

198

ウィ

「大境の

……
子どもの
ことは

THE
THE
THE

Nobel
by
TORS
Harva
Boston

••Th
influe
cong
perm
catar

右図
A(上
閉じら
分は
する領
幅が狭
くなっ
ている。

- この様な現象は、脳が出来上がった大人では起こらない。老人が白内障の手術を受けると、視力が回復することからも分かる。

This phenomenon is only for developing brain.
Adult cataracta patient regains sight by lens replacement.

- 胎児、新生児、小児の発達中の脳では、視覚野に限らず、ある特定の時期に、特定の場所で、この様なことが、シグナルの変調によって引き起こされる可能性が十分にあると考えられる。

It is highly plausible that the particular part of the brain during development is affected by the disturbance of proper signalling used for its development.



of H-proline in
er IVC. The light
width represent-
eries of tangential
had the right eye
closed at 2 weeks for 15 months. The input from the normal eye is in form of expanded bands which
in places coalesce, obliterating the narrow gaps which represent the columns connected to the
closed eye.

これを考えると、視覚野にとどまらず、脳のある特定のところでは、発達の途中で必要なシグナルが来ないとちゃんと出来ない場所がたくさんあるのだということだと思います。一番我々が知っているのは、英語の発音ですね。日本人にとって、6歳までにネイティブの発音を聴かないと発音できないとか、音楽のところでは絶対音感もそうかもしれませぬ。そういうことになります。

胎児・子どもの脳が出来上がる過程 the process of brain development

- ① DNAの設計図どおりに部品(神経細胞など)が組みあがること
Parts (neurons, etc) are assembled according to DNA blueprint
【コンピュータで言えば、部品と配線が設計図どおりに組みあがること: コンピュータでは電源をONにしたまま作業することは無い】
Like building a computer; but you don't do it with Power On!
- ② 脳に信号を流しながら(脳を使いながら)神経回路を調整しつつ作り上げる。
 - 胎児や赤ちゃん、子どもは、脳が出来る間、脳を使わずじっとしているわけではない。Brain is assembled using signal:
 - 【コンピュータで言えば、電源をONにし働かせつつ、ICを増やし、配線作業するような芸当をしている！！】It is just like building a computer with its power on.

平成27年度化学物質の内分秘かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

48

なぜそんなことが起こるのか、非常にざっくり申し上げますと、DNAの設計図では部品が組み上がるだけなんです。人間とか動物の脳は、信号を流しながら(脳を使いながら)回路を調整して作っていく。ですから、コンピュータで言えば、電源をONにしたままICを増やしたり配線作業をしています。

どうやって調整しているのか？ 【シナプス競合説】 How it is managed?

- ☆DNAの設計図には、必要以上に沢山の回路(シナプス)を作るように指示が書かれている。

Default DNA blue print orders to make a lot of networks/synapses more than needed.

- ☆余分な回路(シナプス)は、脳を使いながら消去してゆく＝使われないシナプスは消される。

Excess networks/synapses are deleted by the signals: by erasing unused synapses

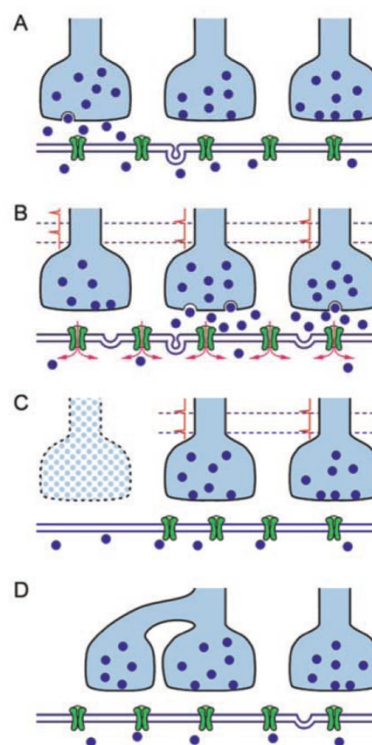
もう少し言うと、どうも設計図だけでは必要以上の回路が出来るようになっていて、実際には使われなかったところを消していくような作業が主なのではないかという説があります。

神経組織の発達のある特定の段階では、適切なシグナルがくるシナプス(回路)だけが残り、使われないものは消える。あるいは消えた後でも、必要に応じて新たに作られる場合もある(可塑性が残っている場合)。

The Developing Synapse: Construction and Modulation of Synaptic Structures and Circuits

Susana Cohen-Cory, *et al.*
Science **298**, 770 (2002);

Fig. 4. Activity-dependent refinement of synaptic connections. (A) Synapses made by terminals of different axons co-innervating the same postsynaptic dendrite are initially maintained by low-level constitutive secretion of neurotransmitters. (B) Synchronous firing of two axon terminals (middle and right) leads to increased postsynaptic depolarization and neurotransmitter receptor activation (red arrows). (C) The unsynchronized axon terminal (left) does not experience postsynaptic spiking at the time of synaptic activation, therefore potentially reducing its retrograde neurotrophic support and ultimately resulting in the weakening of the synapse and the eventual withdrawal of the synaptic terminal. (D) Terminals that are active receive neurotrophic support and sprout (left) to establish new synapses.



シナプス競合説:

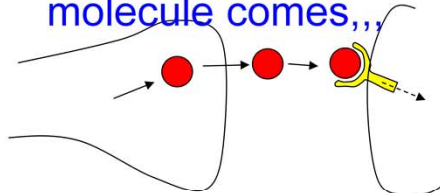
ヘッブの説:

Hebbian theory: Hebb, D.O. (1949), *The organization of behavior*, New York: Wiley

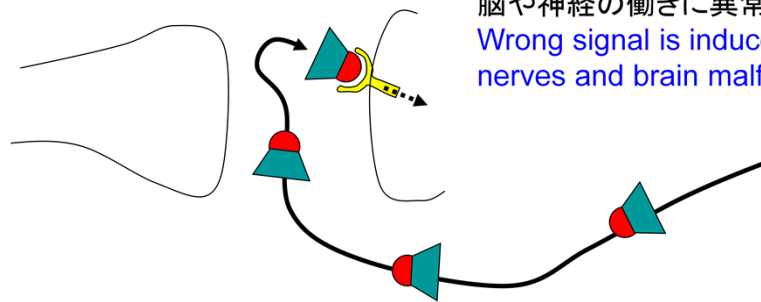
これがヘッブ説(Hebbian theory)です。

これは2002年のサイエンスですが、同調したシグナルが入らないものは消えていく、あるいは後から来たものは増えるとか、「可塑性」という言葉で神経の専門家はおっしゃるのですが、可塑性の問題とヘッブのセオリーで、脳みそというのはそうやって作られていくだろうと。

もしも、神経伝達物質のまねをする
化学物質が来たら、、、
What would happen when false signal
molecule comes,,,



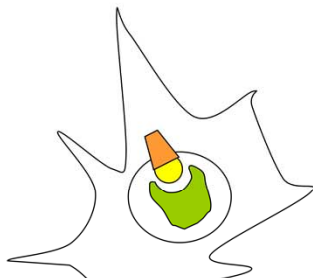
間違った、信号がながれて、
脳や神経の働きに異常が生じる
Wrong signal is induced and
nerves and brain malfunctions



平成27年度化学物質の内分沁かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

では問題。先ほど眼帯をかけて2日で弱視になるのは赤ん坊だけでした。大人ではそんなことは起きません。そういう時期に他の脳の中で違ったものが正常に働いているところに介入したらどうなるかという話になるわけです。

例えば、、、エストロゲン(女性ホルモン)受容体が
胎児、新生児の神経細胞にある。



神経細胞
(エストロゲン受容体を有する)
Neuron with ER

- 体内で作られる自前の女性ホルモン:
17-βエストラジオール(E_2)

10^{-11} M(モル)の濃度で十分にシグナルを伝える

- 体外から飲食を通して体に入る物質で、弱い
女性ホルモン作用を有するもの:
ビスフェノールA(BPA)

$10^{-7}\sim 10^{-8}$ M(モル)の濃度で十分にシグナルを
伝える (E_2 の $1/5,000$ の強さ)

BPAの分子量 ≈ 200 (molecular weight)

1M $\rightarrow 200\text{g/L (kg)}$

10^{-7} M $\rightarrow 200 \times 10^{-7} \text{g/L (kg)}$
 $= 20\mu\text{g/L (kg)}$

平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820.jp

52

これはビスフェノールAを単純にモル濃度計算をして、体内で働いている17β エストラジオールに対して、ビスフェノールAがもし1/5,000の強さだったとすると、分子量が200だとして計算すると、 $20\mu\text{g/M body weight}$ 。もし体全体が、溶媒が均一に薄まるとして、このくらいでエストロゲン受容体にシグナルは流れてもおかしくないわけですね。

- **ビスフェノールA**は、大人・子ども共通の毒性は弱いことが判っています。どの位弱いかというと、**50mg/kg**まで食べてさせても大人のラットには何も起こらないことが調べられています。
- NOAEL of BPA in adult animals is 50mg/kg
- ですから、もしも、子どもや胎児が(母親経由で)、シグナルが伝わる**20µg/kg**を食べただけで何か影響(毒性)が見られたら、今まで知られていたよりもとても「**低用量**」で**毒性**が見られる、ということになるのです。
- If signal toxicity is true, then 20µg/kg of BPA can be sufficient for the developing animals. This is “Low Dose”

=20µg/L (kg)

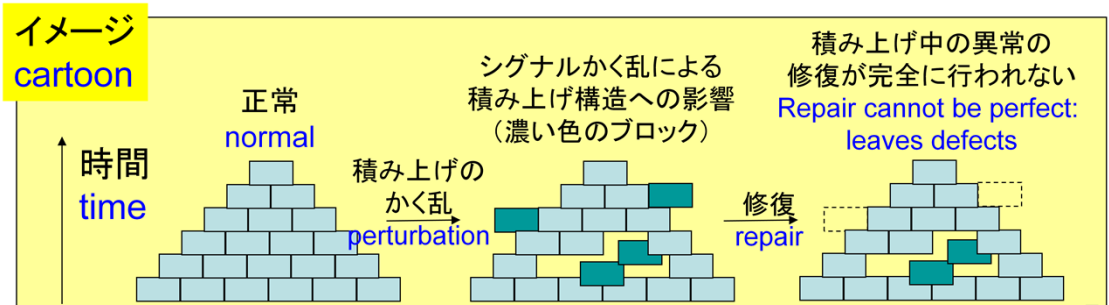
平成27年度化学物質の内分秘かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820_jk

53

そういうことで、この濃度というのは、普通の毒性試験でいう50mg/kgとはかなりかけ離れた濃度なわけですが、もし子供とか胎児とか、エストロゲン受容体を使っているところでこういう濃度で影響が起こるとすれば、これぞいわゆる低用量問題になるわけです。

シグナル毒性の特徴 Characteristics of Signal Toxicity

- 標的 Target
 - 発生・発達期の神経系、免疫系、内分泌系 **developing neuro-, immune-, endocrine system**
 - これらに共通の特徴＝“記憶”する系である **memory system**
 - 系の構築が段階的(積み上げ型＝中枢神経の場合は配線)である **stepwise development**
- 「積み上げ」途中でのかく乱の影響は完全には修復されない
Disturbance during stepwise development cannot be perfectly repaired after development



平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

54

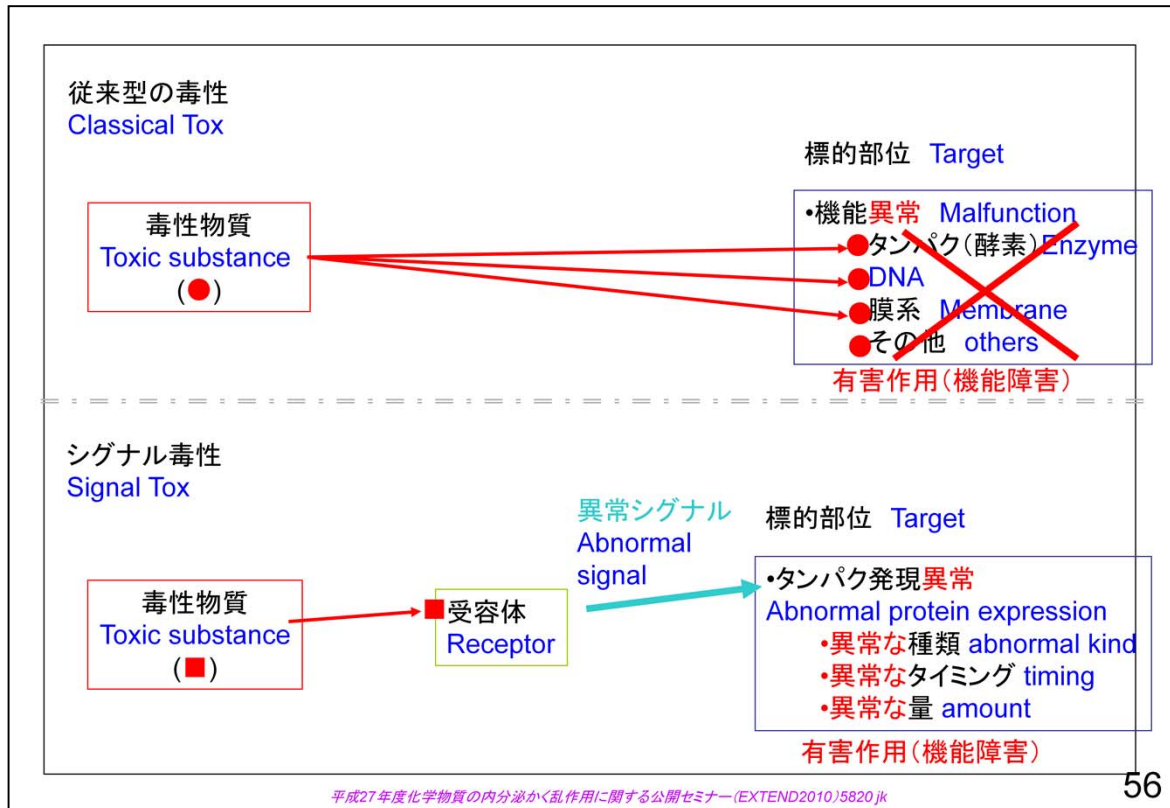
もう少し漫画的なことを言いますと、シグナル毒性のターゲットは、内分泌だけでなく、免疫、神経全部、3通りともです。正常では積み上がっていく時間を必要とするところがかく乱を受けて、一部は直るのですが、直りきらないところが残ると、こういう考えで見えていったほうがいいのではないかと思います。

内分泌かく乱化学物質問題はシグナル毒性として捉える事が出来る
Endocrine Disruptor Issue is Signal Toxicity

- ホルモン活性化学物質 Hormonally Active Chemicals (HACs)
= ホルモン受容体を介した影響
Hormone receptor-mediated effects

- 内分泌かく乱化学物質 Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)
= HACsで有害性を示すもの
HACs that show adverse effects
= 受容体原性毒性 Receptor-Mediated Toxicity
= シグナル毒性 Signal Toxicity

そうすると、Endocrine Disruptorの考え方、もう一回戻りますが、ホルモン活性のある化学物質というのはたくさんあることがわかっていただけです。ホルモン活性とは何だろうというと、受容体を介してシグナルを流すということですから、内分泌かく乱化学物質というのは、ホルモン活性物質の中で有害性を示すものという定義になると思います。ですから、内分泌かく乱化学物質というのは、受容体原性の毒性、言い換えるとシグナルの毒性というふうになるということです。

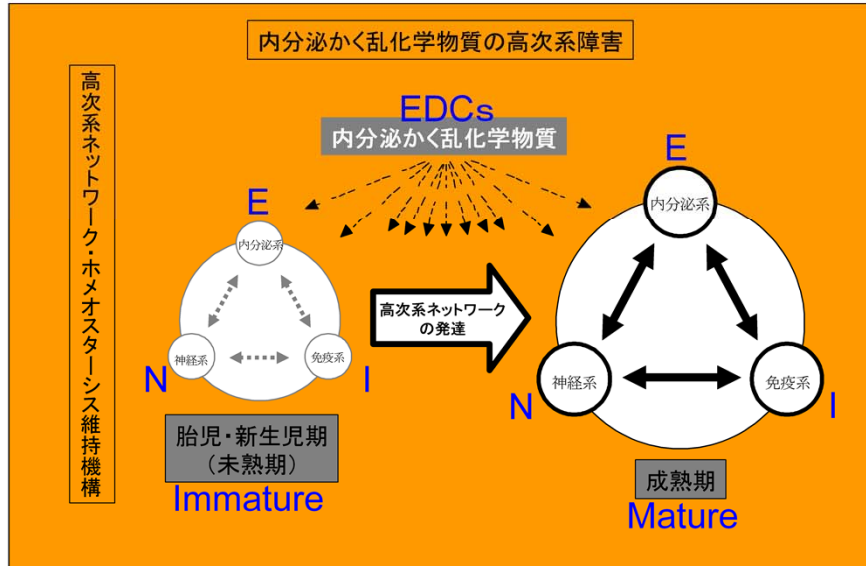


もう少し漫画で描きます。

普通の毒物というのは、従来の毒性の考え方では、普通は現場に行って、蛋白質にくっついたり、DNAにくっついたり、膜をおかしくしたり、要するに異常を起こす現場まで行くわけですが、シグナル毒性あるいは内分泌かく乱というのは、物質は受容体までいいんですね。あとはシグナルがやるんです。異常なシグナルが、異常な遺伝子発現、異常な蛋白発現を、異常な種類を、異常な時間に、異常な量で起こすと影響が出る。ですから、逆説的に言いますと、受容体がないと毒性は出ないのです。ですから、細胞で毒を調べるときに、受容体が出ていない細胞にあるものを振りかけても何も起こらない可能性もあるんです。そこら辺は、ES細胞とか非常に未分化な細胞を *in vitro* で使ったときに、受容体がない場合は反応しないということも念頭に置かなければいけないということになります。

内分泌かく乱化学物質問題は、「シグナル毒性」として考えると最もよく説明できる。

Endocrine Disruptor Issue is Best Explained by the Concept of Signal Toxicity



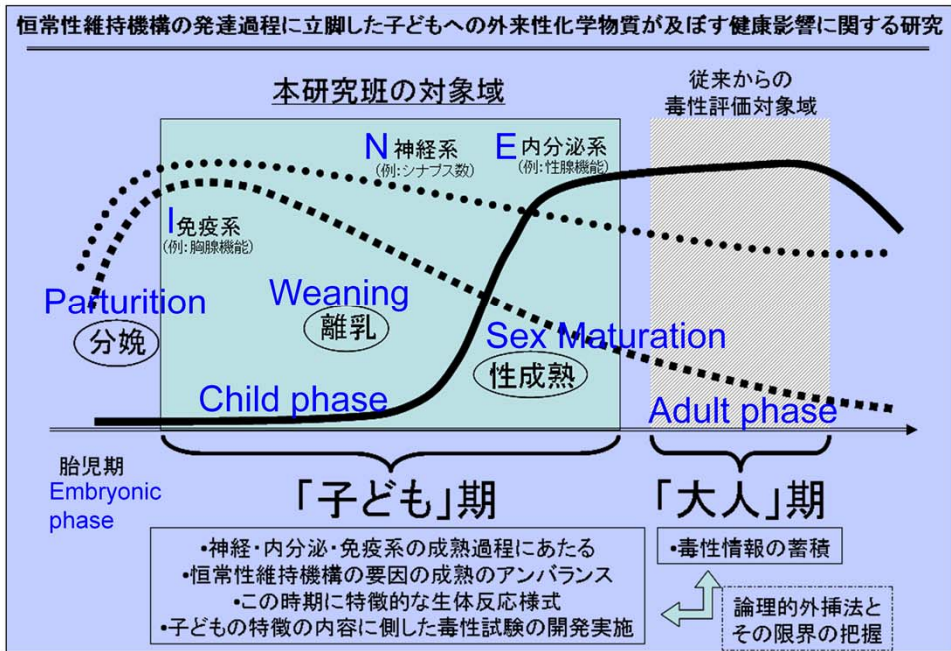
平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

57

概念的な話はもうすぐ終わります。

要するにニューロン、神経系と免疫系と内分泌系が同じシグナルを分け合って、シェアしてホメオスタシスという高次系のネットワークをつくっていますが、これは大人の場合、成熟した場合は非常に強固ですが、未熟な場合、胎児とか新生児の場合はまだ途上であるという考えもできます。この内分泌かく乱あるいはシグナル毒性の標的というのは、このネットワークの成長過程にあるというふうにも言い換えられます。

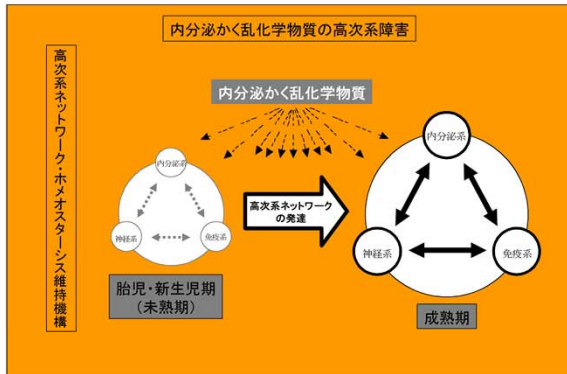
Children's Problem 子供問題



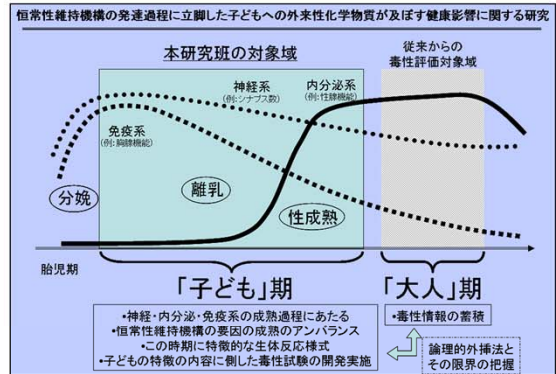
平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー (EXTEND2010)5820 jk

これは蛇足になるのですが、子供の問題というのはまた別に考えられてきて、何が子供で違うかという、内分泌と神経と免疫の系がガラガラガラッと変動する時期なんです。アダルトは比較的安定するのですが、この変動期とこれとの違いもあります。

Endocrine Disruptor Issue



Children's Problem 子供問題



Signal Toxicity
(シグナル原性)
= 低用量問題

Children's Characteristics 子ども特有
= 小さな大人ではない not a small adult
= NOELの違いだけではない
= 低用量問題+高用量問題

共通点: 従来の毒性試験法では対処しきれない
メカニズムを背景にした新しい試験法の開発が必要

平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー (EXTEND2010) 5820 jk

59

時間の関係でざっくりこの絵だけプリントに示していますが、シグナル毒性の問題と子供の問題というのは、かなりオーバーラップしていますが、若干違うものがある。ですから、もし子供も含めるともう少しいろいろ考えなければいけないかもしれないという話です。ここはちょっと中途半端に、右半分は置き去りにさせていただきます。

内分泌かく乱 EDC

- シグナル毒性である

EDC is Signal Toxicity

- 物質だけでは決まらない
 - EDC cannot be defined by chemical alone
 - 「物質」と「暴露を受ける宿主の状態」との組み合わせで決まる
 - EDC is defined by a Combination of “a chemical” and “the status of the exposed host”
- ⇒ 標的ごとに「臨界期」がある

Target has its own specific Critical Period

ここだけで簡単にまとめると、エンドクラインの問題はシグナル毒性で言い換えたほうがいいだろう。問題は、「臨界期」がありますので、物質だけでは決まらない。「物質」と「暴露を受ける宿主の状態」の組み合わせで決まる。ですからペアで決まるんですね。ここに先に書いてあるので先に言ってしまいましたが、その理由は、標的ごとに「臨界期」があるからです。ですから、内分泌かく乱化学物質のリストを出せと言われたことがあるのですが、それは無理ですよ、要するにペアですよ、相手あってのことでのことですという話になります。

内分泌かく乱 EDC

- 用量作用関係は、標的となるシグナル受容体系の性質に依存
- Dose-response characteristics depends on the target signal-receptor system
 - 敏感な受容体が標的なら「低用量」
 - Sensitive system shows low dose effect
 - 鈍感なら「高用量」
 - Insensitive system may not show low dose effect
 - 非単調(non-monotonous)になる場合もある
 - Non-monotonous dose-response can be seen

平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

61

もう少し言いますと、標的となるシグナル受容体系の性質にある程度依存するものがあります。例えば敏感な系であれば低用量影響が出る。エストロゲン系はこれに当たるのではないかと思います。鈍感な系であれば、いくら受容体原性といっても、あるいはシグナル毒性といっても比較的高濃度になります。比較的エストロゲンに比べるとアンドロゲン系は多少高用量型に振れます。あと、ちょっと高度な話になってしまいますが、受容体の系によってはnon-monotonousになる場合が当然あるという話になります。

シグナル毒性の実験例

Examples of Signal Toxicity Study

平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

62

62

ここからあと10分弱で、実際に我々がやった実験系をお見せします。

データ集積の為に、標準化を行った＝ 遺伝子発現量を絶対量として求める方法
＝Percellome(パーセローム)法

Data accumulation needs data standardization
= absolute copy numbers of mRNA per one cell (average)
= Percellome method

BMC Genomics



Methodology article

Open Access

"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays

Jun Kanno^{*†1}, Ken-ichi Aisaki^{†1}, Katsuhide Igarashi¹, Noriyuki Nakatsu¹,
Atsushi Ono¹, Yukio Kodama¹ and Taku Nagao²

Address: ¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and ²President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno^{*} - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

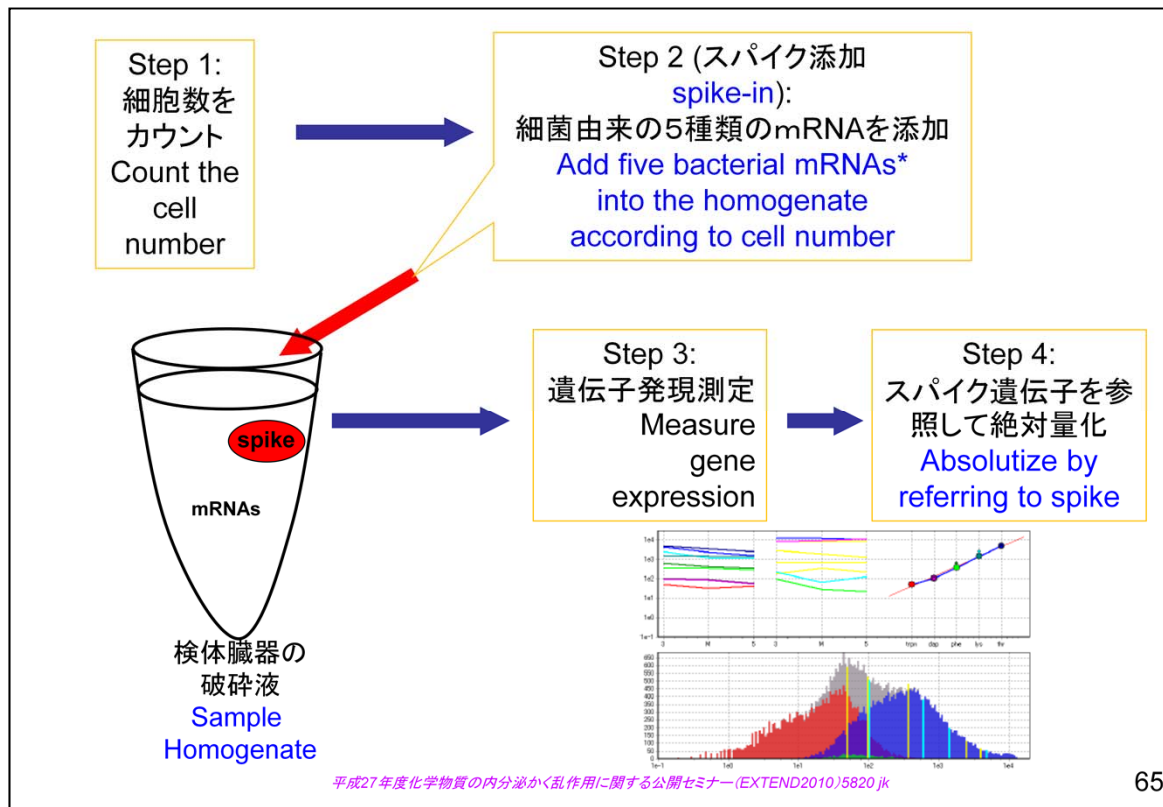
^{*} Corresponding author [†]Equal contributors

Open Access : BMC Genomics. 2006 Mar 29;7(1):64

平成27年度化学物質の内分秘かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

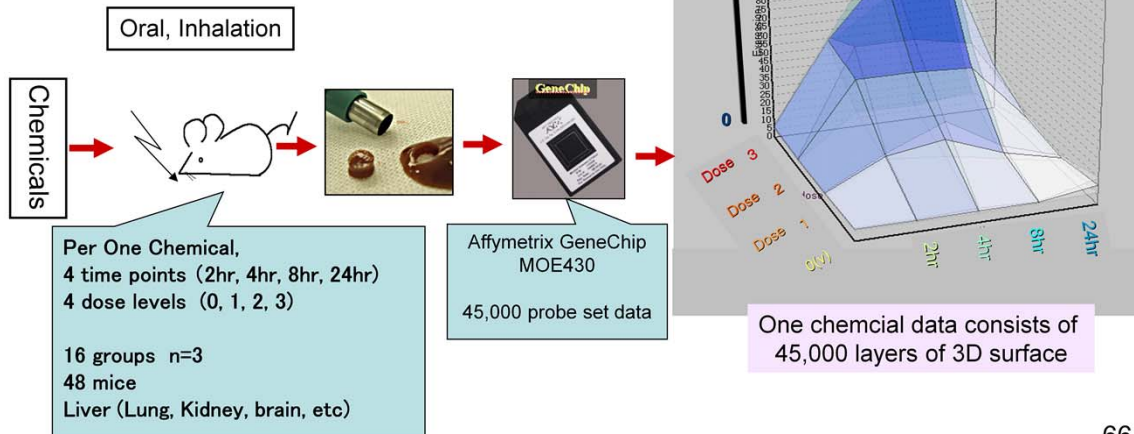
64

さらにこの後、新しいデータをお見せしますが、その前に、この技術を使ったデータが出るものですから、ちょっとだけ横道にそらさせて下さい。これはトキシコゲノミクスを我々がやっているときのベースになった論文で、パーセローム・ノーマライゼーションといいまして、マイクロアレイで出たmRNAの値を絶対量化しています。細胞1個当たりmRNAが何コピー出ているかというものを出す方法です。



メソッドは非常に簡単で、検体の破碎液の細胞数を数えます。何個の細胞からこのサンプルが出来ているかを数えます。そこに細胞数に合わせて5種類の細菌由来のRNAを添加します。このときは細胞1個当たり何コピー入れたかわかっています。マウスならマウスのRNAと細菌のRNAを同時に増やして測定して、入れた細菌の5種類のRNAで検量線が描けるものですから、残りの45,000、これはアフィメトリクス製のチップなんですけど、45,000遺伝子の値が絶対量として出る。こういう技術を十数年前に作りまして、データベースをとっています。

遺伝子発現量を分析する
Percellome プロジェクトの標準
的な実験デザイン
Standard Protocol of
Percellome Project



平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー (EXTEND2010)5820 jk

66

これは標準プロトコルなんですが、投与後2、4、8、24時間、4ドーズで0、1、2、3、 $n=3$ ですから、 4×4 の16群を $n=3$ で、トータル48マウスで、ですから、1つのデータをとるのにアフィメトリクスを48枚使っていますが、これが45,000レイヤー、こういうふうにとれます。絶対量化していますので、縦軸を共通にして、時間経過と用量反応がいつぱんにみられる。こういうデータをとっています。

パーセローム法を用いた吸入暴露試験 Inhalation Percellome Project

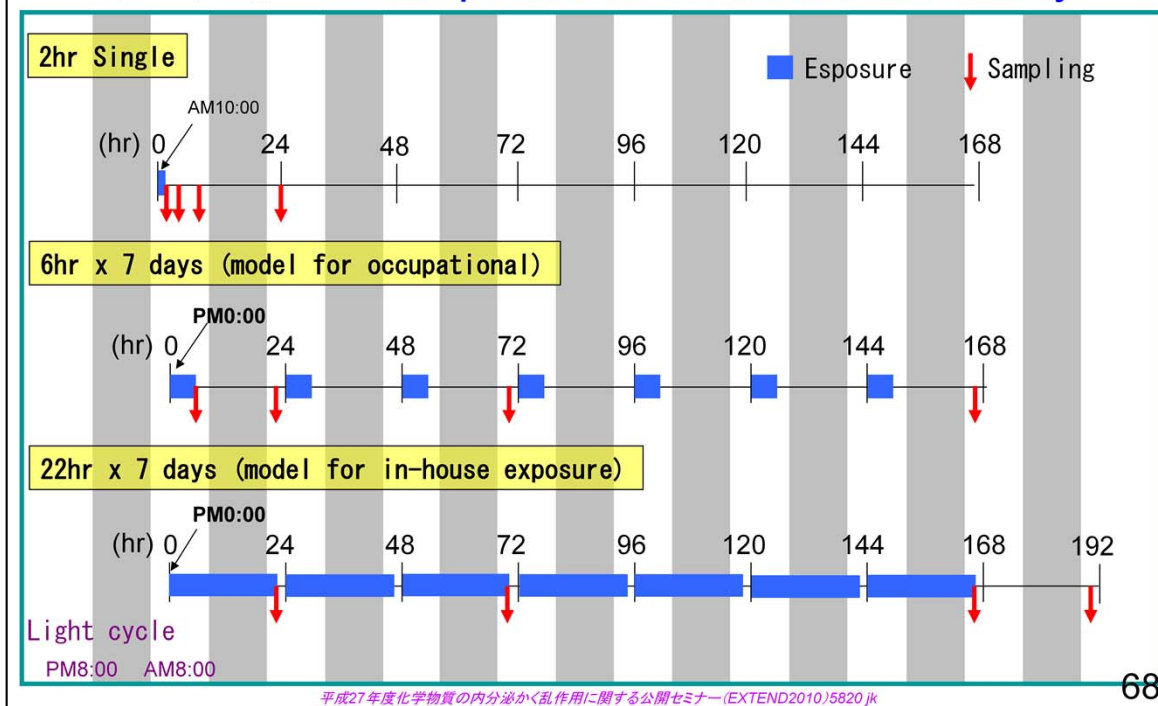


平成27年度化学物質の内分秘かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)5820 jk

67

実験方法に移ります。このスライドは、国立衛研所有の吸入暴露装置を示しております。このような吸入暴露装置を用いて、ガスを安定して発生させ、マウス全身に吸入暴露をおこない、

吸入試験 Three protocols for Inhalation Study



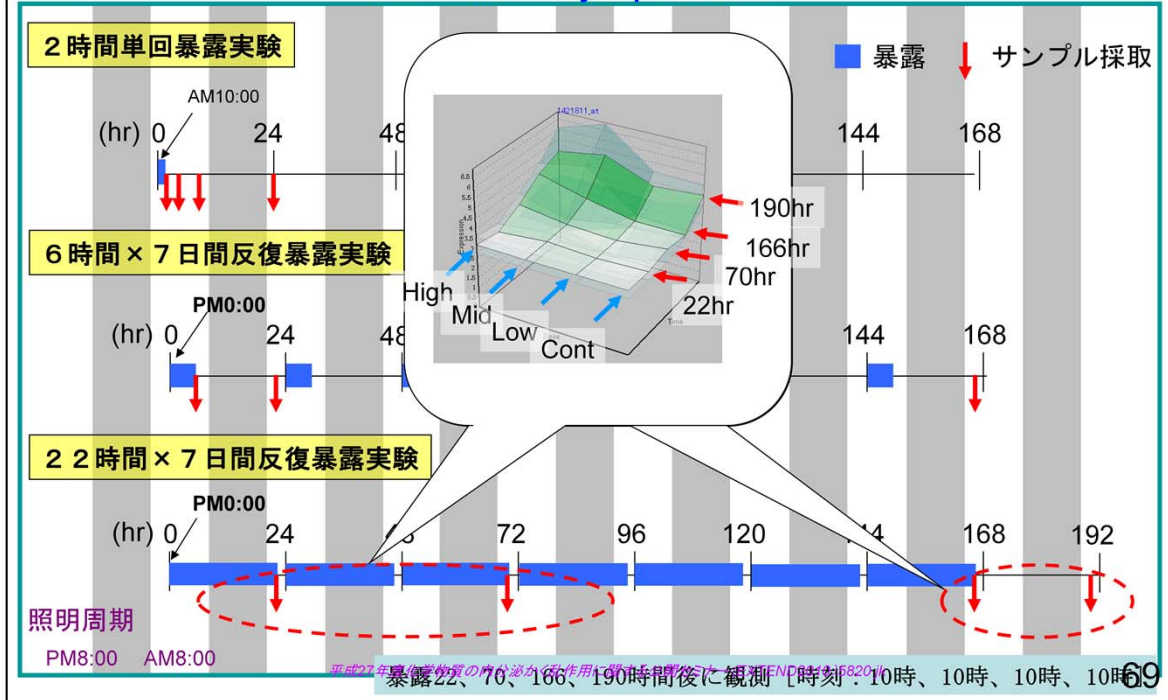
68

6年間の当研究では、このように3種類の吸入暴露プロトコルを設定し、比較・検討致しました。

それぞれ、青いカラムが暴露した時間帯を、赤の矢印はサンプリングする時期を示しております。

多くの遺伝子では、発現の日内変動が認められますので、できるだけサンプリングをおこなう時刻を、各プロトコル間にてそろえる工夫をいたしました。

22時間×7日間反復暴露実験 = 生活暴露モデル
22hr x 7days protocol



3つ目のプロトコルは、1日あたり22時間暴露をおこない、それを7日間反復して吸入暴露する実験として、暴露開始から22、70、166及び190時間後のサンプルを採取いたしました。

このプロトコルでは、シックハウス症候群を考慮し、生活暴露の場合を想定しております。