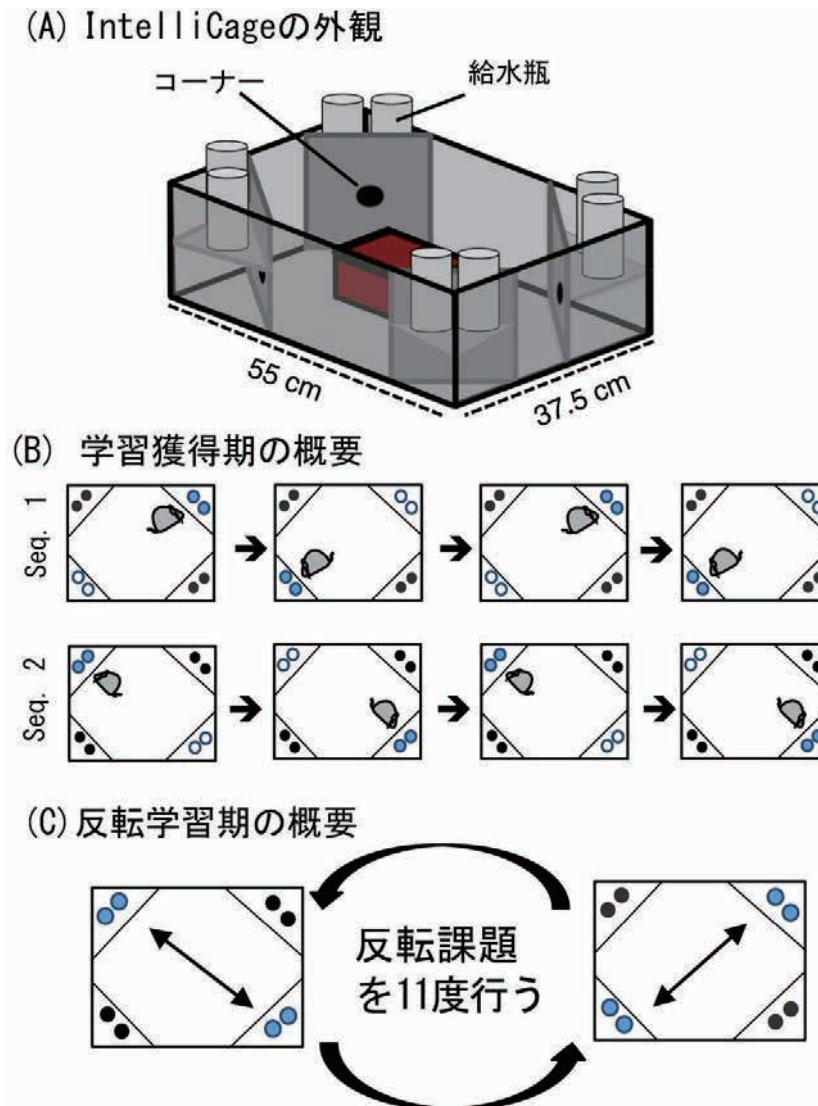


図 18 IntelliCage の概要と行動柔軟性試験の概要

(A) IntelliCage の外観、(B) 学習獲得期の概要：マウスは対角にある2つのコーナー（青丸と白丸）を交互に訪れることで飲水できるが、黒丸では飲水できないため、青丸と白丸の2つの位置を学習する必要がある。Seq1 または Seq2 のいずれかを完全に学習させた後（学習獲得期）、反転学習期に移行する。(C) 反転学習期の概要：Seq1 から2、または Seq2 から1といった形で課題を反転させる。反転学習期には反転課題を11度行う。

(Lonza, Switzerland) を用いて、CMV プロモーター下流に赤色蛍光タンパク質 mStrawberry が発現するように設計されたプラスミドを細胞の一部に遺伝子導入することで蛍光下での神経突起長計測を可能にした。このように調整した細胞培養液を、24 well cell culture plate に播種し培養した。大脳皮質の初代培養神経細胞を倒立位相差顕微鏡で観察した場合、通常培養2日目に神経突起伸長が確認でき、その後、日を追って神経突起が伸長していく。一部の解析には、NPY プロモーターの下流に、ヒト化ウミシイタケ緑色蛍光タンパク質 hrGFP が挿入された遺伝子組換えマウス (Jackson Laboratory, USA) から得られた NPY-hrGFP ニューロンを利用した。

無機ヒ素曝露評価

培養液中に亜ヒ酸ナトリウムが最終濃度 0、0.5、1、2 μM となるよう培養2日目に添加し、さらに培養を継続した。神経突起長の解析のために培養4日目に4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液によって固定した。神経細胞の蛍光画像は Leica TCS SP5 AOBS filter free Spectral confocal microscope を用いて取得した。標的となる細胞毎に Z 軸方向

に 1 μm ステップで画像を取得し、約 10 枚前後の画像を重ね合わせて 1 枚の画像として再構築した。得られた画像は ImageJ (NIH, USA) に導入したプラグイン NeuronJ を使って解析した。また、タンパク質の解析には免疫プロット法を用いた。

グルタミン酸受容体過剰発現によるレスキュー実験

神経細胞の興奮性と神経突起伸長には密接な関係があることが知られている。特に脳内に最も豊富に含まれる興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸はグルタミン酸受容体と結合することで神経突起伸長に促進的に働く。そこで、グルタミン酸受容体の一種である GluA1 を神経細胞に遺伝子導入して、亜硝酸ナトリウムによる曝露影響との相互作用を検討した。胎生 17 日目の野生型マウス的大脑皮質から調製した神経細胞をペレット状にした後、GluA1 と緑色蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質 GFP-GluA1 が CMV プロモーター下流で発現する GFP-GluA1 プラスミド・ベクターを遺伝子導入した。この場合、緑色蛍光タンパク質の局在は GluA1 の局在に依存するため神経突起全体を緑色蛍光で検出することはできない。そこで、CMV プロモーターの下流で赤色蛍光タンパク質 mStrawberry を発現するベクターを同時に遺伝子導入することによって、神経突起長や突起の分岐数を赤色蛍光で解析することを可能にした。GFP-GluA1 の対照群として、CMV プロモーター下流で GFP が発現するプラスミド・ベクターを遺伝子導入した。

(3) 結果と考察

A 胎児期無機ヒ素曝露マウスの解析

IntelliCage を用いて行動量、行動パターン、飲水量などの解析を行ったが、対照群と胎児期無機ヒ素曝露群との間で行動全般に大きな違いは認められなかった。一方、行動柔軟性試験を行ったところ、「学習獲得期」には群間で大きな違いはなかったが、「反転学習期」では、胎児期無機ヒ素曝露群が対照群と比較して有意な成績低下が認められた (図 19)。また、前辺縁皮質における微細構造解析を行ったところ、胎児期無機ヒ素曝露群において神経突起長の有意な低

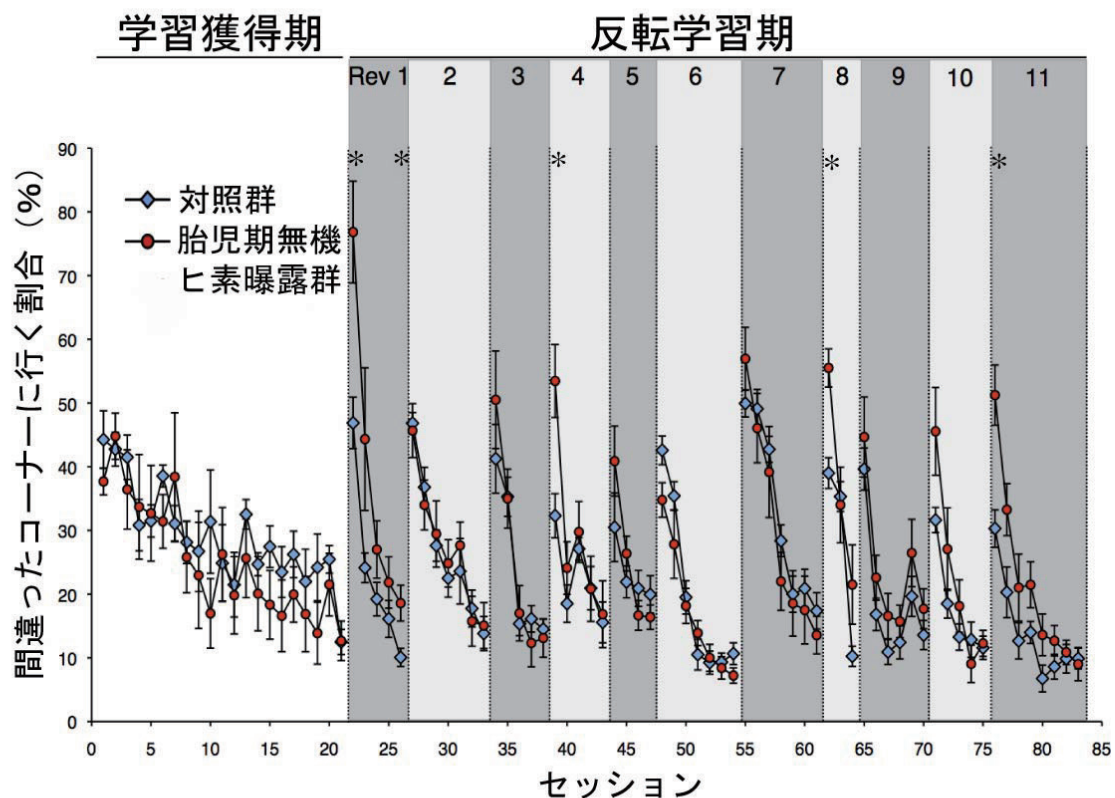


図 19 胎児期無機ヒ素曝露がマウスの行動柔軟性に与える影響

グラフは平均値 ± 標準誤差、例数：対照群 n=8、胎児期無機ヒ素曝露群 n=6、*p<0.05 (Mann-Whitney U-test)。

下が認められた (図 20 A、B)。一方、スパイン数に関しては違いが認められなかった (図 20 C、D)。

B 初代培養神経細胞の解析

用量と曝露影響の検討

初代培養神経細胞に 0、0.5、1、2 μM の用量で亜硝酸ナトリウムを曝露したところ、1 μM の亜硝酸ナトリウム曝露で有意に神経突起伸長抑制が観察され、その影響は 2 μM でより顕著になることが明らかとなった (図 21 A-E)。また逆に、0.5 μM の曝露で神経突起伸長が促進する場合があることが明らかとなった。0.5 μM 曝露による突起伸長促進は、大脳皮質の神経細胞にランダムに蛍光タンパク発現ベクターを遺伝子導入した場合には伸長傾向は見られたものの統計的有意差は認められなかったが (図 21 E)、NPY-hrGFP ニューロンを用いた検討では統計的有意差が認められ、無機ヒ素の低濃度曝露に明確な神経突起伸長作用があることが明らかになった (図 21 F-J)。この結果は、単一細胞種を標的として解析することにより、突起伸長・抑制作用の濃度依存性がより鮮明に検出できることを示唆している。

さらに、突起伸長抑制に関連したタンパク質発現に着目して詳しく検討を加えると、神経突起伸長が抑制される 1 μM 以上の亜硝酸ナトリウム曝露でグルタミン酸受容体のサブタイプである GluA1 の発現が選択的に低下することが

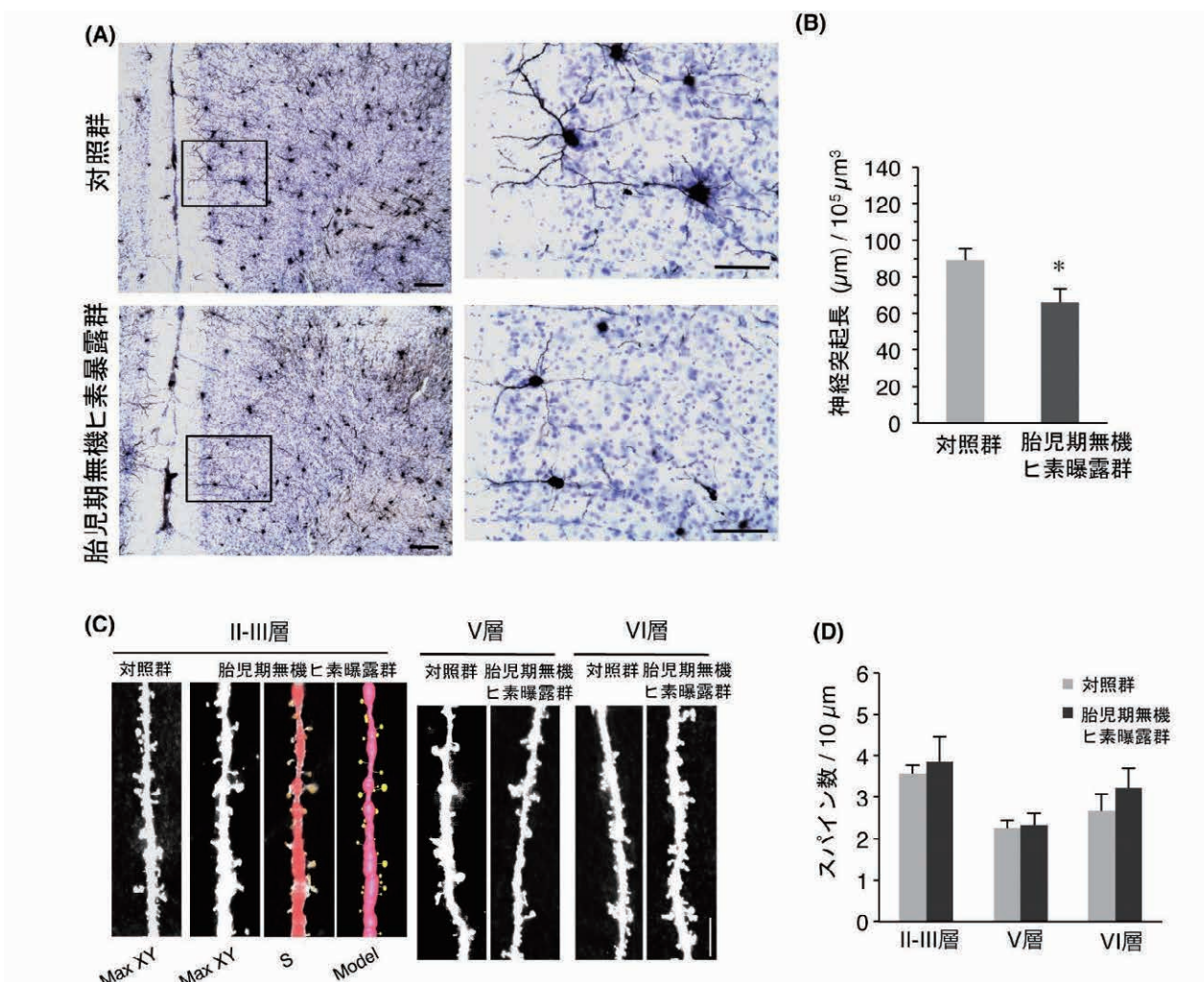


図 20 胎児期無機ヒ素曝露がマウスの前辺縁皮質における神経突起長とスパイン数に与える影響

(A) 冠状断脳切片における前辺縁皮質のゴルジ染色の顕微鏡写真。左枠内を拡大し右に表示。バー：20 μm (低倍率) 及び 10 μm (高倍率)。(B) Space ball method によって測定された推定神経突起長。平均値 \pm 標準誤差、例数：対照群 $n=7$ 、胎児期無機ヒ素曝露群 $n=5$ 。* $p<0.05$ (Student's t-test)。(C) 樹状突起におけるスパイン数の測定法。左から対照群と胎児期無機ヒ素曝露群における II-III 層の XY 平面の重ねあわせ画像 (Max XY)、Spiso-3D 画像 (S) および 3 次元モデル画像 (Model) と V、VI 層の Max XY 画像。(D) 層別のスパイン数。平均値 \pm 標準誤差。対照群 $n=7$ 、胎児期無機ヒ素曝露群 $n=5$ 。

明らかになった。

グルタミン酸受容体過剰発現によるレスキュー実験

亜ヒ酸ナトリウム曝露が、グルタミン酸受容体発現を低下させることで神経細胞の興奮性が低下し、神経突起伸長抑制が起こるといふ仮説を立て、GluA1 を過剰発現させることで突起伸長抑制を解除できるか検討を行った。GFP のみを発現する対照プラスミド・ベクターが遺伝子導入された神経細胞では、2 μM の亜ヒ酸ナトリウム曝露により突起伸長が有意に抑制された。一方、GFP-GluA1 発現プラスミド・ベクターが遺伝子導入された神経細胞では、亜ヒ酸ナトリウムを曝露された条件下でも神経突起伸長が確認された (図 22 A-E)。この結果は、亜ヒ酸ナトリウム曝露による神経突起伸長抑制作用は GluA1 発現の低下とそれに続く神経興奮性の低下に起因している可能性を示している。

C 無機ヒ素の発達神経毒性影響に関する総括

胎児期無機ヒ素曝露影響をマウス個体で評価したところ、85 ppm の亜ヒ酸ナトリウムを母体へ飲水曝露しても、産まれてきた仔の行動量、飲水量、行動パターンなど行動全般に大きな違いは認められず、また空間学習能力と関係がある行動柔軟性試験の「学習獲得期」の成績に関しても、対照群と胎児期無機ヒ素曝露群間で違いは認められなかった。

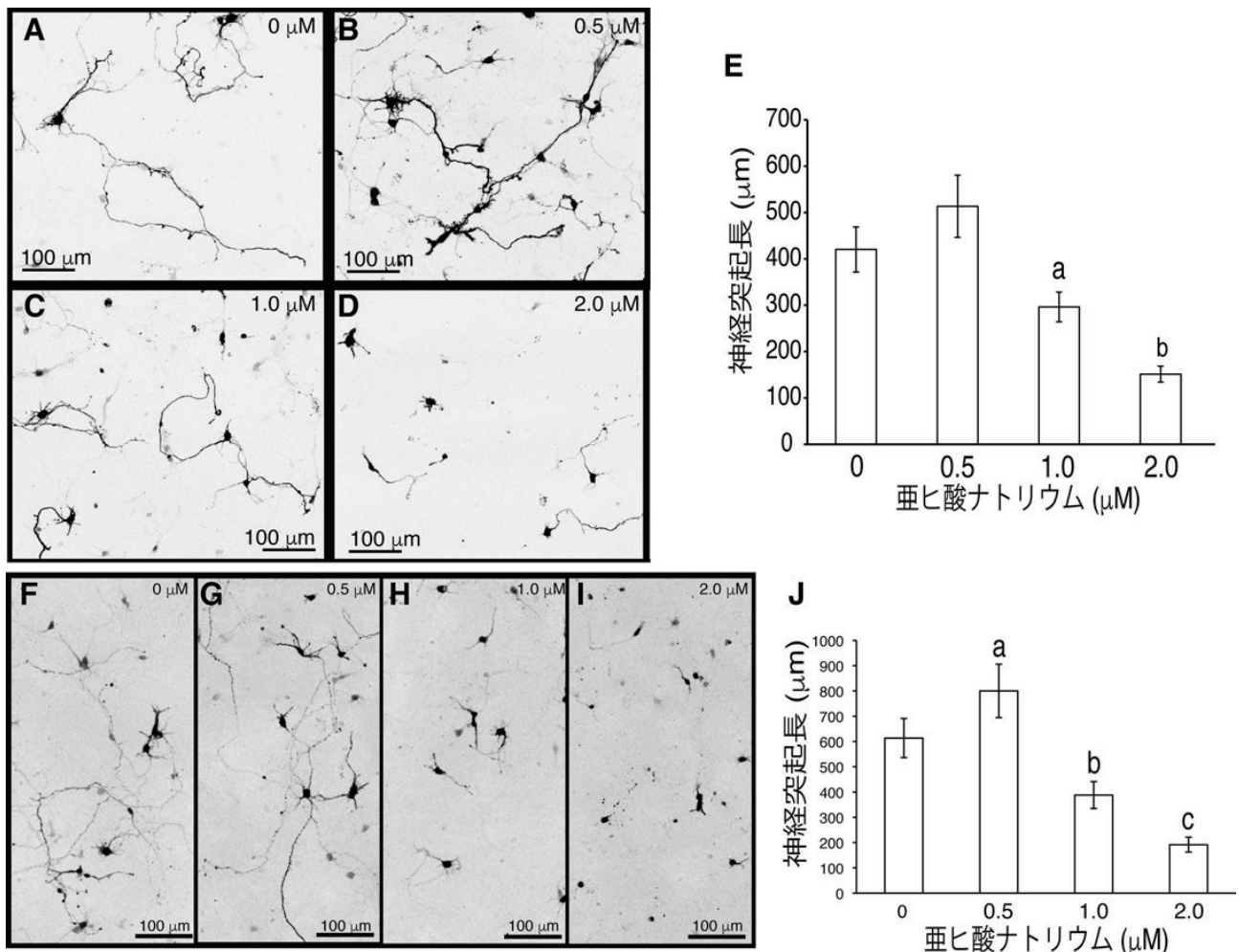


図 21 無機ヒ素曝露が初代培養神経細胞の突起伸長に与える影響

(A-D) 初代培養神経細胞に 0、0.5、1 及び 2 mM の亜ヒ酸ナトリウムを曝露した共焦点画像。(E) 1 細胞当たりの神経突起長。平均値 \pm 標準誤差。a: $p < 0.05$ vs 0 μM , $p < 0.01$ vs 0.5 μM , b: $p < 0.01$ vs 0 および 0.5 μM 。(F-I) NPY-hrGFP マウスから得られた初代培養神経細胞に 0、0.5、1 及び 2 mM の亜ヒ酸ナトリウムを曝露した共焦点画像。(J) NPY-hrGFP マウスから得られた初代培養神経細胞の 1 細胞当たりの神経突起長。平均値 \pm 標準誤差。a: $p < 0.01$ vs 1 または 2 μM , b: $p < 0.05$ vs 0 または 2 μM , c: $p < 0.01$ vs 0 μM 。統計解析は分散分析および Fisher PLSD 法を使用。

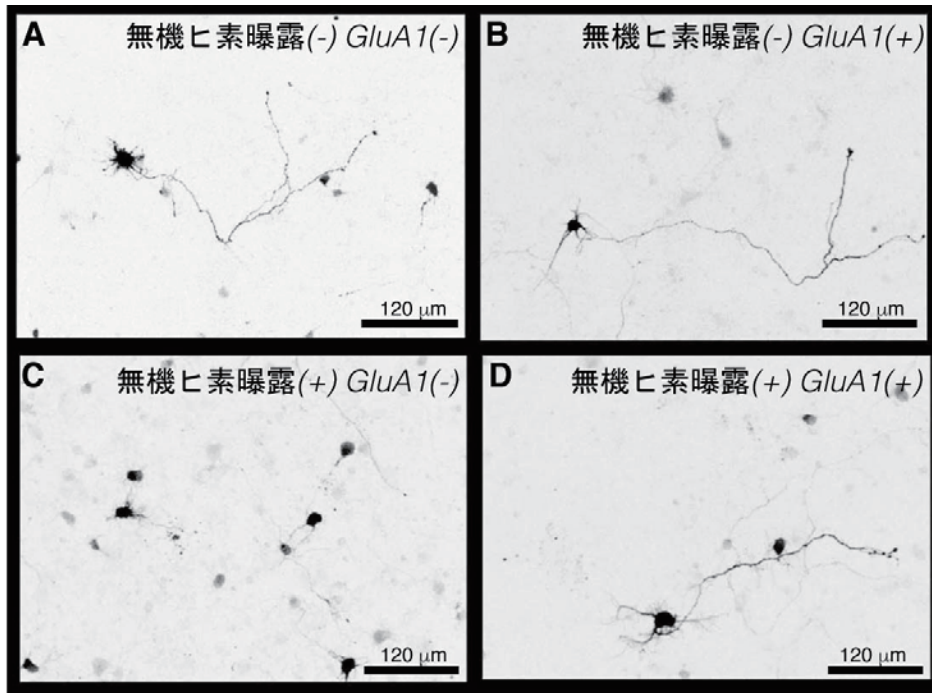


図 22 無機ヒ素の神経突起伸長抑制に対する GluA1 過剰発現による拮抗作用
 (A-D) 無機ヒ素曝露 (+): 2 μM 亜ヒ酸ナトリウム曝露、無機ヒ素曝露 (-): 曝露なし、GluA1 (+): GFP-GluA1 発現プラスミドの遺伝子導入、GluA1 (-): 対照となる GFP 発現プラスミドの遺伝子導入。(E) 1 細胞当たりの神経突起長。平均値 ± 標準誤差。統計は二元配置分散分析および Games-Howell 法を使用。a: $p < 0.05$ vs 他の全ての群、b: $p < 0.01$ vs 無機ヒ素 (-) -GluA1 (-) 群、c: $p < 0.01$ vs 無機ヒ素 (-) -GluA1 (+) 群、 $p < 0.05$ vs 無機ヒ素 (+) -GluA1 (-) 群。

一方、行動柔軟性試験の「反転学習期」の成績は、胎児期無機ヒ素曝露群で反転直後の不正解率が増加しており、行動柔軟性が低下している可能性が示唆された⁴³⁾。自閉症や ADHD を含む発達障害の典型的な症状の一つとして行動柔軟性低下が報告されており、ヒトにおける疫学調査でも無機ヒ素は発達障害を誘発する可能性が示されていることから、動物モデルを用いた今回の研究は、ヒトへの影響に類似した行動影響を捉えることに成功していると考えられる。また、脳の微細構造解析の結果は、無機ヒ素の影響により、行動柔軟性に関わる前辺縁皮質と呼ばれる大脳皮質領域の神経細胞の正常な成長が阻害された可能性を示している⁴³⁾。これらの結果を総合して考えると、前辺縁皮質における神経突起長低下が胎児期無機ヒ素曝露群の行動柔軟性低下を引き起こした可能性が考えられる。

胎児期無機ヒ素曝露がどのように神経突起長の低下を誘導するのか明らかにするため、マウスの大脳皮質から神経細胞を単離して亜ヒ酸ナトリウム曝露影響評価を行った。その結果、1 μM 以上の曝露で神経突起長低下が起こることが明らかになった。また、神経細胞の興奮性を司るグルタミン酸受容体のうち GluA1 と呼ばれる特定のサブタイプのタンパク質量が選択的に低下することが明らかになった⁴⁴⁾。さらに、この GluA1 低下が実際に神経突起長低下に結びつ



図 23 無機ヒ素の発達神経毒性機構に関する仮説

いているのか証明するために神経細胞に GluA1 を過剰発現させるレスキュー実験を行ったところ、GluA1 を過剰発現させることで神経突起長低下を防ぐことができた。

これらの研究成果をまとめたものとして、無機ヒ素は大脳皮質の中でも行動柔軟性に関わる前辺縁皮質において GluA1 発現を低下させ、発達期の神経興奮性を低下させることで神経突起伸長を抑制し、その結果、後発的な行動柔軟性を誘導するという影響モデルの仮説を提唱している（図 23）。今後は、本仮説の最も上流にあたる GluA1 低下のメカニズムをさらに詳しく検討していく予定である。

引用文献

- 1) Aiken C.E., Ozanne S.E. (2014) Transgenerational developmental programming. *Human Reproduc. Update*, 20, 63-75.
- 2) Guerrero-Bosagna C., Skinner M.K. (2012) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 354, 3-8.
- 3) Perera F., Herbstman J. (2011) Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod. Toxicol.*, 31, 363-373.
- 4) Yamashita S., Hosoya K., Gyobu K., Takeshima H., Ushijima T. (2009) Development of a novel output value for quantitative assessment in methylated DNA immunoprecipitation-CpG island microarray analysis. *DNA Res.*, 16, 275-286.
- 5) Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., Lewis A.S., Thomas D.J. (2011) Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol. Sci.*, 123, 305-332.
- 6) IARC (International Agency for Research on Cancer). (2012) Arsenic, metals, fibres and dusts. Arsenic and arsenic compounds. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 100C, 41-93.
- 7) Yamanaka K., Ohtsubo K., Hasegawa A., Hayashi H., Ohgi H., Kanisawa M., et al. (1996) Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline 1-oxide in the lungs of mice. *Carcinogenesis.*, 17, 767-770.
- 8) Waalkes M.P., Ward J.M., Liu J., Diwan B.A. (2003) Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 186, 7-17.
- 9) Waalkes M.P., Liu J., Chen H., Xie Y., Achanzar W.E., Zhou Y.S., et al. (2004) Estrogen signaling in livers of male mice with

- hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. *J. Natl. Cancer Inst.*, 96, 466–474.
- 10) Carnel A.N., Goodman J.L. (2003) The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: Altered methylation as precursor to toxicity. *Toxicol. Sci.*, 75, 229-235.
 - 11) Beck C.R., Garcia-Perez J.L., Badge R.M., Moran J.V. (2011) LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 12, 187-215.
 - 12) Nohara K., Tateishi Y., Suzuki T., Okamura K., Murai H., Takumi S., Maekawa F., Nishimura N., Kobori M., Ito T. (2012) Late-onset increases in oxidative stress and other tumorigenic activities and tumors with a Ha-ras mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic. *Toxicol. Sci.*, 129, 293-304.
 - 13) Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. (2011) RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer*, 11, 761-774.
 - 14) Cui X., Wakai T., Shirai Y., Hatakeyama K., Hirano S. (2006) Chronic oral exposure to inorganic arsenate interferes with methylation status of p16INK4a and RASSF1A and induces lung cancer in A/J mice. *Toxicol. Sci.*, 91, 372-381.
 - 15) Suzuki T., Yamashita S., Ushijima T., Takumi S., Sano T., Michikawa T., Nohara K. (2013) Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. *Cancer Sci.*, 104, 1575-85.
 - 16) Hellman A., Chess A. (2007) Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*, 315, 1141-1143.
 - 17) Ball M.P., Li J.B., Gao Y., et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 27, 361-368.
 - 18) Rauch T.A., Wu X., Zhong X., Riggs A.D., Pfeifer G.P. (2009) A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 671–678.
 - 19) Suzuki M.M., Bird A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.*, 9, 465-476.
 - 20) Milde-Langosch K. (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur. J. Cancer*, 41, 2449-2461.
 - 21) Frost J.A., Geppert T.D., Cobb M.H., Feramisco J.R. (1994) A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3844-3848.
 - 22) Nohara K., Okamura K., Suzuki T., Murai H., Ito T., Shinjo K., et al. (2016) Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring. *J. Appl. Toxicol.*, 36, 105-12.
 - 23) Smith A.H., Marshall G., Yuan Y., Liaw J., Ferreccio C., Steinmaus C. (2011) Evidence from Chile that arsenic in drinking water may increase mortality from pulmonary tuberculosis. *Am. J. Epidemiol.*, 173, 414-420.
 - 24) Nohara K., Ao K., Miyamoto Y., Suzuki T., Imaizumi S., Tateishi Y., Omura S., Tohyama C., Kobayashi T. (2008) Arsenite-induced thymus atrophy is mediated by cell cycle arrest: a characteristic downregulation of E2F-related genes revealed by a microarray approach. *Toxicol. Sci.*, 101, 226-238.
 - 25) Okamura K., Miki D., Nohara K. (2013) Inorganic arsenic exposure induces E2F-dependent G0/G1 arrest via an increase in retinoblastoma family protein p130 in B-cell lymphoma A20 cells. *Genes to Cells.*, 18, 839-849.
 - 26) Tedesco D., Lukas J., Reed S.I. (2002) The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF (Skp2). *Genes Dev.*, 16, 2946–2957.
 - 27) Kolupaeva V., Janssens V. (2012) PP1 and PP2A phosphatases—cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. *FEBS J.*, 280, 627-643.
 - 28) Canepa E.T., Scassa M.E., Ceruti J.M., Marazita M.C., Carcagno A.L., Sirkin P.F., Ogara M.F. (2007) INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life.*, 59, 419-426.
 - 29) Henley S.A., Dick F.A. (2012) The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell

division cycle. *Cell Div.*, 7, 10.

- 30) Romanov V.S., Pospelov V.A., Pospelova T.V. (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Bio-chemistry (Mosc.)*, 77, 575-584.
- 31) Okamura K., Nohara K. (2016) Long-term arsenite exposure induces premature senescence in B-cell lymphoma A20 cells. *Arch. Toxicol.*, 90, 793-803.
- 32) Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S. (2010) The essence of senescence. *Genes. Dev.*, 24, 2463-2479.
- 33) Dakeishi M., Murata K., Grandjean P. (2006) Long-term consequences of arsenic poisoning during infancy due to contaminated milk powder. *Environ. Health.*, 5, 31.
- 34) Calderon J., Navarro M.E., Jimenez-Capdeville M.E., Santos-Diaz M.A., Golden A., Rodriguez- Leyva I., et al. (2001) Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ. Res.*, 85, 69-76.
- 35) Wang S.X., Wang Z.H., Cheng X.T., Li J., Sang Z.P., Zhang X.D., et al. (2007) Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin country, Shanxi province, China. *Environ. Health. Perspect.*, 115, 643-7.
- 36) Hamadani J.D., Tofail F., Nermell B., Gardner R., Shiraji S., Bottai M., et al. (2011) Critical windows of exposure for arsenic-associated impairment of cognitive function in pre-school girls and boys: a population-based cohort study. *Int. J. Epidemiol.*, 40, 1593-604.
- 37) Wasserman G.A., Liu X., Parvez F., Ahsan H., Factor-Litvak P., Kline J., et al. (2007) Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihaazar, Bangladesh. *Environ. Health. Perspect.*, 115, 285-9.
- 38) Wasserman G.A., Liu X., Parvez F., Ahsan H., Factor-Litvak P., Kline J., et al. (2004) Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihaazar, Bangladesh. *Environ. Health. Perspect.*, 112, 1329-33.
- 39) Tsai S.Y., Chou H.Y., The H.W., Chen C.M., Chen C.J. (2003) The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology*, 24, 747-53.
- 40) Rodriguez V.M., Carrizales L., Mendoza M.S., Fajardo O.R., Giordano M. (2002) Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 24, 743-50.
- 41) Xi S., Sun W., Wang F., Jin Y., Sun G. (2009) Transplacental and early life exposure to inorganic arsenic affected development and behavior in offspring rats. *Arch. Toxicol.*, 83, 549-56.
- 42) Martinez-Finley E.J., Ali A.M., Allan A.M. (2009) Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 94, 271-7.
- 43) Aung K.H., Kyi-Tha-Thu C., Sano K., Nakamura K., Tanoue A., Nohara K., Kakeyama M., Tohyama C., Tsukahara S., Maekawa F. (2016) Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Front. Neurosci.*, 10, 137.
- 44) Maekawa F., Tsuboi T., Oya M., Aung K.H., Tsukahara S., Pellerin L., Nohara K. (2013) Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons. *Neurotoxicology*, 37, 197-206.

2.2.3 環境汚染物質の免疫・アレルギーに及ぼす影響に関する作用機構の解明

(1) 目的と経緯

近年、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、花粉症等のアレルギー疾患が小児・若年層を中心に急増している。アレルギー増加は環境要因の急変に起因するところが大きいと考えられ、衛生環境、食環境、住環境の変化による影響に加え、これらの変化とともに増加・多様化している汚染物質の関与が指摘されてきた。これまでに我々は、ディーゼル排気微粒子 (DEP) がアレルギー性喘息を増悪することを明らかにし、疫学的既報に実験的論拠を与えた¹⁻³⁾。その後、DEPに含まれる脂溶性化学物質がアレルギー性喘息を⁴⁻⁷⁾、プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステル類がアトピー性皮膚炎を増悪することを報告している^{8,9)}。特に、フタル酸エステル類として最も汎用されているフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は、乳児期曝露においてもアトピー性皮膚炎増悪影響を発揮することを明らかにしている¹⁰⁾。また、化学物質曝露は脳神経系にも影響を与えることが示唆されている。さらに、喘息により記憶・学習能力が

低下する可能性が示唆されていることから^{11,12)}、化学物質曝露による増悪影響も懸念される。

これらのことから、本研究では、生活環境における曝露濃度が高いことからその健康影響が懸念されるベンゾ [a] ピレン (BaP)、DEHP、フタル酸ジイソノニル (DINP)、ビスフェノール A (BPA) を対象とし、若齢期曝露がアレルギー性喘息における免疫系、脳神経系に及ぼす影響評価とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。加えて、次世代のアレルギー疾患増悪との関連を明らかにするため、これまでに検討がなされていない BaP の乳児期曝露による仔のアレルギー性喘息への影響についても検討を行った。

(2) 方法

アレルギー性喘息マウスモデルは、C3H/HeJ マウス (雄、6 週齢) に対し、卵白アルブミン (OVA) 1 $\mu\text{g}/\text{animal}$ を、隔週で計 4 回、経気道曝露することにより作製した。OVA はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-); pH7.4) に懸濁し、投与量は全量で 100 $\mu\text{L}/\text{回}$ とした。化学物質は週 1 回、計 7 回とし、OVA と化学物質の投与が重なる時は、混合液を調製し同時に行った。

BaP 若齢期曝露実験

実験群は 1 群 25-28 匹として、1) Vehicle 群、2) OVA、3) OVA + BaP 0.05 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、4) OVA + BaP 1 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、5) OVA + BaP 20 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ の 5 群に分けた。BaP は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した後、PBS(-) で適宜希釈し、経気道曝露した (DMSO の終濃度は 0.01%)。Vehicle 群は、0.01% DMSO を含む PBS(-) を投与した。学習能力については、新奇オブジェクト認知テスト (novel object recognition test; NORT) を行った。

DEHP 若齢期曝露実験

実験群は、1 群 13-17 匹として、1) Vehicle、2) OVA、3) OVA + DEHP 0.02 $\text{nmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、4) OVA + DEHP 0.4 $\text{nmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、5) OVA + DEHP 8 $\text{nmol}/\text{animal}/\text{wk}$ の 5 群に分けた。DEHP は、100% DMSO に溶解した後、PBS(-) で適宜希釈し、経気道曝露した (DMSO の終濃度は 0.1%)。Vehicle 群は、0.1% DMSO を含む PBS (-) を投与した。視床下部における神経免疫バイオマーカーについては、リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

DINP 若齢期曝露実験

実験群は、1 群 15-19 匹として、1) Vehicle、2) OVA、3) OVA + DINP 0.02 $\text{nmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、4) OVA + DINP 0.4 $\text{nmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、5) OVA + DINP 8 $\text{nmol}/\text{animal}/\text{wk}$ の 5 群に分けた。DINP は、100% DMSO に溶解した後、PBS(-) で適宜希釈し、経気道曝露した (DMSO の終濃度は 0.1%)。Vehicle 群は、0.1% DMSO を含む PBS (-) を投与した。視床下部における神経免疫バイオマーカーについては、リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

BPA 若齢期曝露実験

実験群は、1 群 13-18 匹として、1) Vehicle、2) BPA 0.0625 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、3) BPA 1.25 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、4) BPA 25 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、5) OVA、6) OVA + BPA 0.0625 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、7) OVA + BPA 1.25 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ 、8) OVA + BPA 25 $\text{pmol}/\text{animal}/\text{wk}$ の 8 群に分けた。BPA は、99.5% エタノールに溶解した後、PBS (-) で適宜希釈し、経気道曝露した (エタノールの終濃度は 0.001%)。Vehicle 群は、0.001% エタノールを含む PBS (-) を投与した。BPA 若齢期曝露は最も顕著な影響が観察されたことから、本実験については、より詳細な解析を加えた。最終投与 24 時間後の血清中 corticosterone 濃度は、ELISA 法を用いて測定した。肺におけるエストロゲン関連受容体 γ (Esrrg) およびエストロゲン受容体 α (Esr1)、Esr β (Esr2) の遺伝子発現の変化は、最終投与 4 時間後に肺を摘出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。また、最終投与 24 時間後に採取した脾臓から細胞を調製した。OVA 再刺激下で 3 日間培養した脾細胞の細胞増殖能とサイトカイン産生能 (IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10 等) は、それぞれ BrdU incorporation assay と ELISA 法を用いて解析した。最終投与 24 時間後の骨髄中のケモカインレベル (MCP-1、SDF-1 α) は、骨髄液を採取し、

ELISA 法を用いて解析した。学習能力については、NORT を行った。加えて、海馬における記憶関連遺伝子や神経免疫バイオマーカーについては、リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

BaP 乳児期曝露実験

妊娠 14-15 日齢の C3H/HeJ マウスに対し、1 群 11-17 匹として、出産直後に産仔調整を行い(5 匹/腹)、1) Vehicle 群、2) BaP 0.25 pmol/animal/wk、3) BaP 5 pmol/animal/wk、4) BaP 100 pmol/animal/wk の 4 群に分けた。BaP はオリーブオイルに懸濁し、適宜希釈した。Vehicle 群にはオリーブオイルを投与した。出産 1 日後から週 1 回、計 3 回 (Day 1、8、15)、母獣に対して強制経口投与した。仔獣は、3 週齢で離乳し、前述の 4 群に対して 6 週齢より OVA (1 µg/animal)、あるいは Vehicle (PBS (-)) を隔週で計 4 回気管内投与した。海馬における記憶関連遺伝子や神経免疫バイオマーカーについては、リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

各実験において、最終投与 24 時間後の気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の細胞数、肺における炎症性因子の発現 (IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-12、IFN-γ、MCP-1、RANTES、eotaxin、MCP-3)、血中 OVA 特異的抗体量 (OVA-IgE、OVA-IgG₁、OVA-IgG_{2a}) を ELISA 法を用いて測定した。また、肺の病理組織学的変化は、気管支、および血管周囲への炎症細胞浸潤はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)、気道上皮の粘液産生細胞の増生は Periodic acid-Schiff 染色 (PAS 染色) を用いて評価した。最終投与 24 時間後の所属リンパ節における免疫担当細胞のフェノタイプと機能については、縦隔リンパ節細胞 (LNC) を採取し、細胞表面分子 (抗原提示細胞マーカー: MHC class II、CD86、樹状細胞マーカー: CD11c、PDCA-1、T 細胞マーカー: TCR、CD4、CD8、CD28) の発現や OVA 再刺激下での培養 (3 日間) による細胞増殖能およびサイトカイン産生能 (IFN-γ、IL-4、IL-5、SDF-1α 等) を解析した。細胞表面分子の発現、細胞増殖、サイトカイン産生は、それぞれフローサイトメトリー、BrdU incorporation assay、ELISA 法を用いて測定した。

また、それぞれの化学物質の神経毒性を評価するため、学習行動については NORT、海馬における記憶関連遺伝子 (NMDA 受容体サブユニット; NR2A, NR2B) や海馬または視床下部における炎症性マーカー (IL-1β、TNF-α、CCL3)、転写因子 (NFκB)、酸化ストレスマーカー (HO-1)、神経栄養因子 (NGF)、ミクログリアマーカー (Iba1)、アポトーシスマーカー (Bcl2) についてはリアルタイム RT-PCR 法、免疫組織学的手法を用いて検討した。図 24 に示すように、NORT では、マウスを実験用ケージに慣れさせるため、1 日目と 2 日目は、ケージの中に 15 分間入れた (Habituation phase)。3 日目は、2 つの同じオブジェクトを 10 分間認識させ (Training phase)、4 日目に、1 つのオブジェクトを新しいオブジェクトと交換し、5 分間認識させた (Test phase)。Training phase および Test phase におけるマウスの探索行動はビデオカメラで記録し、ANYMAZE Software (Muromachi Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

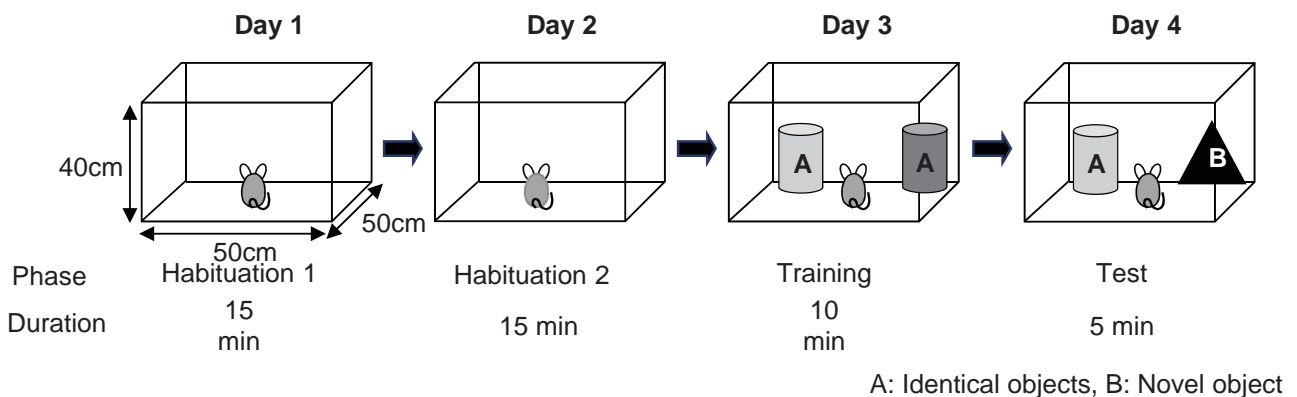


図 24 NORT の概要

(3) 結果と考察

A BaP 若齢期曝露の影響

OVA 投与により、Vehicle 群に比し、気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の好中球、好酸球、リンパ球の細胞数が有意に増加し (図 25)、肺における IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-33、MCP-1、RANTES、eotaxin のタンパク発現も顕著に上昇した。OVA 投与時における BaP の経気道曝露により、OVA+BaP 20 pmol/animal/wk 群で、OVA 群に比し総細胞数と好酸球数が有意に増加した。病理組織学的検討では、OVA 投与による気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積や、気管支上皮の粘液産生細胞の増生が、BaP 20 pmol/animal/wk 曝露により亢進した (図 26)。また、OVA+BaP 20 pmol/animal/wk 群において、OVA 群に比し、IL-5、IL-10、IL-13、IL-33、eotaxin、OVA-IgG₁ 産生も有意な上昇を示した。LNC の総細胞数は、Vehicle 群に比し OVA 投与で有意に増加し、OVA+BaP 群でさらに増加する傾向であった。MHC class II⁺CD86⁺ 細胞 (活性化抗原提示細胞) の割合は、OVA 単独群に比し、OVA+BaP 1 および 20 pmol/animal/wk 群で有意な増加が認められた。同曝露群における DC サブセットに大きな変化はなかったが、アレルギー性炎症に対し抑制に働く pDC (PDCA-1⁺CD11c⁺) と促進に働く cDC (PDCA-1⁻CD11c⁺) は、いずれも増加する傾向であった。また、OVA 単独群に比し、LNC の細胞増殖能は OVA+BaP 群で増加する傾向がみられ、サイトカイン産生能 (IFN- γ 、IL-4、IL-5) は OVA+BaP 0.05 または 1 pmol/animal/wk 群で有意な増加を示した。一方、BaP 若齢期曝露による学習能力への影響は認められなかった。

B DEHP 若齢期曝露の影響

OVA 投与時における DEHP の経気道曝露により、好中球、好酸球の細胞数が OVA 単独に比して DEHP 用量依存的

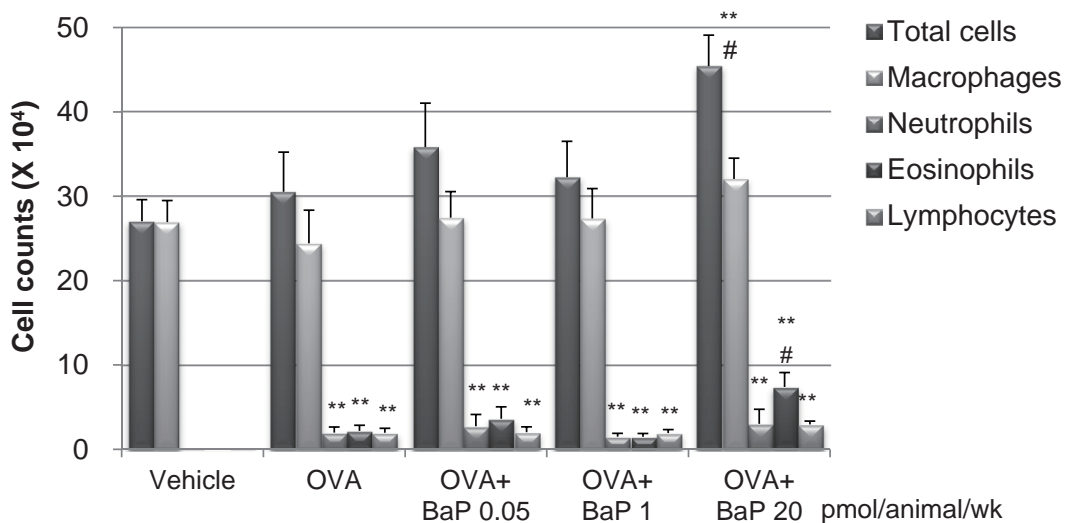


図 25 アレルギー性喘息モデルへの BaP 経気道曝露による気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化
Data are the mean \pm SE of 15-16 animals per group. *: p<0.05 vs. Vehicle group, **: p<0.01 vs. Vehicle group, #: p<0.05 vs. OVA group.

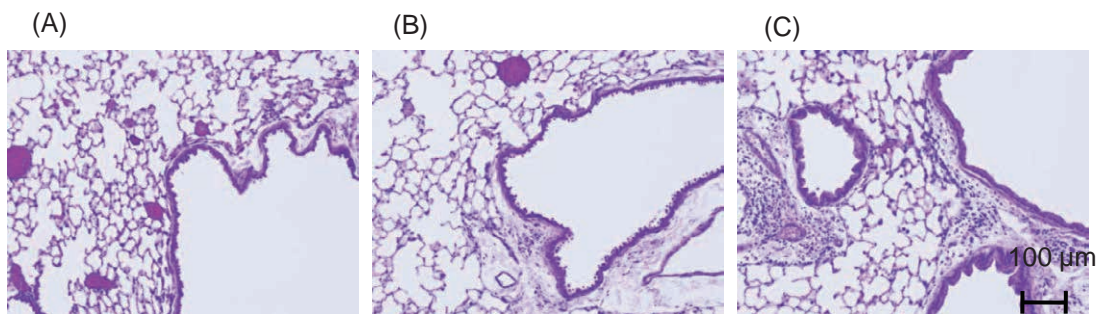


図 26 アレルギー性喘息モデルへの BaP 曝露による肺の病理組織学的変化 (HE 染色)
(A) Vehicle group, (B) OVA group, (C) OVA+BaP 20 pmol/animal/wk group (5-6 animals per group).

に増加傾向を認めたが、有意な変化ではなかった（図 27）。病理組織学的検討では、炎症細胞浸潤（図 28）や、気管支上皮の粘液産生細胞の増生において、DEHP 曝露による明確な影響は認められなかった。肺における IL-5、IL-13、eotaxin、および血中 OVA 特異的 IgG₁、IgG_{2a} 産生は、DEHP 曝露による増加傾向は認めたが有意な変化ではなかった。OVA-IgE は、DEHP 曝露による影響を認めなかった。LNC においては、OVA 単独群に比し、総細胞数が OVA + DEHP 群で減少する傾向であり、抗原提示細胞の活性化も抑制される傾向であった。視床下部における IL-1 β 、TNF- α 、CCL3、NF κ B、HO-1、NGF、Iba1 の遺伝子発現は、Vehicle 群、OVA 群に比し、OVA + DEHP 8 nmol/animal/wk 群で有意に増加した（表 5）。

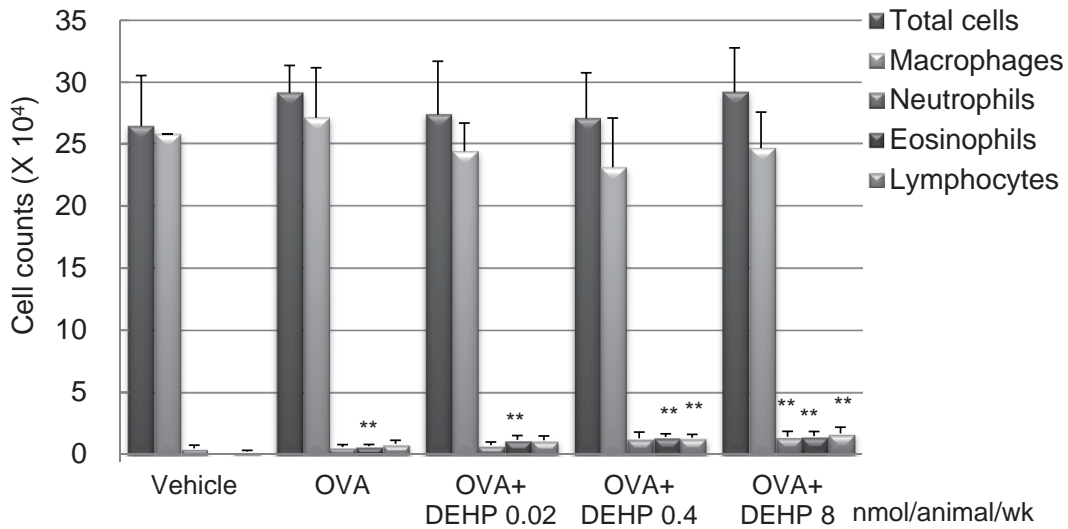


図 27 アレルギー性喘息モデルへの DEHP 経気道曝露による気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化
Data are the mean \pm SE of 9-13 animals per group. **: $p < 0.01$ vs. Vehicle group.

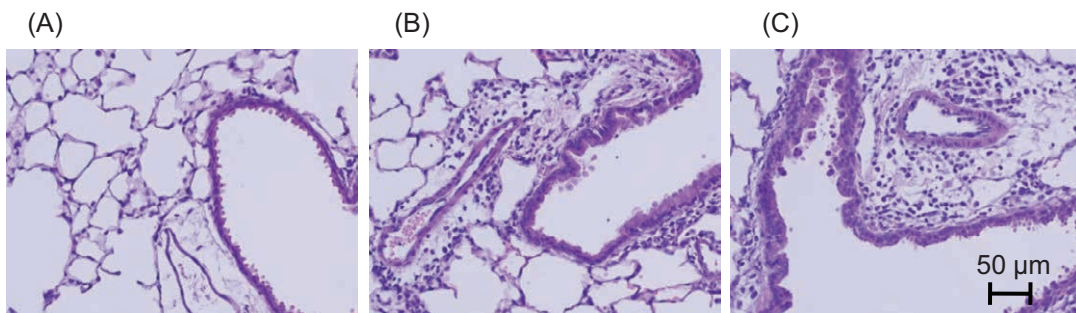


図 28 アレルギー性喘息モデルへの DEHP 曝露による肺の病理組織学的変化 (HE 染色)
(A) Vehicle group, (B) OVA group, (C) OVA+DEHP 8 nmol/animal/wk group (4 animals per group).

表 5 フタル酸エステル曝露によるアレルギー性喘息モデルの視床下部における神経・免疫バイオマーカーへの影響

Biomarkers		mRNA expression	
		DEHP	DINP
Proinflammatory cytokines	IL-1 β	↑	→
	TNF- α	↑	↓
	CCL2	→	↓
	CCL3	↑	→
Transcription factor	NF κ B	↑	→
Oxidative stress marker	HO-1	↑	→
Neurotrophins	NGF	↑	→
Microglia marker	Iba1	↑	→

↑ = increased significantly; ↓ = decreased significantly; → = not changed

C DINP 若齢期曝露の影響

OVA 投与時における DINP の経気道曝露により、BAL 中の好中球、好酸球の細胞数が OVA 群に比して DINP 用量依存的に増加傾向を認め、リンパ球数は、OVA+DINP 8 nmol/animal/wk 群で有意な増加を示した (図 29)。また、病理組織学的検討では、OVA 投与による気管支、および血管周囲への炎症細胞浸潤 (図 30) や、気管支上皮の粘液産生細胞の増生が観察されたが、DINP 曝露による明確な影響は認められなかった。肺における IL-5、IL-13、eotaxin、および血中 OVA 特異的 IgE、IgG₁ 産生においても、DINP 曝露による増加傾向は認められたが有意な変化ではなかった。LNC の総細胞数は、OVA 単独群に比し、OVA+DINP 群で増加する傾向であった。また、OVA+DINP 8 nmol/animal/wk 群で、MHC class II⁺CD86⁺細胞や cDC の割合の有意な増加、細胞増殖、IL-4、IL-5 産生の増加傾向が観察された。フタル酸エステル (DEHP、DINP) の影響においては、これまでに骨髓由来樹状細胞の解析も行っており、それらの結果も含め、喘息モデルマウスにおける DEHP の樹状細胞への影響は総じて軽微であったが、DINP は樹状細胞の前駆細胞に作用して活性化 cDC の増加あるいは局所リンパ節への移行を促す可能性が示唆された。一方、DINP 曝露は、視床下部における神経免疫バイオマーカーの遺伝子発現に影響を与えなかった。

D BPA 若齢期曝露の影響

OVA 投与時における BPA の経気道曝露により、BAL 中の好酸球、好中球、リンパ球、マクロファージの細胞数が OVA 群に比して増加し、この増加は OVA+BPA 0.0625、1.25 pmol/animal/wk 群でより顕著であった (図 31)。一方、

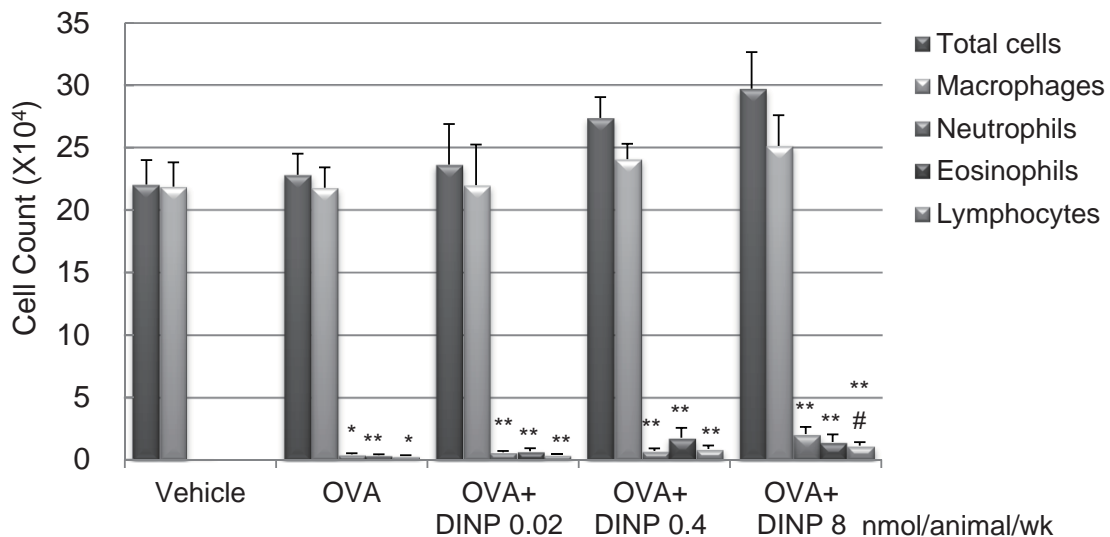


図 29 アレルギー性喘息モデルへの DINP 経気道曝露による気管支肺泡洗浄液中の細胞数の変化

Data are the mean \pm SE of 11-14 animals per group. *, $p < 0.05$ vs. Vehicle group, **, $p < 0.01$ vs. Vehicle group, #, $p < 0.05$ vs. OVA group.

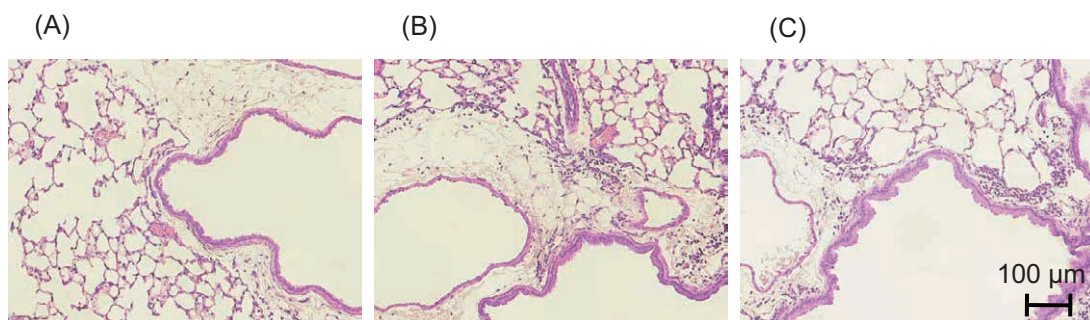


図 30 アレルギー性喘息モデルへの DINP 曝露による肺の病理組織学的変化 (HE 染色)

(A) Vehicle group, (B) OVA group, (C) OVA+DINP 8 nmol/animal/wk group (4-5 animals per group).

OVA + BPA 25 pmol/animal/wk 群では抑制傾向を認めた。病理組織学的検討では、OVA + BPA 群で気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積 (図 32) や粘液産生細胞の増生を認め、OVA + BPA 1.25 pmol/animal/wk 群で最も顕著であった。加えて、肺における IL-13、IL-33、RANTES、および KC のタンパク発現は、特に OVA + BPA 0.0625、1.25 pmol/animal/wk 群で有意な上昇を認めた。血中 OVA 特異的 IgE、IgG₁、IgG_{2a} 産生は、いずれも BPA 曝露により上昇傾向を認めたが、曝露用量による影響は認めず、OVA 群に対する有意な変化はなかった。血中コルチコステロン濃度は、OVA 存在下、非存在下いずれにおいても BPA 曝露で抑制傾向を示し、OVA + BPA 0.0625 pmol/animal/wk 群では OVA 群に比し、有意な低下を認めた (図 33 A)。加えて、肺組織におけるエストロゲン受容体 (ER) の発現は、OVA 投与により抑制されが、OVA + BPA 曝露により ER の発現が BPA の用量依存的に回復し、特に、Esr2 の発現は OVA + BPA 1.25、25 pmol/animal/wk 群で有意に上昇した (図 33 B、C)。Esr1 の発現は各群において有意な変化を認めなかった。

LNC の総細胞数は、Vehicle 群に比し、BPA 群、OVA 群、OVA + BPA 25 pmol/animal/wk 群で増加傾向、OVA + BPA 0.0625、1.25 pmol/animal/wk 群で有意に増加した (図 34 A)。OVA + BPA 1.25 pmol/animal/wk 群は、OVA 群に対しても有意な増加を認めた。さらに、OVA 単独群に比し、OVA + BPA 0.0625 または 1.25 pmol/animal/wk 群では、活性化抗原提示細胞 (図 34 B) や cDC の割合が有意に増加した。また OVA + BPA 0.0625 pmol/animal/wk 群において、LNC の細胞増殖の増加傾向と IFN- γ 、IL-4 (図 34 C)、IL-5、SDF-1 α 産生の有意な増加または増加傾向が観察された。このように、OVA + BPA 群で観察された LNC の活性化と Th2 反応の促進は、肺の炎症病態と並行する結果であった。一方、脾細胞については、OVA 単独群に比し、OVA + BPA 群において、BPA の曝露用量依存的に細胞増殖能 (図 34 D) や IFN- γ 、

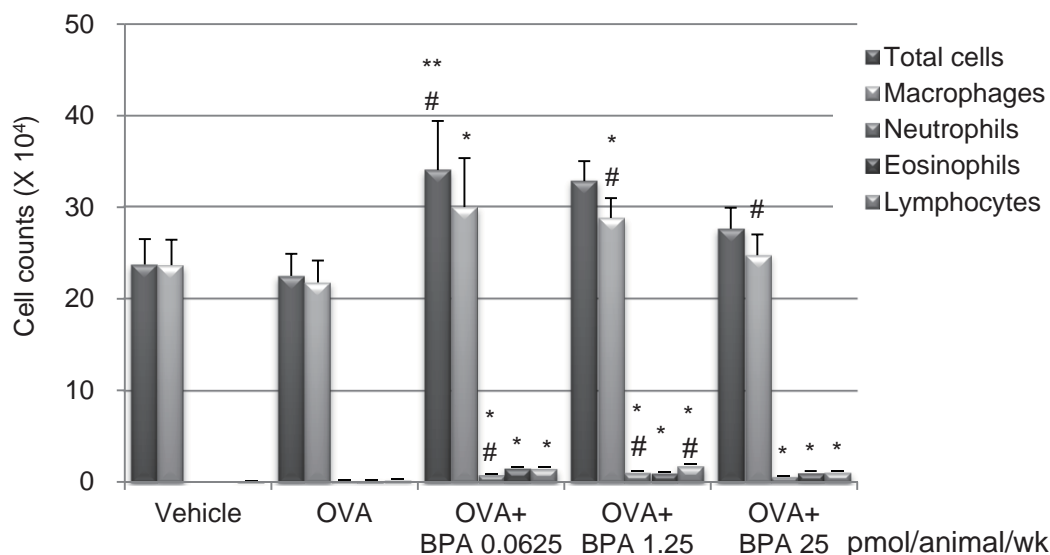


図 31 アレルギー性喘息モデルへの BPA 経気道曝露による気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化
Data are the mean \pm SE of 11-14 animals per group. *; $p < 0.05$ vs. Vehicle group, **; $p < 0.01$ vs. Vehicle group, #; $p < 0.05$ vs. OVA group.

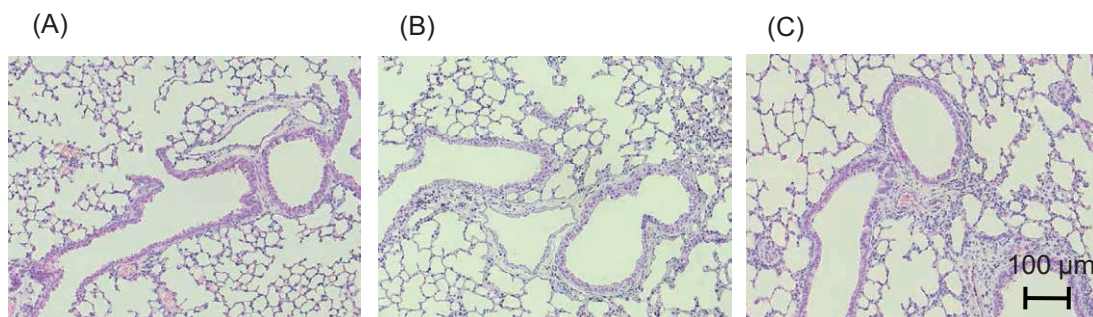


図 32 アレルギー性喘息モデルへの BPA 曝露による肺の病理組織学的変化 (HE 染色)
(A) Vehicle group, (B) OVA group, (C) OVA+BPA 1.25 pmol/animal/wk group (4-5 animals per group).

IL-4 産生能が抑制されたのに対し、抗炎症サイトカインの IL-10 の産生能が増加傾向を示すなど抗炎症性の反応が認められた (図 34 E)。また、OVA 単独群に比し、OVA + BPA 1.25 pmol/animal/wk 群で骨髄液中の SDF-1 α レベルが有意に増加するなど骨髄微小環境の変化も見出した。このような免疫系の攪乱が、BPA の低・中用量曝露ではアレルギー性炎症が増悪され、高用量曝露では増悪影響が減弱される一要因として寄与している可能性が考えられる。

NORT の結果から、Vehicle 群に比し、OVA + BPA 25 pmol/animal/wk 群において学習能力の顕著な低下が認められた (図 35)。OVA + BPA 0.0625 および 1.25 pmol/animal/wk 群でも学習行動の低下傾向を認めたが、有意な変化ではなかった。加えて、OVA + BPA 25 pmol/animal/wk 群においては、Vehicle 群に比し、海馬における記憶関連遺伝子 NR2B の発現の有意な低下と Bcl2、HO-1 遺伝子の発現の有意な増加を認めた。

E BaP 乳児期曝露の影響

雄の仔獣において、OVA + BaP 0.25 pmol/animal/wk 群で BAL 中の好酸球、リンパ球が増加傾向を認めたが、有意な変化ではなかった (図 36 A)。また、気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積、気管支上皮の粘液産生細胞の増生も同様であった。肺における IL-5、IL-13、MCP-1、eotaxin、RANTES の発現、血中 OVA 特異的 IgG₁、IgG_{2a} の産生も、BaP の乳児期曝露により増加傾向を認めたが有意な変化ではなかった。雄仔獣の LNC の総細胞数は、Vehicle 群に比し、BaP 5、100 pmol/animal/wk 群で増加傾向、OVA 群と OVA + BaP 群で有意な増加を認め、OVA + BaP 0.25 pmol/animal/wk 群は、OVA 群に対しても有意な増加を示した (図 37 A)。また、Vehicle 群に比し BaP

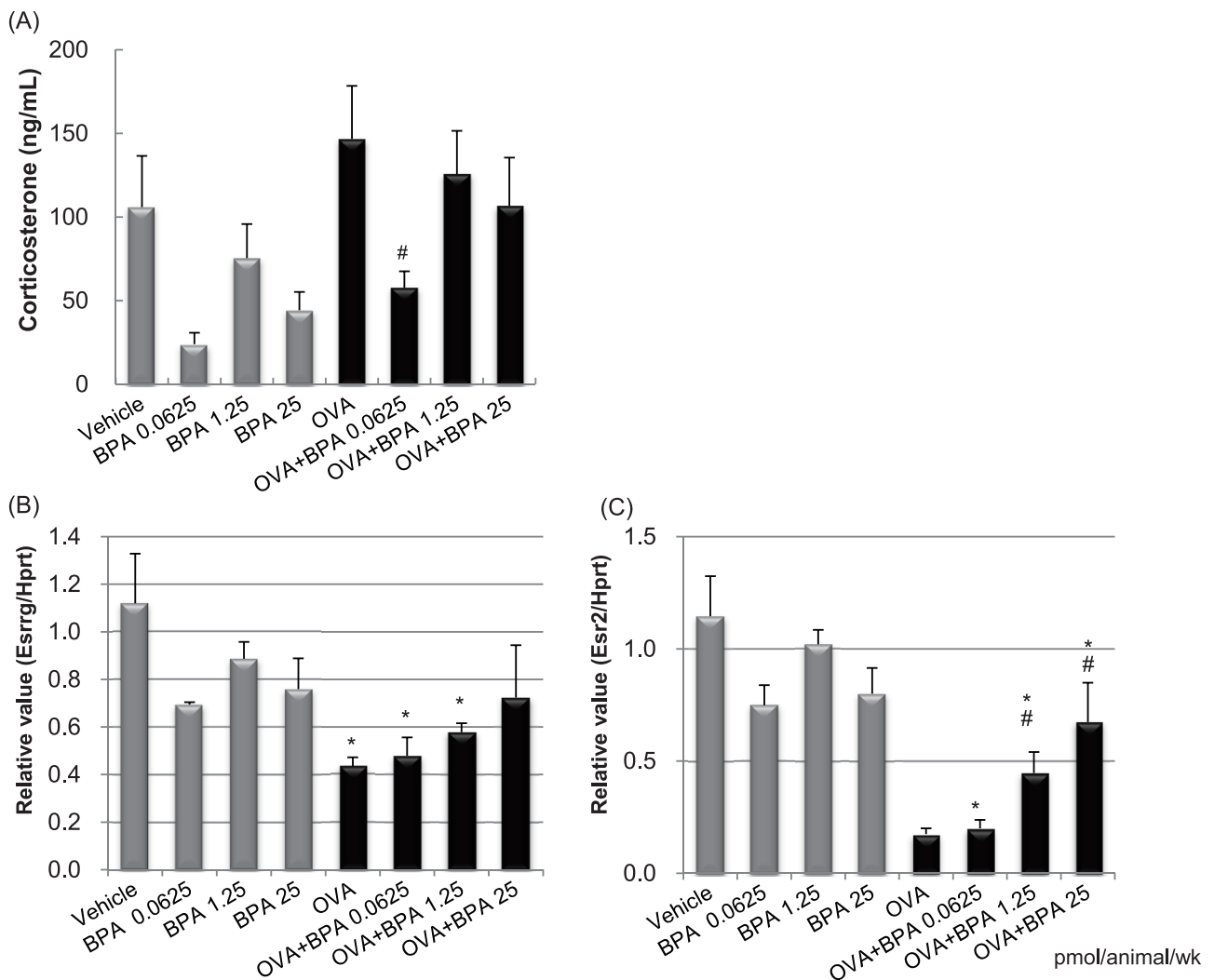


図 33 アレルギー性喘息モデルへの BPA 曝露による血中コルチコステロン濃度と肺におけるエストロゲン受容体の遺伝子発現変化

(A) 血中 corticosterone 濃度. Data were expressed as means \pm SE for 5-8 animals. (B) Esrrg, (C) Esr2. Data were expressed as means \pm SE for 3-6 animals per group. *; $p < 0.05$ versus Vehicle group, #; $p < 0.05$ versus OVA group.

100 pmol/animal/wk 群で、OVA 群に比し OVA + BaP 0.25 および 5 pmol/animal/wk 群で、活性化抗原提示細胞の数が増加または増加する傾向がみられた。LNC の細胞増殖能に顕著な変化は認められなかったが、OVA 群に比し、OVA + BaP 0.25 および 5 pmol/animal/wk 群で IL-4 産生が増加する傾向を示した。

雌の仔獣では、OVA + BaP 0.25 pmol/animal/wk 群で好中球、リンパ球が、OVA + BaP 1 pmol/animal/wk 群で好酸球が

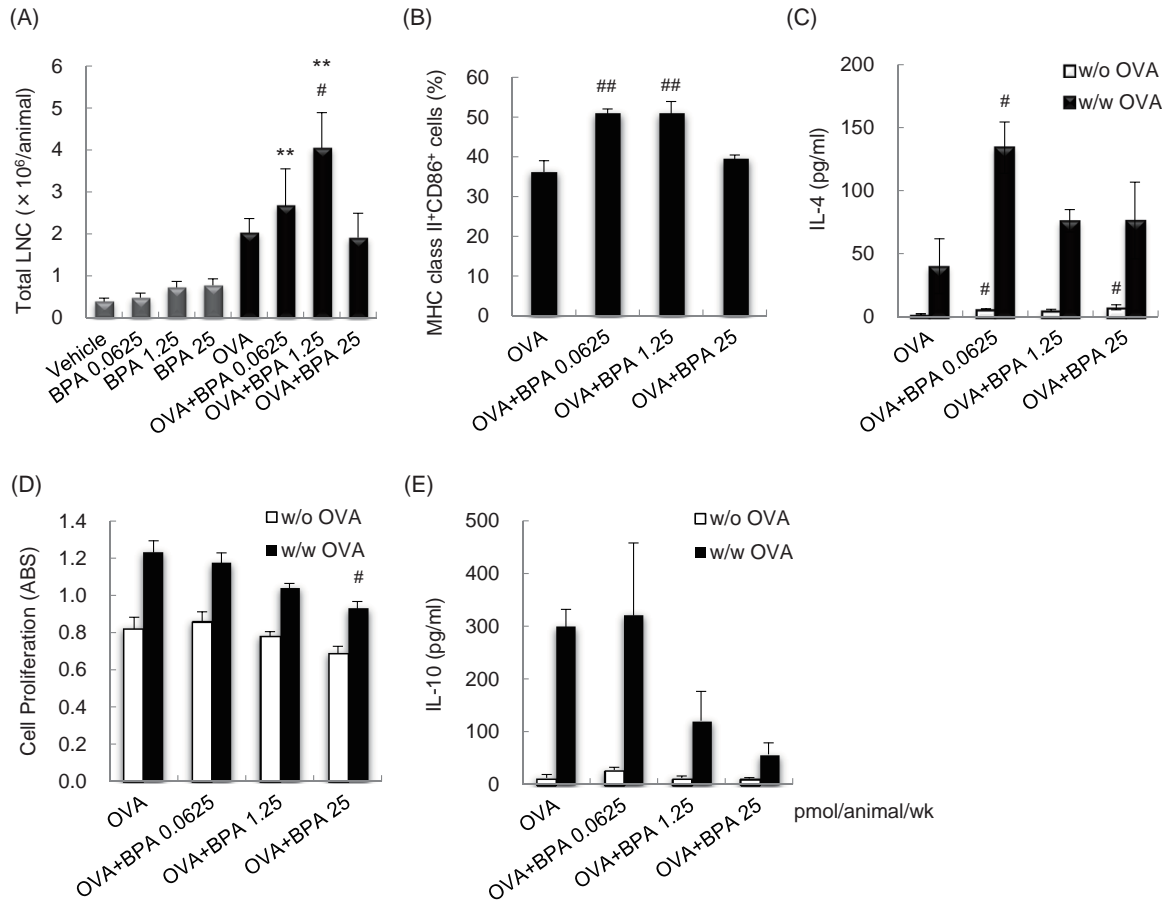


図 34 アレルギー性喘息モデルへの BPA 曝露による LNC と脾細胞の変化

(A) LNC 総細胞数, (B) LNC 中の MHC class II+CD86+ 細胞の割合, (C) LNC の IL-4 産生能, (D) 脾細胞の細胞増殖能, (E) 脾細胞の IL-10 産生能. Data are the means \pm SEM of 4-8 animals per group. **: $p < 0.01$ vs. Vehicle group, #: $p < 0.05$ vs. OVA group, ##: $p < 0.01$ vs. OVA group.

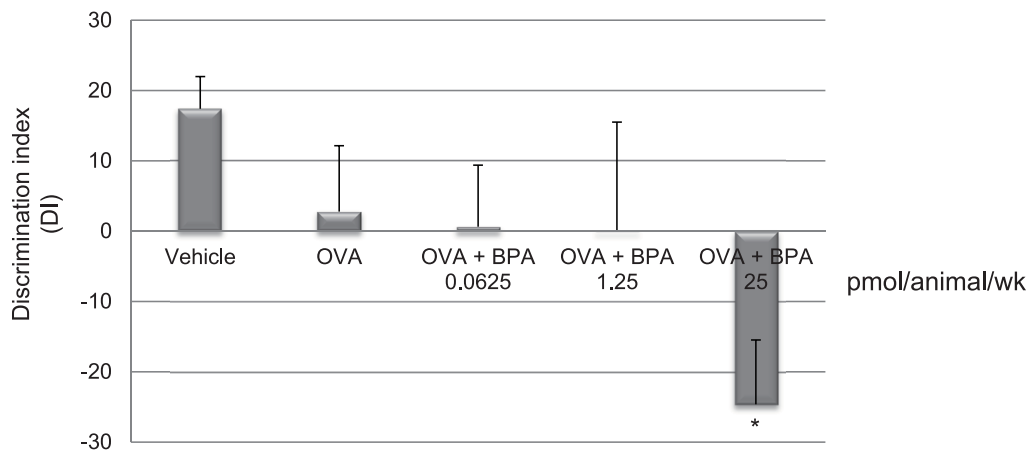


図 35 アレルギー性喘息モデルへの BPA 曝露による NORT の結果

DI=(novel object exploration time/total exploration time) – (familiar object exploration time/total exploration time) \times 100. *: $p < 0.05$ vs. Vehicle group.

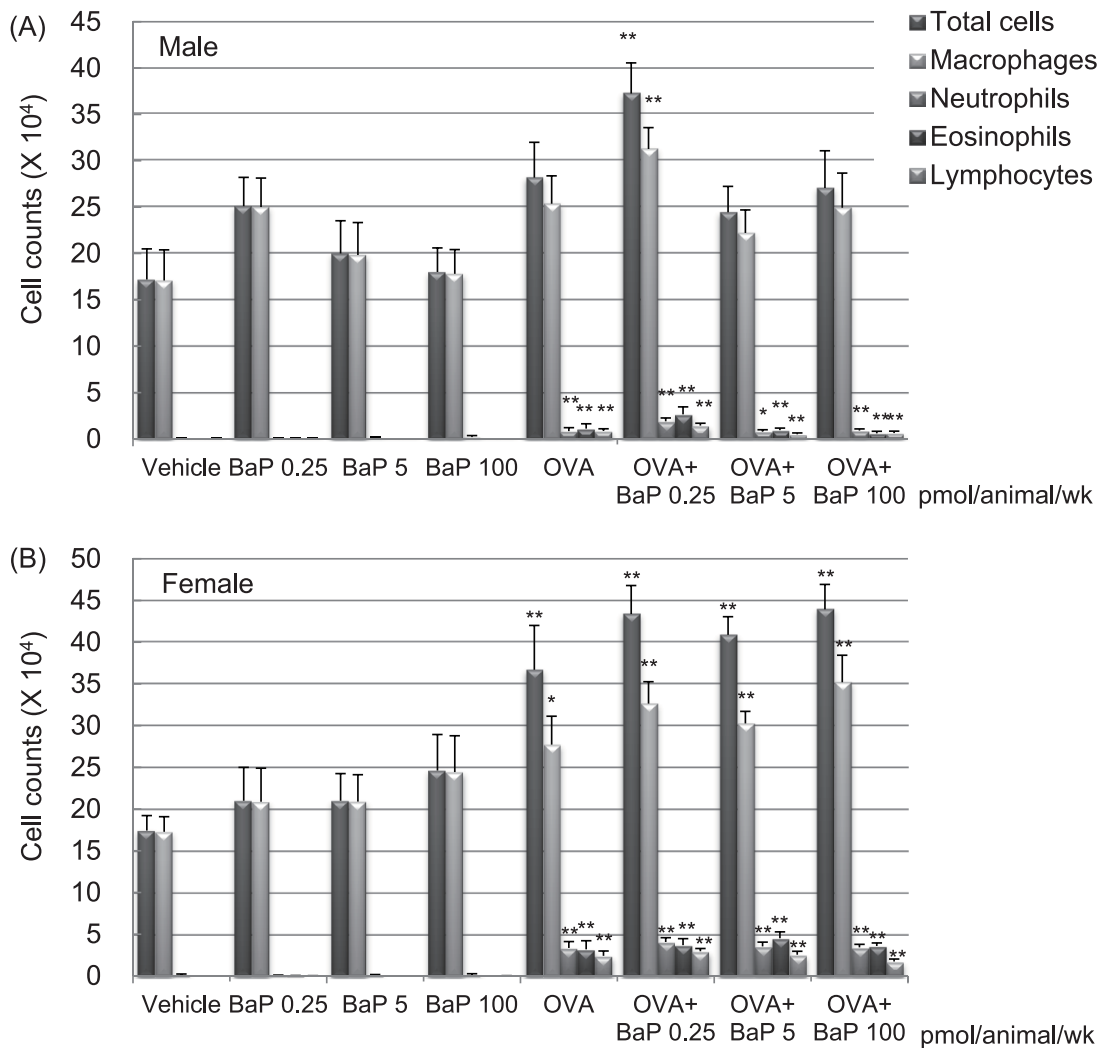


図 36 BaP 乳児期曝露による仔の気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化

(A) 雄 (Male), (B) 雌 (Female). Data are the means \pm SEM of 4-8 animals per group. *; $p < 0.05$ vs. Vehicle group, **; $p < 0.01$ vs. Vehicle group.

増加傾向を認めたが、有意な変化ではなかった (図 36 B)。また、気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積、気管支上皮の粘液産生細胞の増生も同様であった。肺における IL-33、IFN- γ のタンパク発現、OVA 特異的 IgG₁、IgG_{2a} の産生は、OVA + BaP 0.25、OVA + BaP 1 pmol/animal/wk 群で増悪傾向を認めた。雌仔獣の LNC の総細胞数は、Vehicle 群に比し、OVA 群と OVA + BaP 群で有意な増加を認め、OVA 群に比し、OVA + BaP 群で増加傾向を示した (図 37 B)。また、Vehicle 群に比し BaP 100 pmol/animal/wk 群で、OVA 群に比し OVA + BaP 群で、活性化抗原提示細胞および cDC の数が顕著に増加または増加する傾向がみられた。さらに、OVA 群に比し、OVA + BaP 5 pmol/animal/wk 群で、IFN- γ 、IL-4、IL-5 産生の増加傾向および細胞増殖の有意な増加を認めた。一方、BaP 曝露のみでは、雌雄の仔獣ともに肺炎症への影響は認めなかった。BaP の乳児期曝露による仔のアレルギー性喘息への影響には、性差の存在も示唆されたが、雌雄ともに、肺の炎症病態に並行し、OVA + BaP 群で LNC の活性化が観察された。

脳神経系への影響については、雌仔獣の Vehicle 投与群に比し OVA 投与群で海馬における記憶関連遺伝子 NR2A の有意な発現増加が認められたが、雄の仔獣では認められなかった。さらに雌仔獣の海馬において、Vehicle 投与群に比し OVA 投与群で NF κ B 発現の有意な増加および COX2、HO-1、Iba-1 の有意な減少が観察された。しかし、いずれも BaP 曝露による影響は観察されなかった。また、雄についてのみ、BaP 高用量曝露の影響について NORT を実施したが、顕著な変化は認められなかった。

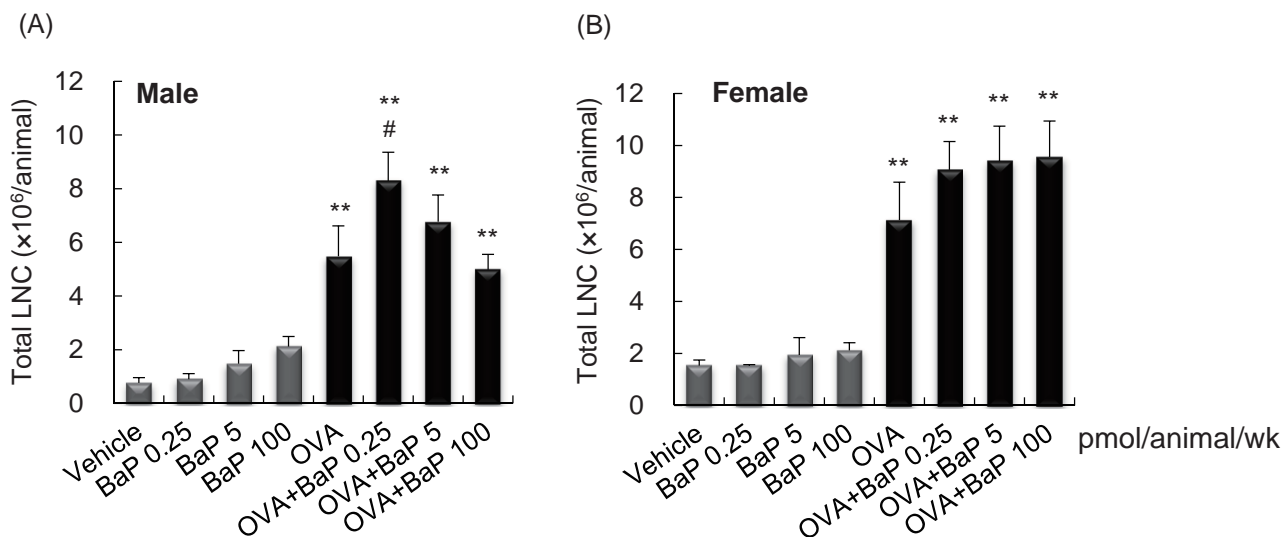


図 37 BaP 乳児期曝露による仔の LNC 総細胞数の変化

(A)雄(Male), (B)雌(Female). Data are the means \pm SEM of 4-8 animals per group. **: $p < 0.01$ vs. Vehicle group, #: $p < 0.05$ vs. OVA group.

F まとめ

以上の結果のまとめを、表 6 に示した。本研究より、BaP あるいは BPA の若齢期における経気道曝露は、アレルギー性喘息を増悪する可能性が示唆され、その作用機構として、当該化学物質曝露による Th2 反応の亢進が寄与していることが考えられた。また、BPA 曝露では、ヒトが環境中で曝露され得るレベルで影響が認められたことから、低用量曝露による影響評価が重要であると考えられた。また、BPA 曝露は、アレルギー病態における免疫応答の攪乱に加えて、ER の発現やホルモン濃度を変動させることにより病態形成に寄与し、その反応は曝露用量によって異なる可能性が考えられた。一方、フタル酸エステル類として選択した、DEHP および DINP への曝露が、アレルギー性喘息に及ぼす影響は軽微であったが、曝露期間や曝露経路によっては増悪影響を発揮する可能性も否定できない。BaP の乳児期曝露は、雌雄の仔獣いずれにおいてもアレルギー性喘息に及ぼす影響は軽微と考えられたが、その存在が示唆され、曝露用量に対する反応性には性差がある可能性も示唆された。さらに、DEHP 若齢期曝露による視床下部における炎症性関連遺伝子の発現増加や、BPA の若齢期曝露による学習能力の低下や海馬における記憶関連遺伝子の発現の低下など、当該化学物質への曝露は、脳神経系にも影響を及ぼすことが示唆された。以上、本研究により、化学物質の低用量曝露影響を見出し、若齢期および乳児期曝露がアレルギー性喘息における免疫系、脳神経系を攪乱する可能性とそのメカニズムの一端を解明することができた。

表 6 免疫系および脳神経系パラメータの結果一覧

表 5 に示したフタル酸エステル曝露による視床下部における神経・免疫バイオマーカーへの影響を除く結果を示した。

		若齢期曝露				乳児期曝露	
		BaP	DEHP	DINP	BPA	BaP	
		Male				Male	Female
免疫系	アレルギー性肺炎症	↑	↗	↗	↑	↗	↗
	縦隔リンパ節中の抗原提示細胞の活性化	↗	↗	↗	↑	↗	↗
脳神経系	記憶・学習						
	- NORT	→	ND	ND	↓	→	ND
	- 海馬の記憶関連遺伝子の発現	ND	ND	ND	↓	→	↑

ND: No Data

引用文献

- 1) Ichinose T., Takano H., Miyabara Y., Yanagisawa R., Sagai M. (1997) Murine strain difference in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. *Toxicology*, 122, 183-192
- 2) Miyabara Y., Yanagisawa R., Shimojo N., Takano H., Lim H.B., Ichinose T., Sagai M. (1998) Murine strain differences in airway inflammation caused by diesel exhaust particles. *Eur. Respir. J.*, 11, 291-298
- 3) Inoue K., Koike E., Yanagisawa R., Takano H. (2008) Impact of diesel exhaust particles on th2 response in the lung in asthmatic mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43(3), 199-200
- 4) Hiyoshi K., Takano H., Inoue K., Ichinose T., Yanagisawa R., Tomura S., Kumagai Y. (2005) Effects of phenanthraquinone on allergic airway inflammation in mice. *Clin. Exp. Allergy*, 35, 1243-1248
- 5) Yanagisawa R., Takano H., Inoue K., Sakurai M., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Yoshikawa T., Hayakawa K. (2006) Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, 36, 386-395
- 6) Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Sakurai M., Abe S., Yoshino S., Yamaki K., Yoshikawa T. (2007) Effects of components derived from diesel exhaust particles on lung physiology related to antigen. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 29(3-4), 403-12
- 7) Inoue K.I., Takano H., Ichinose T., Tomura S., Yanagisawa R., Sakurai M., Sumi D., Cho A.K., Hiyoshi K., Kumagai Y. (2007) Effects of naphthoquinone on airway responsiveness in the presence or absence of antigen in mice. *Arch. Toxicol.*, 27(1), 95-100
- 8) Takano H., Yanagisawa R., Inoue K., Ichinose T., Sadakane K., Yoshikawa T. (2006) Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Environ. Health Persp.*, 114, 1266-1269
- 9) Koike E., Yanagisawa R., Sadakane K., Inoue Ken-ichiro, Ichinose T., Takano H. (2010) Effects of diisononyl phthalate on atopic dermatitis in vivo and immunologic responses in vitro. *Environ. Health Perspect.*, 118 (4), 472-478
- 10) Yanagisawa R., Takano H., Inoue K., Koike E., Sadakane K., Ichinose T. (2008) Effects of maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate during fetal and/or neonatal periods on atopic dermatitis in male offspring. *Environ. Health Perspect.*, 116(9), 1136-41
- 11) Albéri L. (2013) Asthma: a clinical condition for brain health. *Exp Neurol*, 248:338-42. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.07.002.
- 12) Guo R.B., Sun P.L., Zhao A.P., Gu J, Ding X, Qi J, Sun X.L., Hu G. (2013) Chronic asthma results in cognitive dysfunction in immature mice. *Exp Neurol*, 247:209-17. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.04.008.

[資 料]

1 研究の組織と研究課題の構成

1.1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境健康研究センター	新田裕史 中山祥嗣 山崎 新 磯部友彦 道川武紘 高木麻衣 野原恵子 小林弥生 前川文彦 鈴木武博 岡村和幸 小池英子 柳澤利枝 伊藤智彦 Tin-Tin-Win-Shwe 竹内文乃 ^{*)} 佐藤ゆき ^{*)}
環境リスク研究センター	青木康展
環境計測研究センター	佐野友春

(注) 所属・役職は年度終了時点のもの。また、^{*)}印は過去に所属していた職員等を示す。

[B 客員研究員]

山下 聡 (国立がん研究センター研究所)	(平成 23 ~ 25 年度)
伊藤隆明 (熊本大学)	(平成 23 ~ 24 年度)
塚原伸治 (埼玉大学)	(平成 23 ~ 27 年度)
内匠正太 (慈恵会医科大学、鹿児島女子短期大学)	(平成 25 ~ 27 年度)
浜崎浩子 (北里大学)	(平成 26 ~ 27 年度)
高野裕久 (京都大学)	(平成 23 ~ 26 年度)
竹内文乃 (慶應義塾大学)	(平成 27 年度)

[C 協力研究者]

田辺信介 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)	(平成 26 ~ 27 年度)
国末達也 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)	(平成 26 ~ 27 年度)
市瀬孝道 (大分県立看護科学大学)	(平成 23 ~ 25 年度)
吉田成一 (大分県立看護科学大学)	(平成 23 ~ 25 年度)
定金香里 (大分県立看護科学大学)	(平成 23 ~ 25 年度)

1.2 研究課題と担当者

プロジェクト1：化学物質曝露による健康影響評価に係る疫学調査手法の高度化に関わる研究

新田裕史・中山祥嗣・山崎 新・磯部友彦・道川武紘・高木麻衣・竹内文乃・佐藤ゆき・田辺信介**・
国末達也**

プロジェクト2：化学物質曝露による小児・次世代への健康影響の機構解明と評価システムの構築に関する研究

野原恵子・前川文彦・鈴木武博・岡村和幸・小池英子・柳澤利枝・伊藤智彦・Tin-Tin-Win-Shwe・新田裕史・
佐野友春・青木康展・山下 聡*・伊藤隆明*・塚原伸治*・内匠正太*・浜崎浩子*・高野裕久*・市瀬孝道**・
吉田成一**・定金香里**

(注) *客員研究員、**協力研究者

2 研究成果発表一覧

2.1 誌上発表

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

- Aung K.H., Kurihara R., Nakashima S., Maekawa F., Nohara K., Kobayashi T., Tsukahara S. (2013) Inhibition of neurite outgrowth and alteration of cytoskeletal gene expression by sodium arsenite, *Neurotoxicology*, 34: 226-235.
- Aung K.H., Tin-Tin-Win-Shwe, Kanaya M., Takano H., Tsukahara S. (2014) Involvement of hemeoxygenase-1 in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis of Neuro-2a cells, *J. Toxicol. Sci.*, 39(2): 217-229.
- Aung K.H., Tsukahara S., Maekawa F., Nohara K., Nakamura K., Tanoue A. (2015) Role of environmental chemical insult in neuronal cell death and cytoskeleton damage, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(8): 1109-1112.
- Aung K.H., Kyi-Tha-Thu C., Sano K., Nakamura K., Tanoue A., Nohara K., Kakeyama M., Tohyama C., Tsukahara S., Maekawa F. (2016) Prenatal exposure to arsenic impairs behavioral flexibility and cortical structure in mice, *Frontiers in Neuroscience*, 10: 137.
- Fujimaki H., Tin-Tin-Win-Shwe, Yoshida Y., Kunugita N., Arashidani K. (2011) Dysregulation of immune responses in an allergic mouse model following low-level toluene exposure, *Toxicology*, 286: 28-35.
- Koike E., Yanagisawa R., Takigami H., Takano H. (2013) Brominated flame retardants stimulate mouse immune cells in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 33(12): 1451-1459.
- Koike E., Yanagisawa R., Takano H. (2014) Toxicological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives on respiratory cells, *Atmos. Environ.*, 97: 529-536.
- Koike E., Yanagisawa R., Takigami H., Takano H. (2014) Penta- and octa-bromodiphenyl ethers promote proinflammatory protein expression in human bronchial epithelial cells in vitro, *Toxicol. In Vitro.*, 28(2): 327-333.
- Koike E., Yanagisawa R., Takano H. (2016) Brominated flame retardants, hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A, affect proinflammatory protein expression in human bronchial epithelial cells via disruption of intracellular signaling, *Toxicol. In Vitro.*, 32: 212-219.
- 前川文彦, チョウ・テツ・アウン, 中村和昭, 佐野一広, ティン・ティン・ウイン・シュイ, 田上昭人, 野原恵子, 塚原伸治 (2014) 培養細胞を用いた発達神経毒性評価試験法の近年の動向, *化学工業*, 65 (7) : 538-547.
- Maekawa F., Tsuboi T., Oya M., Aung K.H., Tsukahara S., Pellerin L., Nohara K. (2013) Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons, *Neurotoxicology*, 37: 197-206.
- Maekawa F., Shimba S., Takumi S., Sano T., Suzuki T., Bao J., Ohwada M., Ehara T., Ogawa Y., Nohara K. (2012) Diurnal expression of Dnmt3b mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork, *Epigenetics*, 7: 1046-1056.
- Nohara K., Okamura K., Suzuki T., Murai H., Ito T., Shinjo K., Takumi S., Michikawa T., Kondo Y., Hata K. (2016) Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring, *J Appl. Toxicol.*, 36: 105-12.
- 野原恵子 (2015) DOHaDと環境化学物質, *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*, 22 (4) : 53-57.
- 野原恵子 (2013) DOHaDとエピジェネティクス, *産科と婦人科*, 80 (5) : 575-579.
- Nohara K., Tateishi Y., Suzuki T., Okamura K., Murai H., Takumi S., Maekawa F., Nishimura N., Kobori M., Ito T. (2012) Late-onset increases in oxidative stress and other tumorigenic activities and tumors with a Ha-ras mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic, *Toxicol. Sci.*, 129: 293-304.
- Okamura K., Nohara K. (2016) Long-term arsenite exposure induces premature senescence in B-cell lymphoma A20 cells, *Arch. Toxicol.*, 90: 793-803.
- Okamura K., Miki D., Nohara K. (2013) Inorganic arsenic exposure induces E2F-dependent G0/G1 arrest via an increase in retinoblastoma family protein p130 in B-cell lymphoma A20 cells, *Genes to Cells*, 18: 839-849.
- Sadakane K., Ichinose T., Takano H., Yanagisawa R., Inoue K.I., Kawazato H., Yasuda A., Hayakawa K. (2013) Organic Chemicals in Diesel Exhaust Particles Enhance Picryl Chloride-Induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 162: 7-15.

- Sadakane K., Ichinose T., Takano H., Yanagisawa R., Koike E. (2014) Effects of oral administration of di-(2-ethylhexyl) and diisononyl phthalates on atopic dermatitis in NC/Nga mice, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 36(1): 61-69.
- Sadakane K., Ichinose T., Takano H., Yanagisawa R., Koike E., Inoue K. (2014) The alkylphenols 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol and 4-tert-butylphenol aggravate atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, *J. Appl. Toxicol.*, 34(8): 893-902.
- Sagai M., Tin-Tin-Win-Shwe (2015) Oxidative stress derived from airborne fine and ultrafine particles and the effects on brain-nervous system (Part 2), *Japanese Journal of Hygiene*, 70(3): 220-229.
- Sagai M., Tin-Tin-Win-Shwe (2015) Oxidative stress derived from airborne fine and ultrafine particles and the effects on brain-nervous system (Part 1), *Japanese Journal of Hygiene*, 70(2): 127-133.
- Sone H., Tin-Tin-Win-Shwe, Qin X., Akanuma H., Imanishi S. (2012) Environmental Chemical Substances in Relation to Neurodevelopmental Disorders: A Systematic Literature Review, ISBN: 978-953-51-0269-4, In book: Learning Disabilities, In Tech. Chapter 16, 313-342.
- Suzuki T., Nohara K. (2013) Long-term arsenic exposure induces histone H3 Lys9 dimethylation without altering DNA methylation in the promoter region of p16INK4a and down-regulates its expression in the liver of mice, *J. Appl. Toxicol.*, 33: 951-8.
- Suzuki T., Yamashita S., Ushijima T., Takumi S., Sano T., Michikawa T., Nohara K. (2013) Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors, *Cancer Sci.*, 104: 1575-85.
- 鈴木武博, 野原恵子 (2014) 環境因子によるエピジェネティック制御, *毒性の科学*, 4-52.
- 鈴木武博, 野原恵子 (2015) 無機ヒ素によるマウス肝がん増加に関連したエピジェネティック変化と DNA メチル化マーカーの探索, *日本衛生学雑誌*, 70 (3) : 181-185.
- Takumi S., Aoki Y., Sano T., Suzuki T., Nohmi T., Nohara K. (2014) In vivo mutagenicity of arsenite in the livers of gpt delta transgenic mice, *Mutation Res*, 760: 42-7.
- Takumi S., Okamura K., Yanagisawa H., Sano T., Kobayashi T., Nohara, K. (2015) The effect of a methyl deficient diet on the global DNA methylation and the DNA methylation regulatory pathways, *J Appl. Toxicol*, 35: 1550-6.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Hirano S., Fujimaki H. (2011) Exposure to Nanoparticle-rich Diesel Exhaust Affects Hippocampal Functions in Mice, *Japanese Journal of Hygiene*, 66(4): 628-633.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Kunugita N., Yoshida Y., Fujimaki H. (2011) Role of hippocampal TLR4 in neurotoxicity in mice following toluene exposure, *Neurotoxicology and Teratology*, 33(5): 598-602.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Kunugita N., Yoshida Y., Nakajima N., Tsukahara S., Fujimaki H. (2012) Differential mRNA expression of neuroimmune markers in the hippocampus of infant mice following toluene exposure during brain developmental period, *J. Appl. Toxicol.*, 32(2): 126-134.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H. (2012) Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice, *J. Appl. Toxicol.*, 32(4): 300-304.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Nakajima D., Fujimaki H. (2012) Involvement of TLR4 in diazinon-induced neurotoxicity in mice, *J. UOEH.*, 34(1): 1-13.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Kunugita N., Nakajima N., Yoshida Y., Tsukahara S., Fujimaki H. (2012) Developmental stage specific changes in immunological biomarkers in male C3H/HeN mice after early toluene exposure, *Toxicology Letters.*, 208: 133-141.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S., Fujitani Y., Hirano S., Fujimaki H. (2012) Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice, *Nanotoxicology.*, 6(5): 543-553.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H., Fujitani Y., Hirano S. (2012) Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 262(3): 355-362.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H., Arashidani K., Kunugita N. (2013) Indoor volatile organic compounds and chemical sensitivity reactions, *Clin. Dev. Immunol.*, 623812.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Sone H., Furuyama A., Nitta H., Hirano S. (2013) Effects of acute single intranasal instillation of secondary organic aerosol on neurological and immunological biomarkers in the brain and lung of BALB/c mice, *J. Toxicol. Sci.*, 38(1): 71-82.

Tin-Tin-Win-Shwe, Yanagisawa R., Koike E., Nitta H., Takano H. (2013) Expression levels of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after phthalate exposure, *J. Appl. Toxicol.*, 33(10): 1070-1078.

Tin-Tin-Win-Shwe, Nakajima D., Ahmed S., Fujimaki H. (2013) Impairment of novel object recognition in adulthood after neonatal exposure to diazinon, *Arch. Toxicol.*, 87(4): 753-762.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Kyi-Tha-Thu C., Furuyama A., Michikawa T., Tsukahara S., Nitta H., Hirano S. (2014) Effects of diesel engine exhaust origin secondary organic aerosols on novel object recognition ability and maternal behavior in BALB/c mice, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11(11): 11286-11307.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H. (2015) Activation of transcription factors in a mouse lung following exposure to environmental chemical and biological agents, *J. Toxicol. Sci.*, 40(5): 5595-68.

Tin-Tin-Win-Shwe, Kyi-Tha-Thu C., Moe Y., Maekawa F., Yanagisawa R., Furuyama A., Tsukahara S., Fujitani Y., Hirano S. (2015) Nano-Sized Secondary Organic Aerosol of Diesel Engine Exhaust Origin Impairs Olfactory-Based Spatial Learning Performance in Prewaning Mice, *Nanomaterials*, 5: 1147-1162.

Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Moe Y., Fujitani Y., Tsukahara S., Hirano S. (2016) Exposure of BALB/c mice to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol (DE-SOA) during the developmental stages impairs the social behavior in adult life of the males, *Front Neuroscience*, 9: 524.

Yanagisawa R., Warabi E., Inoue K.I., Yanagawa T., Koike E., Ichinose T., Takano H., Ishii T. (2012) Peroxiredoxin I Null Mice Exhibits Reduced Acute Lung Inflammation Following Ozone Exposure, *J. Biochem.*, 152(6): 595-601.

Yanagisawa R., Koike E., Ichinose T., Takano H. (2014) Obese mice are resistant to eosinophilic airway inflammation induced by diesel exhaust particles, *J. Appl. Toxicol.*, 34(6): 688-694.

Yanagisawa R., Koike E., Win-Shwe T.T., Ichinose T., Takano H. (2016) Low dose benzo[a]pyrene aggravates allergic airway inflammation in mice, *J. Appl. Toxicol.*, In press.

2.2 口頭発表

発表者・(暦年)・題目・学会等名称

Aung K.H., Kurihara R., Nakashima S., Maekawa F., Nohara K., Kobayashi T., Tsukahara S. (2012) Evaluation of sodium arsenite-induced inhibition of neurite outgrowth by live cell imaging and alteration of cytoskeletal gene expression in Neuro-2a cells, 第 17 回日本行動神経内分泌研究会.

Aung K.H., Kurihara R., Nakashima S., Maekawa F., Nohara K., Kobayashi T., Tsukahara S. (2013) Live imaging analysis of sodium arsenite-induced inhibition of neurite outgrowth in Neuro-2a cells, 第 12 回分子予防環境医学研究大会.

Aung K.H., Maekawa F., Chaw Kyi Tha Thu, Sano K., Nakamura K., Tanoue A., Takeyama M., Nohara K., Tsukahara S. (2014) Effect of prenatal exposure to arsenic on cell number and morphology of neuron in prelimbic cortex of adult mice, 21st Japanese Society for Behavioral Neuroendocrinology.

Fujimaki H., Tin-Tin-Win-Shwe (2011) Effect of diazinon injection during developmental stage on immune response in mice, 52nd Annual Meeting of Japanese Society for Atmospheric Environment.

Fujimaki H., Tin-Tin-Win-Shwe, Yoshida Y., Kunugita N., Arashidani K. (2011) Changes in the expression of chemokine receptor mRNAs in mice lung exposed to low-level toluene, 52nd Annual Meeting of Japanese Society for Atmospheric Environment.

Fujimaki H., Tin-Tin-Win-Shwe (2011) Developmental diazinon exposure induces immune dysfunction in adult mice, 47th Congress of the European Society of Toxicology.

Ishii T., Warabi E., Yanagawa T., Yanagisawa R. (2014) Proinflammatory Functions of Extracellular Peroxiredoxin 1: A Case in Ozone Induced Acute Lung Inflammation in Mice, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International.

小池英子, 柳澤利枝, 高野裕久 (2011) フェナントレンおよびナフタレンとその誘導体がヒト気道上皮細胞に及ぼす影響. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会.

小池英子, 柳澤利枝, 高野裕久 (2012) ポリプロモジフェニルエーテルがヒト気道上皮細胞に及ぼす影響, 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会.

小池英子, 柳澤利枝, 高野裕久 (2012) フェナントレンおよびナフタレンとその誘導体がマウス免疫担当細胞に及ぼす影響, 第 82 回日本衛生学会学術総会.

小池英子 (2012) 環境化学物質によるアレルギー増悪機構に関する検討. 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会.

Koike E., Yanagisawa R., Takano H. (2012) Immunological effects of phthalates and other chemicals in consumer products, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology.

小池英子, 柳澤利枝, 高野裕久 (2013) 臭素系難燃剤が気道上皮細胞の炎症性タンパクの発現に及ぼす影響機序の検討, 第 20 回日本免疫毒性学術大会.

Koike E., Yanagisawa R., Takano H. (2013) Brominated flame retardants stimulate immune response in vitro, The 49th Congress of the European Societies of Toxicology.

小池英子, 柳澤利枝, 高野裕久 (2013) 多環芳香族炭化水素が気道上皮細胞に及ぼす影響と機序に関する検討. 第 40 回日本毒性学会.

小池英子, 柳澤利枝, Tin Tin Win Shwe, 高野裕久 (2013) 臭素系難燃剤がヒト気道上皮細胞に及ぼす影響, 第 12 回分子予防環境医学研究会.

小池英子 (2013) フタル酸エステル等の生活用品に含有される化学物質が免疫応答に与える影響, 日本薬学会第 133 年会.

小池英子, 柳澤利枝, Tin Tin Win Shwe, 高野裕久 (2014) ビスフェノール A の経気道曝露がアレルギー性気道炎症モデルマウスの免疫系および神経系に及ぼす影響, 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会.

小池英子 (2014) 生活環境化学物質が炎症に関わる免疫応答に及ぼす影響, フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー.

小池英子, 柳澤利枝, 高野裕久 (2014) 環境化学物質による免疫応答の修飾 - アレルギーに及ぼす影響機序の解明に向けて -, 第 41 回日本毒性学会学術年会.

小池英子 (2015) 環境化学物質による炎症反応の亢進と免疫担当細胞機能の攪乱, 第 22 回日本免疫毒性学会学術年会.

小池英子 (2015) 環境汚染物質による現代病増悪の細胞・分子メカニズム, 第 42 回日本毒性学会学術年会.

前川文彦, 榛葉繁紀, 内匠正太, 大和田美佳, 包 金花, 野原恵子 (2011) 環境応答に関わる DNA メチル基転移酵素の時計遺伝子による発現制御, 環境ホルモン学会第 14 回研究発表会.

前川文彦, 榛葉繁紀, 内匠正太, 大和田美佳, 包 金花, 野原恵子 (2011) 肝臓における DNA メチル基転移酵素遺伝子発現の概日周期: 摂食と時計遺伝子の役割, 第 32 回日本肥満学会.

Maekawa F., Tsuboi T., Nohara K. (2011) The effect of AMPA receptor overexpression on suppressed neurite outgrowth by sodium arsenite in mouse cortical neuron, The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.

前川文彦 (2011) 胎児期・新生児期の環境と健康～実験動物を用いた化学物質影響評価～. 第 18 回 NPO 法人東京血管疾患研究所セミナー.

前川文彦, 榛葉繁紀, 内匠正太, 佐野友春, 野原恵子 (2012) 肝臓における DNA メチル基転移酵素遺伝子発現と DNA メチル化の日内変動, 日仏生物学会第 177 回例会.

Maekawa F., Tsuboi T., Tsukahara S., Nohara K. (2012) Impairment of glutamate AMPA receptor expression by sodium arsenite is related to the neurite suppression in mouse cortical neurons, Neuroscience 42nd Annual Meeting.

前川文彦, 坪井貴司, 塚原伸治, 野原恵子 (2012) マウス神経細胞において無機ヒ素が AMPA 型グルタミン酸受容体発現に与える影響, 第 35 回日本神経科学大会.

前川文彦, 榛葉繁紀, 内匠正太, 佐野友春, 鈴木武博, 包 金花, 大和田美佳, 江原達弥, 小川佳宏, 野原恵子 (2012) 肝臓における DNA メチル基転移酵素 mRNA 発現の日内変動: 摂食と時計遺伝子による制御, 第 17 回日本行動神経内分泌研究会.

前川文彦, 榛葉繁紀, 内匠正太, 佐野友春, 包 金花, 大和田美佳, 野原恵子 (2012) マウス肝臓における DNA メチル基転移酵素 mRNA 発現と DNA メチル化レベルの日内変動調節機構, 第 6 回日本エピジェネティクス研究会.

前川文彦, 野原恵子, 塚原伸治 (2012) 有害化学物質から発達期の脳を守るための試験法の開発 埼玉大学・国立環境研究所共催シンポジウム 我々を取り巻く環境と健康～環境科学と基礎生物学の最近の研究動向～. 埼玉会館.

Maekawa F., Tsukahara S., Nohara K. (2013) Effects of Perinatal Arsenic Exposure on the Development of Mice Brain, NIES Arsenic Workshop.

前川文彦, 村井 景, 野原恵子 (2013) マウス胎児期無機ヒ素曝露による後発的血糖制御異常, 第 19 回日本行動神経内分泌研究会.

前川文彦, 坪井貴司, 塚原伸治, 野原恵子 (2013) 無機ヒ素による神経細胞の AMPA 型グルタミン酸受容体発現抑制, 第 12 回分子予防環境医学研究大会.

前川文彦 (2014) 幼少期の環境が行動発達に及ぼす影響. 第 20 回「性と生殖」公開シンポジウム「人間科学における神経内分泌研究の展開」

前川文彦, 藤原 研, 鳥谷真佐子, 野原恵子, 矢田俊彦 (2014) 全身エネルギー代謝における BDNF の役割と糖尿病性内臓肥満症における治療可能性. 日本生理学会第 91 回大会

Maekawa F., Aung K.H., Thu C.K., Sano T., Nakamura S., Tanoue A., Kakeyama M., Tohyama C., Nohara K., Tsukahara S. (2015) Prenatal arsenic exposure impaired behavioral flexibility and morphology of cortex in mice, 9th World Congress International Brain Research Organization.

前川文彦, チョウ・テツ・アウン, チョウ・チー・ター・トゥー, 佐野一広, 中村和昭, 田上昭人, 掛山正心, 塚原伸治, 野原恵子 (2015) 発達期の無機ヒ素曝露による後発的行動異常の検出, 第 14 回分子予防環境医学研究大会.

Maekawa F., Sano K., Suzuki G., Nakayama S., Isobe T., Tin-Tin-Win-Shwe, Hashimoto S., Kawashima T. (2016) Evaluation of potentially developmentally neurotoxic chemicals using behavioral testing and neuroendocrinological analysis. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan.

松下隼也, 岡村和幸, 鈴木武博, 中林一彦, 堀部 悠, 河合智子, 秦健一郎, 櫻井敏博, 市原 学, 野原恵子 (2016) C3H マウスの肝腫瘍形成に關与する DNA メチル化の探索, 日本薬学会, 第 136 回.

野原恵子, 内匠正太, 岡村和幸, 前川文彦, 鈴木武博, 村井 景, 立石幸代 (2011) 胎児期無機ヒ素曝露によるマウスの自然発癌増加とヘムオキシゲナーゼ遺伝子および L1 レトロトランスポゾンの発現増加, 第 34 回日本分子生物学会年会.

野原恵子, 立石幸代, 鈴木武博, 村井 景, 内匠正太, 前川文彦, 岡村和幸 (2011) C3H マウスの胎児期無機ヒ素曝露による成長後の肝癌増加と後発的遺伝子発現変化, 日本環境変異原学会第 40 回大会.

野原恵子, 包 金花, 内匠正太, 前川文彦 (2011) マウス肝臓における DNA メチル基転移酵素 Dnmt3b 発現の概日周期の制御機構, 第 5 回エピジェネティクス研究会年会.

野原恵子, 岡村和幸, 鈴木武博, 村井 景, 新城恵子, 近藤 豊 (2012) C3H マウスへの胎児期無機ヒ素曝露による F1 および F2 世代での Ha-ras 変異をもった腫瘍の増加, 第 35 回日本分子生物学会年会.

野原恵子, 岡村和幸 (2012) 胎児期ヒ素曝露をうけた C3H マウス雄肝臓における Ha-ras 変異をもった腫瘍の増加, 第 71 回日本癌学会学術総会.

野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 内匠正太, 前川文彦, 小堀真珠子 (2012) 胎児期ヒ素曝露による C3H マウス雄肝臓での脂質代謝変化と Ha-ras 変異をもった腫瘍の増加, 第 1 回日本 DOHaD 研究会年会.

Nohara K., Suzuki T., Tateishi Y., Okamura K., Murai H., Takumi S., Maekawa F., Nishimura N., Ito T. (2012) Late increases in tumorigenic stress and tumors with a Ha-ras mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic, Prenatal Programming and Toxicity (PPTOX) III Meeting.

Nohara K., Tateishi Y., Suzuki T., Murai H., Takumi S., Okamura K., Maekawa F., Nishimura N., Ito T. (2012) Late-onset gene expression changes in the livers of male C3H mice maternally exposed to arsenic: Implications for an increase in hepatic tumor incidence, Society of Toxicology 51st Annual Meeting.

野原恵子 (2012) 無機ヒ素による発癌への変異とエピ変異の関与, 第 7 回環境エピゲノミクス研究定例会.

Nohara K., Suzuki T., Takumi S., Okamura K., Maekawa F. (2013) The Effects of Gestational Inorganic Arsenic Exposure in the Offspring and Future Generations, NIES Arsenic Workshop.

野原恵子, 岡村和幸, 鈴木武博, 村井 景, 内匠正太, 新城恵子, 近藤 豊 (2013) マウス胎児期無機ヒ素曝露によって F2 世代の肝臓において誘導される遺伝子発現変化, 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会.

野原恵子 (2013) 環境化学物質の胎児期曝露による発癌に関する後発影響と継世代影響, 第 40 回日本毒性学会学術年会.

野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 内匠正太 (2013) 無機ヒ素の胎児期曝露による後発的発癌増加の機序, 第 83 回日本衛生学会学術総会.

野原恵子, 岡村和幸, 鈴木武博, 村井 景, 小堀真珠子 (2014) 妊娠期無機ヒ素曝露による F2 雄マウスでの肝腫瘍増加の機序の探索, フォーラム 2014, 衛生薬学・環境トキシコロジー.

野原恵子, 岡村和幸 (2014) 妊娠中にヒ素曝露を受けた C3H マウス雌の F2 子孫における肝癌の遺伝子発現変化, 第 73 回日本癌学会学術総会.

野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 村井 景, 上田佳代 (2014) C3H マウスへの無機ヒ素妊娠期曝露は F1 雄を介して F2 雄の肝癌を増加させる, 第 41 回日本毒性学会学術年会.

Nohara K., Okamura K., Suzuki T., Murai H., Ito T., Shinjo K., Kondo Y. (2014) Maternal arsenic exposure of C3H mice increases hepatic tumor with an activating mutation in the oncogene Ha-ras in the F2 generation, Society of Toxicology 53rd Annual Meeting.

野原恵子 (2014) DOHaD と環境化学物質, 第 84 回日本衛生学会学術総会.

野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 内匠正太 (2015) 無機ヒ素のエピジェネティック作用, 変異原性, 多世代・継世代影響, 日本環境変異原学会, 第 44 回大会.

Nohara K., Okamura K., Suzuki T., Hatada I., Hata K. (2015) The Effects of Gestational Arsenite Exposure on the F2 Generation: Role of Epigenetics, Society of Toxicology 54th Annual Meeting.

岡村和幸, 野原恵子 (2011) 長期ヒ素曝露による B リンパ球のセネッセンス誘導, 第 34 回日本分子生物学会年会.

岡村和幸, 野原恵子 (2012) 無機ヒ素長期曝露による B リンパ球での DNA 損傷誘導, 日本環境変異原学会第 41 回大会.

岡村和幸, 野原恵子 (2012) 胎児期ヒ素曝露による肝腫瘍増加を促進する遺伝子発現変化, 第 71 回日本癌学会学術総会.

岡村和幸, 野原恵子 (2012) ヒ素が誘導する senescence への p130 の関与, 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会.

岡村和幸, 野原恵子 (2013) 無機ヒ素はリン酸化・ユビキチン化・プロテアソーム分解を阻害することによって p130 を増加させ G0/G1 arrest を誘導する, 第 36 回日本分子生物学会年会.

岡村和幸, 野原恵子 (2014) 無機ヒ素曝露による p16-cdk4 複合体増加を介したリンパ球増殖抑制機序, フォーラム 2014, 衛生薬学・環境トキシコロジー.

岡村和幸 (2014) 無機ヒ素による疾患への細胞老化の関与, 衛生薬学・環境トキシコロジー, 第 1 回若手研究者の会 in つくば〜フォーラム 2014 プレシンポジウム〜.

岡村和幸, 野原恵子 (2014) ヒ素曝露によるリンパ球 G0/G1 期停止を誘導する低リン酸化体 p16, 第 84 回日本衛生学会学術総会.

Okamura K and Nohara K. (2014) Arsenite exposure-induced lymphocytes G0/G1 arrest is attributable to p130 accumulation via p16 Increase, Society of Toxicology 53rd Annual Meeting.

岡村和幸, 鈴木武博, 村井 景, 野原恵子 (2014) 胎児期ヒ素曝露により後発的に増加する肝腫瘍における遺伝子発現変化の探索, 第 13 回分子予防環境医学研究会.

岡村和幸, 鈴木武博, 野原恵子 (2015) 妊娠期ヒ素曝露が F2 マウス肝腫瘍で誘導する DNA メチル化変化とその遺伝子発現制御, 第 74 回日本癌学会学術総会.

岡村和幸, 中村一彦, 堀部 悠, 河合智子, 鈴木武博, 秦健一郎, 野原恵子 (2015) 妊娠期ヒ素曝露による C3H マウス孫世代の肝腫瘍増加に関与する DNA メチル化変化の RRBS 法による探索, 第 42 回日本毒性学会学術年会.

岡村和幸, 野原恵子 (2016) Long-term arsenite exposure induces premature senescence via DNA damage accumulation in mouse B lymphoma cell line A20 cells, 44th Myanmar Health Research Congress.

定金香里, 市瀬孝道, 高野裕久, 柳澤利枝, 小池英子 (2012) アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジエチルヘキシル経口曝露の影響, 第 82 回日本衛生学会学術総会.

定金香里, 市瀬孝道, 高野裕久, 柳澤利枝, 小池英子 (2013) ベンゾ [a] ピレン低用量経口曝露によるアトピー性皮膚炎増悪作用, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会.

定金香里, 市瀬孝道, 高野裕久, 柳澤利枝, 小池英子 (2013) アトピー性皮膚炎モデルに対するフタル酸ジイソノニル経口曝露の影響, 日本衛生学会第 83 回学術総会.

佐野一広, 前川文彦, 村井 景, 野原恵子 (2014) 発達期ヒ素曝露マウスにおける脂肪組織の形態・遺伝子発現変化, 第 17 回環境ホルモン学会研究発表会.

Sano K., Maekawa F., Murai H., Nohara K (2015) Adipose tissue malfunction in prenatally arsenic-exposed mice. The Joint Meeting of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists, the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan.

鈴木 剛, 滝上英孝, 佐野一広, 前川文彦, 中山祥嗣, 磯部友彦, Tin-Tin-Win-Shwe, 野原恵子, 橋本俊次, 川嶋貴治 (2015) ハウスダスト中難燃剤の影響評価指向分析の試み〜 in vitro バイオアッセイ/化学分析/ in vivo 毒性試験統合手法の適用〜. 第 21 回日本環境毒性学会研究発表会.

鈴木 剛, 佐野一広, 中山祥嗣, 磯部友彦, Tin-Tin-Win-Shwe, 橋本俊次, 川嶋貴治, 滝上英孝, 野原恵子, 前川文彦 (2015) Effect-based hazard identification of flame retardants in house dust: Application of in vitro assays combined with instrumental analysis for subsequent in vivo testing as an integrated effect and exposure analysis. 環境ホルモンの学会第 18 回研究発表会.

鈴木武博, 山下 聡, 立石幸代, 牛島俊和, 野原恵子 (2011) 無機ヒ素曝露によって増加したマウス肝臓癌において特異的に DNA メチル化が変化する領域の探索, 日本環境変異原学会第 40 回大会.

鈴木武博, 山下 聡, 内匠正太, 立石幸代, 佐野友春, 牛島俊和, 野原恵子 (2011) 胎児期無機ヒ素曝露によって増加したマウス肝臓癌におけるゲノムワイドな DNA メチル化変化の解析, 第 17 回ヒ素シンポジウム.

鈴木武博, 野原恵子 (2012) ヒ素による Fosb 発現増加に関するエピジェネティック修飾の検討, 第 35 回日本分子生物学会年会.

鈴木武博, 山下 聡, 内匠正太, 立石幸代, 佐野友春, 牛島俊和, 野原恵子 (2012) ヒ素によるマウス肝癌の網羅的 DNA メチル化解析による領域特異的メチル化変化と Fosb 発現増加の検出, 第 6 回日本エピジェネティクス研究会.

Suzuki T., Nohara K. (2013) Genome-Wide and Site-Specific Analyses of DNA Methylation Changes Induced by Arsenic Exposure, NIES Arsenic Workshop.

鈴木武博, 山下 聡, 牛島俊和, 内匠正太, 佐野友春, 野原恵子 (2013) 胎児期ヒ素曝露によるマウス肝腫瘍の領域特異的な DNA メチル化と遺伝子発現変化, 第 2 回日本 DOHaD 研究会.

鈴木武博, 野原恵子 (2013) Fosb 遺伝子発現調節における遺伝子領域内部 DNA メチル化の関与の検討, 第 83 回日本衛生学会学術総会.

鈴木武博, 野原恵子 (2014) マウス肝臓癌細胞株における無機ヒ素による Fosb の発現と DNA メチル化変化, フォーラム 2014, 衛生薬学・環境トキシコロジー.

Suzuki T., Yamashita S., Ushijima T., Takumi S., Sano T., Nohara K. (2014) Identification of DNA methylation changes in the liver tumors induced by gestational arsenic exposure using genome-wide analysis, Society of Toxicology 53rd Annual Meeting.

鈴木武博, 野原恵子 (2014) マウス肝臓癌細胞株における Fosb 発現と DNA メチル化の関連, 第 13 回分子予防環境医学研究会.

鈴木武博, 山下 聡, 牛島俊和, 内匠正太, 佐野友春, 野原恵子 (2014) 胎児期無機ヒ素曝露によるマウス肝腫瘍の DNA メチル化変化, 第 84 回日本衛生学会学術総会.

鈴木武博, 岡村和幸, 野原恵子 (2015) Fosb 発現と DNA メチル化変化の対応関係を検討する実験系の探索, 日本環境変異原学会, 第 44 回大会.

鈴木武博, Khaled Hossain, 姫野誠一郎, 野原恵子 (2016) The relationship between chronic arsenic exposure and DNA methylation levels of LINE-1 through a cross sectional study in Bangladesh, 44th Myanmar Health Research Congress.

内匠正太, 青木康展, 佐野友春, 野原恵子 (2012) マウス肝臓脂質代謝経路に無機ヒ素が及ぼす影響, 環境ホルモンの学会第 15 回研究発表会.

内匠正太, 青木康展, 佐野友春, 鈴木武博, 能美健彦, 野原恵子 (2012) gpt delta マウスを用いた無機ヒ素による in vivo 突然変異解析, 日本環境変異原学会第 41 回大会.

内匠正太, 佐野友春, 野原恵子 (2012) メチオニン・コリン欠乏食によるグローバルな DNA 低メチル化への塩基除去修復機構の関与, 第 7 回環境エピゲノミクス研究定例会.

内匠正太, 佐野友春, 野原恵子 (2012) メチオニン・コリン欠乏食投与による DNA 低メチル化における能動的脱メチル化の関与, 第 82 回日本衛生学会学術総会.

Takumi S., Aoki Y., Nohara K. (2013) In Vivo Mutagenicity of Arsenite, NIES Arsenic Workshop.

内匠正太, 岡村和幸, 鈴木武博, 羽野 寛, 野原恵子, 柳澤裕之 (2014) 胎児期ヒ素曝露が標的臓器に及ぼす影響, 第 84 回日本衛生学会学術総会.

Takumi S., Aoki Y., Sano T., Suzuki T., Nohmi T., Nohara K. (2014) In vivo mutagenicity assay of arsenite using gpt delta transgenic mice, Society of Toxicology 53rd Annual Meeting.

Takumi S., Okamura K., Suzuki T., Hano H., Nohara K., Yanagisawa H. (2015) Gestational Arsenic Exposure Affects Gene Expression in the Kidney and Lung in the F1 and F2 Mice, Society of Toxicology 54th Annual Meeting.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H. (2011) Impact of toll-like receptor (TLR) 4 on hippocampus-dependent object recognition in early life diazinon exposure, Society of Neuroscience.

Tin-Tin-Win-Shwe, Kurokawa Y., Fujitani Y., Hirano S., Fujimaki H. (2011) Spatial and non-spatial learning performance in mice exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust particles, 52nd Annual Meeting of Japanese Society for Atmospheric Environment.

Tin-Tin-Win-Shwe, Kunugita N., Yoshida Y., Fujimaki H. (2011) Studies on the effects of toluene exposure on developing immune system, 18th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunotoxicology.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Hirano S., Fujimaki H. (2011) Hippocampus-dependent spatial learning deficit in mice following sub-chronic exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust, 47th Congress of the European Society of Toxicology.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H. (2011). Developmental exposure to diazinon impairs novel object recognition in later life in a mouse model, 8th International Brain Research Organization (IBRO) World Congress of Neuroscience.

Tin-Tin-Win-Shwe (2011) Evaluation of health risk after exposure to environmental toxic substances using animal models, Nanjing Agricultural University, October 17, 2011. Nanjing, PR China.

Tin-Tin-Win-Shwe, Yanagisawa R., Koike E., Nakajima D., Takano H., Nitta H. (2012) Expression of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after early phthalate exposure, Annual meeting of the Society of Indoor Environment.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Sone H., Nitta H., Hirano S. (2012) Effect of intranasal instillation of secondary organic aerosol (SOA) on brain and lung of mice, 53rd Annual Meeting of Japanese Society for Atmospheric Environment.

Tin-Tin-Win-Shwe, Yanagisawa R., Koike E., Nitta H., Takano H. (2012) Expression of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after early phthalate exposure, 19th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunotoxicology.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H., Fujitani Y., Hirano S., Nitta H. (2012) Impaired novel object recognition ability in female mice following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure, 35th Annual Meeting of Japanese Neuroscience Society.

Tin-Tin-Win-Shwe, 柳澤利枝, 小池英子, 中島大介, 高野裕久, 新田裕史 (2012) Expression of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after early phthalate exposure, 室内環境学会学術大会.

Tin-Tin-Win-Shwe, 柳澤利枝, 小池英子, 新田裕史, 高野裕久 (2012) アレルギー喘息モデルマウスにおけるフタル酸エステル類曝露が神経・免疫バイオマーカーの発現に及ぼす影響, 第19回日本免疫毒性学会学術大会.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Furuyama A., Sone H., Nitta H., Hirano S. (2013) ディーゼル排気由来 SOA のマウスの学習行動・母性行動への影響, 54th Annual Meeting of Japanese Society for Atmospheric Environment.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Sone H., Furuyama A., Nitta H., Hirano S. (2013) Effects of inhalation exposure to secondary organic aerosol generated from diesel exhaust particles on hippocampal function in BALB/c mice, 37th Annual Meeting of Japanese Neuroscience Society.

Tin-Tin-Win-Shwe, Nakajima D., Fujimaki H., Nitta H. (2013) マウス新生児におけるダイアジノン曝露が成獣の学習能力に及ぼす影響, 第2回日本 Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) 研究会.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujimaki H., Fujitani Y., Nitta H., Hirano S. (2013). Effect of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on brain. 第12回分子予防環境医学研究会.

Tin-Tin-Win-Shwe (2013) ディーゼル排気ガス粒子の脳神経系への影響, 国立環境研究所地方環境研究所交流シンポジウム.

Tin-Tin-Win-Shwe (2013) PM2.5 であるディーゼル排気由来二次生成有機エアロゾル(SOA)曝露が脳に及ぼす影響：～マウスの学習行動・母性行動への影響～, Kitasato University (Sagamihara), Graduate School of Medicine, March 2, 2013.

Tin-Tin-Win-Shwe (2013) Biological Effects of Low-Level Indoor Chemical Exposure: Approach to sick building syndrome or environmental illness using animal models, 室内環境学会シンポジウム.

Tin-Tin-Win-Shwe (2013) Environmental pollutants and health risk research in National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan, Seminar in University of Medicine (1), Yangon, Myanmar, November 5, 2013.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Nitta H., Hirano H. (2014) 仔マウスにおける胎児期～乳児期のディーゼル排ガス由来二次生成有機エアロゾル曝露が嗅覚に基づいた空間学習能力に及ぼす影響, 第3回日本 Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) 研究会.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Chaw Kyi Tha Thu, Furuyama A., Tsukahara S., Nitta H., Hirano S. (2014) Diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol affects novel object recognition ability and maternal behavior in BALB/c mice, 8th International Congress of Neuroendocrinology.

Tin-Tin-Win-Shwe, Maekawa F., Chaw Kyi Tha Thu, Fujitani Y., Yanagisawa R., Furuyama A., Tsukahara S., Nohara K., Nitta H., Hirano S. (2014) Effects of developmental exposure to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol on social and learning behavior in adult mice, 38th Annual Meeting of Japanese Neuroscience Society.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Maekawa F., Furuyama A., Nahara K., Nitta H., Hirano S. (2014) ディーゼル排気由来 SOA の胎児期～乳児期曝露がマウスの社会行動・空間学習行動に及ぼす影響, 55th Annual Meeting of Japanese Society for Atmospheric Environment.

Tin-Tin-Win-Shwe, Yanagisawa R., Koike E., Nitta H., Takano H. (2014) Neurotoxicity in allergic mice after early phthalate exposure, International Conference of Asian Environmental Chemistry.

Tin-Tin-Win-Shwe, 藤谷雄二, 前川文彦, 柳澤利枝, 古山昭子, 野原恵子, 新田裕史, 平野靖史郎 (2014) ディーゼル排気由来 SOA の胎児期～乳児期曝露がマウスの社会行動・空間学習行動に及ぼす影響, 大気環境学会第55回大会.

Tin-Tin-Win-Shwe, Maekawa F., Kyi-Tha-Thu C., Fujitani Y., Yanagisawa R., Furuyama A., Tsukahara S., Nohara K., Nitta H., Hirano S. (2014) Effects of developmental exposure to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol on social and learning behavior in adult mice, 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Furuyama A., Nitta H., Hirano S. (2015) Developmental exposure to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol on olfactory-based spatial learning performance in preweaning mice, 39th Annual Meeting of Japanese Neuroscience Society.

Tin-Tin-Win-Shwe, Fujitani Y., Nohara K., Hirano S. (2015) Diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol affects olfactory-based spatial learning performance and related gene expressions in preweaning mice, 第4回日本 Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) 研究会.

Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Moe Y., Fujitani Y., Tsukahara S., Watanabe H., Hirano S. (2015) Developmental exposure to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol on social behavior in adult mice, 8th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress.

Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Moe Y., Fujitani Y., Tsukahara S., Nitta H., Hirano S. (2015) Establishment of an olfactory-based spatial learning test for preweaning mice and the effects of early exposure to diesel exhaust origin secondary organic aerosol, 51st Congress of the European Societies of Toxicology.

Tin-Tin-Win-Shwe (2015) Air Pollution and Health Risk: Approach to Improvement of Environmental Health Using Animal Models. Post graduate student Lecture. October 17, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Republic of China.

Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Moe Y., Fujitani Y., Tsukahara S., Maekawa F., Hirano S. (2016). Novel approach to olfactory-based spatial learning ability for preweaning mice and the effects of early exposure to diesel exhaust origin secondary organic aerosol, 44th Myanmar Health Research Congress.

柳澤利枝, 小池英子, 高野裕久 (2011) ベンゾ [a] ピレン (BaP) の経気道曝露がアレルギー性気道炎症モデルに与える影響. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会.

柳澤利枝, 小池英子, Tin Tin Win Shwe, 市瀬孝道, 高野裕久 (2012) フタル酸エステル類の経気道曝露がアレルギー性喘息に及ぼす影響, 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会.

柳澤利枝, 小池英子, Tin Tin Win Shwe, 高野裕久 (2013) ビスフェノール A の経気道曝露がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会.

柳澤利枝, 小池英子, 市瀬孝道, 高野裕久 (2013) 肥満動物モデルはディーゼル排気微粒子 (DEP) の経気道曝露による好酸球性気道炎症に対して抵抗性を示す, 第 54 回大気環境学会年会.

柳澤利枝, Tin-Tin-Win-Shwe, 藤谷雄二, 平野靖史郎, 新田裕史 (2014) ディーゼル排気ガス由来二次生成有機エアロゾル (DE-SOA) の胎児期～乳児期曝露が仔のアレルギー性気道炎症に及ぼす影響, 第 55 回大気環境学会年会.

柳澤利枝, Tin-Tin-Win-Shwe, 藤谷雄二, 平野靖史郎, 新田裕史 (2015) ディーゼル排気ガス由来成分の胎児期～乳児期曝露が仔のアレルギー性気道炎症に及ぼす影響, 第 64 回日本アレルギー学会学術大会.

柳澤利枝 (2015) 環境汚染化学物質曝露による内分泌代謝系のかく乱作用－肥満症への影響－, 第 22 回日本免疫毒性学会.

柳澤利枝 (2015) 環境汚染化学物質による生活習慣病への影響－肥満への影響を中心に－, 第 42 回日本毒性学会学術大会.

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第 119 号
NIES Research Project Report, No.119

(SR - 119 - 2016)

小児・次世代環境保健研究プログラム
(先導研究プログラム)
平成 23 ～ 27 年度

Research Program on Environmental Health for Children and Future Generations
FY2011 ～ 2015

平成 28 年 11 月 30 日発行

編 集 国立環境研究所 編集分科会

発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

E-mail: pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

November 2016

組 版 株式会社 イ セ プ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。
<http://www.nies.go.jp/kanko/index.html>