

は乳類の脳は雌型がデフォルトであり、雄型脳は、自身の精巣が発達するに伴って分泌されるテストステロンが、脳内でアロマターゼの作用でエストロジェンに変換され、その作用によって形成されると考えられている。テストステロンの分泌が起こるのは、マウスでは胎生 16 日頃からとされ、従来エストロジェンシグナルの脳神経系発達に対する影響の検討は、主にこの時期を含む胎生後期から新生児期を対象に行われてきた。一方で、エストロジェンレセプター(ER)は胎生初期から脳内で発現していることが明らかにされており、その点からは、胎生初期の時期にも ER が脳発達において機能している可能性がある指摘される。胎生初期の時期は神経管が閉鎖し、未熟な神経幹細胞が多く含まれる時期であり、ER が神経幹細胞において何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。そこで我々は、胎児神経幹細胞に ER が発現しているかどうかについて、mRNA レベル、蛋白質レベルで検討した。神経幹細胞は、マウス C57BL/6 胎生 14.5 日の終脳からニューロスフェア培養したものを用いた。ニューロスフェアは、神経系の細胞がシャーレ壁面に接着しない条件で bFGF および EGF を添加し分化を抑えつつ培養することで形成される凝集塊で、未分化な神経幹細胞を多く含むとされている。実際、形成されたニューロスフェアを神経幹細胞のマーカーである Nestin 蛋白質で染色し、陽性であることを確認している。ニューロスフェアを接着可能な条件で培養し分化させ、ニューロンのマーカーである MAP2、アストロサイトのマーカーである GFAP にて免疫染色し、培養したニューロスフェアからニューロン、アストロサイトが分化することを確認している。ER の蛋白質レベルでの発現検討は、ニューロスフェアに対し、抗 ER α 抗体で免疫染色することで検討した。ER α の発現は Phycoerythrin ラベル抗ラビット IgG にて検出した。その結果、nestin 陽性のニューロスフェアにおいて ER α の発現を確認した。次に、mRNA レベルでの発現を調べるために、ニューロスフェアから全 RNA を回収し、Nestin, MAP2, GFAP, ER α , ER β について TaqMan PCR を実施した。Fig 2 に示すように、Nestin, GFAP, ER α , ER β の発現が確認された。逆転写反応の際に逆転写酵素を加えないネガティブコントロール (RT(-)) では増幅が得られないことを確認している。MAP2 に関しては、ニューロスフェアにおいて発現していないためか、RT(+), RT(-)ともにほぼ変わらない低い増幅が得られた。以上より、神経幹細胞において、ER α が蛋白質レベル、mRNA レベルともに発現していること、ER β が mRNA レベルで発現していることを確認した。ER β の蛋白質レベルでの発現は現在検討中である。

(2) DES in utero 暴露影響検討

胎生初期のエストロジェン作用の攪乱が胎児神経幹細胞に対して影響を及ぼすか検討するために、妊娠11日目から15日目まで母体にDES 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与し、胎生15日目に胎児終脳を分離し、 10^6 個/6ml/10cm径シャーレの細胞密度で巻き込み、ニューロスフェア培養した。この細胞密度は、個々のニューロスフェアが単一の細胞に由来すると考えられる密度である。7日間の培養後、形成されたニューロスフェアの数をその直径毎に区別して数えた。その結果、in utero DES投与を受けた胎児由来のニューロスフェアは、Vehicle投与胎児由来のニューロスフェアに比べ、径の分布が小径側に移っていた。In uteroでDESに暴露されることにより、胎児終脳中の神経幹細胞の増殖に影響が生じた可能性が示唆される。また、ニューロスフェア培養する際にはDESは存在していないにも関わらず、In utero暴露のその形成に影響が生じたことより持続するような結果を得たことから、in utero暴露に伴い神経幹細胞に

不可逆的な遺伝子発現変化が生じている可能性があり、今後の検討を要する。

(3) DES in vitro 暴露影響検討

DES が神経幹細胞の機能に直接影響するか否かを検討するために、胎生 14.5 日目の終脳から神経上皮細胞 (nestin 陽性率 9 割以上の未分化な細胞) を培養増殖させ、以下の3条件、(1) bFGF を加え未分化状態を維持する、(2) bFGF を除き、主にニューロンに分化させる、(3) LIF, および BMP2 を加えることによりアストロサイトに分化させる、に対し、置いて DES を 10^{-14} ~ 10^{-8} M 共存させさらに2日間培養し、Nestin (神経幹細胞)、MAP2 (ニューロン)、GFAP (アストロサイト) の各マーカーについて免疫染色し、陽性率を算出した。その結果、DES は未分化状態の維持、ニューロン分化に対しては大きな影響を及ぼさなかったが、アストロサイトへの分化を促進する結果が得られた。すなわち、DES を加えない条件では GFAP の陽性率は約 60% であったが、DES を加えると陽性率は上昇した。 10^{-14} M の添加ですでに陽性率が上昇しており、一旦 10^{-12} M で陽性率は無添加の状態にまで低下した。 10^{-11} M 以上の濃度では加えた濃度に依存して陽性率が上昇した。 10^{-12} M でなぜ無添加の状態にまで陽性率が下降するかについてはさらに検討を要する。

(4) Genechip 解析

In utero DES 暴露による神経幹細胞への影響の検討結果は、DES により胎児神経幹細胞に不可逆的な影響が生じていることを示唆している。その影響の可能性、および影響のメカニズムを明らかにするために、網羅的な遺伝子発現解析を行った。用いたシステムはアフィメトリクス社の Genechip である。形成されたニューロスフェアから全 RNA を抽出し、アフィメトリクス社のプロトコールに従ってターゲット液とした。Chip は MGU74A version2 (既知遺伝子 6000, EST6000 が配置された chip) を用い、ハイブリダイゼーション、洗浄染色を経て、蛍光シグナルをスキャンし数値データをファイルとして得た。得たデータの解析は Genespring (シリコンジェネティクス社) を用いて行った。その結果、in utero DES 暴露により全体的に遺伝子発現が抑制されていた。発現が変動した遺伝子群の中から重要な機能を果たすと考えられる遺伝子を選択するために、神経幹細胞に特異的な発現を示す遺伝子で DES 暴露により逆の方向に増減を示した遺伝子を選択することとした。胎児終脳全体と形成されたニューロスフェアとの遺伝子発現を比較し、ニューロスフェアに特異的に発現している遺伝子群を調べ、終脳に対し2倍以上の発現差のある遺伝子を抽出した。ニューロスフェアと終脳では大きく遺伝子発現が異なっており、それらの遺伝子群について Fig.6 で得られた変動遺伝子のデータを見直し、DES により発現低下した遺伝子群 (ニューロスフェアで終脳全体より高い発現を示す)、DES により発現上昇した遺伝子群 (ニューロスフェアで終脳全体より低い発現を示す) をまとめた。発現低下した遺伝子群には、CycB1, Cdc25, CycA, Cdc2 など細胞周期を制御する遺伝子群が多いことが判明した。すなわち、遺伝子発現解析からは DES in utero 暴露により、細胞周期を制御する遺伝子群の発現が不可逆的に低下し、ニューロスフェア形成に影響している可能性が示唆される。発現上昇した遺伝子群には、Lysozyme M, Metalloelastase, PC6 などのプロテアーゼ群が多く含まれることが判明した。特に PC6 は BMP4 (アストロサイト分化を促進する増殖因子) を活性化する PACE4 と同源性の高い遺伝子であり、神経幹細胞分化、特にアストロサイトへの分化において役割を果たしていることが想定され注目される。

【核内レセプター】

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究(加藤茂明)

核内レセプターの転写共役因子は、最近になって複合体を形成することが明らかになっている。現在までに、ヒストンアセチル化酵素(HAT)活性を有し CBP-p300、p160 ファミリーを含む複合体と、HAT 活性を持たない DRIP/TRAP 複合体の2種が存在する。いずれの複合体も多くの核内レセプターに作用することから、核内レセプター共通の転写共役因子複合体と考えられる。

1. ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR を組織特異的に発現する系の構築に成功した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサにアンドロゲンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、この AR を介した転写促進能は、AR を強制発現させたいずれの組織においても観察されている。このハエのラインに、更に CBP 欠損変異体 (Nejire) のハエラインを掛け合わせたところ、蛍光は半減した。このことは、AR も ER α 、ER β 同様に CBP/p300 を必須な転写共役因子であることを証明するものであった。次に転写共役因子遺伝子を欠損したハエライン群とヒト AR を発現するハエを掛け合わせることで、当該転写共役因子のヒト AR に対する生体内機能を探った。その結果、DRIP/TRAP 複合体構成因子に変異のあるハエにおいては、ヒト AR の機能に著しい低下がみられたことから、この複合体が生体内で AR の機能に必須であることが分かった。

2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

昨年までの本研究課題において、ER 特異的な転写共役因子(p68、p72)の同定及び機能解析を行ってきた。更に既知転写共役因子複合体との相互作用を検索した結果、CBP-p300、p160 ファミリーを含む複合体と相互作用することを明らかにした(Watanabe et al., 2001)。しかしながら、この結果のみで ER の組織特異的機能は説明できない。そこで HeLa 細胞核抽出液より、新たな転写共役因子複合体の精製を試みた。その結果 TRRAP 及び GCN5 を含む複合体が ER にリガンド依存的に結合することが分かった。更にこの複合体は、ER のみならず AR や VDR などの他の核内レセプターにも作用することが判明し、第3のクラスの新たな転写共役因子複合体と考えている(Yanagisawa et al., submitted)。現在、この複合体の転写制御機能における役割を解析しているところである。

3. 新たな転写共役因子結合体同定の試み

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域(AF-2)をエストロゲン存在で下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の2つの転写共役因子複合体に加え、第3の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性を有することも確かめ、ま

たいくつかの構成成分も同定した。

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究(藤本成明)

C-1. ラット前立腺での ER mRNA 発現調節

C-1-1. Age dependent changes in ER α and ER β mRNA levels in rat prostate

ER α mRNA was the major type of ER expressed in the 2 week-old rat prostate. The expression decreased afterward and the ER β mRNA expression became apparent in 5 and 10 week-old rats.

C-1-2. Effects of castration and T administration on ER mRNA levels in the rat prostate gland at different ages

At ages 5 and 10 weeks old, the ER α mRNA levels were decreased by castration and recovered by T administration. However, the regulation of ER mRNA by T was not found in the dorsolateral part of the prostate gland at 5 weeks. The control ER α mRNA level was low and not regulated by castration or T. ER β mRNA in the prostate of 3 week-old rats, which was relatively high, seemed to be induced by T. ER β at this age decreased by DES treatment albeit the levels were low.

C-1-3. Time dependent changes in ER mRNA levels in the prostate gland after a T injection in 6 week old rats.

Changes in ER α and β mRNA levels in the ventral prostate in castrated rats after a 10 mg of the ventral prostate in castrated rats after a 10 mg of T injection was summarized. ER α mRNA in the prostate gland began to increase 3 hours after the injection and reached the maximum at 24 hours. The level of ER β mRNA was significantly decreased in 48 hours. The weight of the ventral prostate was unchanged for 48 hours. The serum T level marked a peak at 3 hours after the injection.

C-1-4. Numbers of specific estradiol binding sites in the prostate cytosol in normal and castrated rats.

The ER levels in the prostate gland by the competitive binding assay is shown. No specific estradiol binding sites were detected in the prostate cytosol in castrated animals, while significant amounts of binding sites were apparent in the control.

C-1-5. ER mRNA levels in rat prostate cell lines.

The amounts of ER α mRNA were higher than these of ER β in both AT3 and PLS10 cell lines. The levels were, however, not changed by T administration in either cell lines.

C-2. 5'-RACE

5'-RACE 法により正常前立腺組織由来の mRNA から得られたクローン F322 の塩基配列を明らかにした。構造遺伝子領域から上流-416 塩基までは、既に報告されている cDNA の配列と一致した。さらに上流-524 塩基までの 108bp が、今回新たに同定された配列である。卵巣、子宮からも F322 より短いクローンが得られたが、いずれもこの配列内に一致をみるものであった。

【ステロイド代謝】

ヒト成人及び胎児組織における steroid sulfatase 及び estrogen sulfotransferase の分布に関する研究
(笹野公伸)

定量 PCR 及び免疫組織化学の結果を表1にまとめた。

定量PCR (Real-Time PCR) : GAPDHで補正した全身組織のSTS mRNAの発現は、陽性対象として用いた胎盤組織での発現と比較し、成人の肝臓、精巣、甲状腺、肺及び大動脈で1-5%、胎児各組織で1-4%と成人及び胎児組織ともほとんどの組織で発現は認められなかった。一方、EST mRNAの発現は、陽性対象として用いた肝癌細胞での発現と比較し、成人各組織で10-104%、胎児各組織で20-210%と成人及び胎児組織ともほとんどの組織で発現が認められた。そのなかでも成人では副腎(104%)、大動脈(68%)、小腸(50%)、肝臓(40%)、腎臓(33%)及び肺(30%)での発現が高く、胎児でも同様の傾向が認められた。なお、成人の脾臓と膵臓での発現は認められなかった。発現が認められた例はいずれもアガロースゲル電気泳動にてPCRバンドが確認出来た(図1、STS: 296bp、EST: 117bp)。また、GAPDHはすべてのサンプルで発現が認められた(図1、307bp)。

免疫組織化学: STSにおける免疫組織化学では、胎盤合体細胞の細胞質に陽性像が認められた(図2)ほか、成人及び胎児組織ともに各組織共陰性であった。ESTでは陽性対象に用いた肝臓(肝細胞)の他に、成人では副腎皮質(束状層から網状層にかけて)、消化管(胃、小腸及び大腸)上皮細胞、腎尿細管(近位で著明)、精巣ライディッヒ細胞、大動脈中膜に明らかな陽性像が認められ(図2)、その他の各組織でも陽性所見が得られた。胎児でも成人の結果と同傾向であったが、腎臓では尿細管ではなく間質に陽性像が認められた。

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立(五十嵐勝秀)

スライドガラス型 cDNA マイクロアレイ技術の導入

(1) 検出感度の向上

小型実験動物を用いた in vivo 研究においては、マイクロアレイ解析を実施するに当たり、対象によっては極少量の材料しか得られず、マイクロアレイの標準的プロトコールが要求する RNA 量、あるいは、実際に目的とする遺伝子発現の解析の際に十分な強度のシグナルが得られないことがあり得る(これまでのプロトコールでは、全 RNA として 20 μ g 以上を要求される。全 RNA は、通常、臓器湿重量の 0.1-1 に当たることから、20mg の組織が必要であり、複数回測定するとすると、50-100mg の組織を用意することになる)。そこで、全 RNA の必要量を減らすために、tyramide を利用したシグナル増幅系を検討した。ここで用いた Tyramide システムは、蛍光ラベルされた tyramide 基質を酵素反応により切断し、反応場の極近傍のチロシン残基と共有結合させることを利用したシグナル増幅と、間接酵素抗体法による増幅とを組み合わせたものである。実際にこの Tyramide システムを検討した結果、図 5 に示すように、全 RNA 2 μ g にて十分なシグナルを得ることができることがわかり、現状でスライドガラス型マイクロアレイを実施するために必要な全 RNA の量は、最低 2 μ g で済むこととなった。

(2) ハイブリダイゼーションおよび洗浄の自動化検討

今後マイクロアレイ解析を幅広く実施していくためには、多くのサンプルを安定して解析することが必要となる。しかし、ハイブリダイゼーション、その後の洗浄操作を個々のスライドガラスについて一つ一つ手作業で行っていると、熟練を要する上に熟練者においても、ある程度のデータのばらつきが生じることが経験された。よって、このステップを自動化することにより、解析数が増加しても安定した結果を得られることが期待される。そこで、現時点で市販されている自動装置2種類(アマシャムバイオサイエンス社の Automated Slide Processor (ASP)およびジェノミックソリューションズ社の GeneTAC)について、販売代理店の協力を得て検討した。その結果、ASP ではシグナルは検出されるものの結果の再現性の点でさらにプロトコルの検討を要することがわかった。一方、GeneTAC では現存のプロトコルにおいて安定して十分な強度かつバックグラウンドの低いシグナルが得られた。よって、少なくとも GeneTAC を導入することにより、ハイブリダイゼーションおよびその後の洗浄のステップの自動化を即座に行うことが可能である見通しが得られた。今後必要となるスライドガラス型マイクロアレイ実験数によっては、本システムの導入を検討する必要があると考えられる。

(3) Genechip システムの導入

本システムを導入し、テスト実験を経、実際に当部で本システムを用いた遺伝子発現解析を実施可能であることを確認した。

(4) 遺伝子発現絶対比較のための spike RNA 法の検討

cDNA マイクロアレイを用いた解析法のみならず、異なる材料の間の遺伝子発現を比較する手法一般について、その発現変動の基準値として、ハウスキーピング(house-keeping)遺伝子と称される、どの組織でも発現している遺伝子のそれが用いられてきた。その際の前提は、化学物質を処理してもハウスキーピング遺伝子の発現は変動しないということであるが、様々な解析結果から、現実にはそれらの発現も処理によっては変動することが判明した。よって、ハウスキーピング遺伝子を基準として遺伝子発現比較を行うと、それは相対的な比較に留まることとなる。すなわち、個々の遺伝子発現が、細胞当たりどれだけ変動したかという絶対的な遺伝子発現比較をするためには、基準物質を新たに導入することが必要となる。その基準物質を、材料中に含まれる細胞数を反映する量だけ、正しく添加することにより、個々の遺伝子の発現変化を細胞当たりの変化として捉えることが可能となる。また、その基準は実験操作全般の状態を正確に反映することが理想であり、RNA 分子であることが求められる。

そこで我々は、基準となる RNA (以下では Spike RNA) を、組織を破壊する前に細胞数に対応する量を添加し、Spike RNA を基準に目的遺伝子の発現を比較する系を構築することを目指し検討した。具体的には、spike RNA として、ほ乳類の遺伝子とホモロジーの無い lamda phage の DNA を RNA 合成して用い、組織に含まれる細胞数を反映する数値として、組織重量を選んだ。Spike RNA による標準化が実際に機能するかを、重量をあらかじめ測定した一連の肝臓組織に、一定量の spike RNA を組織

破碎前に添加し、RNA 抽出後に spike RNA に対する定量 RT-PCR を実施し、元々の組織重量に逆相関する検量線が描けるかどうかで検討した。

まず、spike RNA を検出定量するための primer を設定し、その検出感度、特異的検出の有無を検討したところ、肝臓由来の RNA を添加しても spike RNA を添加しなければ増幅は得られないこと、spike RNA は全 RNA 1 μ g 当たり少なくとも 0.024ng 以上あれば十分に検出可能であることが判明した。この結果を受け、重量の異なる肝臓組織を準備し、各々重量を測定しつつ、一定量(10ng)の spike RNA を肝臓破碎前に加え、定量 RT-PCR を実施した。定量 RT-PCR で測定された spike RNA の量と組織材料の重量とはよい逆相関が得られ、組織材料の重量に応じて spike RNA を加えることにより、個々の遺伝子発現変化を組織重量当たりの変化として捉えることが可能であることが示された。以上より、今後各班員の材料をマイクロアレイ解析するに当たり、spike RNA を用い細胞当たりの遺伝子発現変化という視点から比較することが可能となった。なお、spike RNA としては *Bacillus* 由来の RNA 5 種をさらに導入する予定である。

(5) マウス脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析

発生期の脳は、極低用量の内分泌かく乱候補化学物質が影響を与えることが示唆されている標的臓器である。ほ乳類の脳性分化は雌型がデフォルトであり、雄胎児自身の精巣から分泌されるテストステロンが脳内でエストロジェンに変換され作用し、雄型脳が形成されると考えられている。よって、脳の性分化にはエストロジェンにより制御される一連の遺伝子発現カスケードが存在すると考えられ、内分泌かく乱候補化学物質によりそのカスケードがかく乱される可能性がある。そこで、本研究ではマウス材料に、脳性分化過程に関わる遺伝子群の同定およびそれら遺伝子群の内分泌かく乱候補化学物質による発現変化の検討を開始した。

本年度は、エストロジェン作用によって中枢神経系発生初期に発現制御される遺伝子群の同定を目的に、精巣からテストステロンが分泌される時期である胎生 17 日あたりの時期を検討対象とした。また、DES を内分泌かく乱のモデル化合物に選び、母体体重当たり 0.2 μ g/kg を投与しその影響を解析した。

マウス C57BL/6 妊娠 16 日目、17 日目、18 日目、出生直後の胎児もしくは新生児より、視床下部領域を分離し、Y 染色体特異的な遺伝子の有無を PCR 法にて検討し性別を特定した後に、全 RNA を分離精製した。得られた RNA を用い、Genechip MGU74A version2 (既知遺伝子 6,000、EST6,000、合計 12,000) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。性別毎に経時的に遺伝子発現変化を検討した結果を図 12 に示す。雌雄ともに胎生 16 日目を基準とし、変動比をプロットした。雌雄特異的な遺伝子発現変動パターンを示す遺伝子群を同定するために、クラスター解析を行い、発現経時変化の同様な遺伝子群を 20 グループに分類し、性毎に異なる経時的発現変化を示す遺伝子群を特定した。その結果、雄特異的な発現パターンを示すグループとして、set1, set5, set9, set16, set20 が、雌特異的な発現パターンを示すグループとして、set6, set12, set14 が選ばれた。実際に選ばれた遺伝子の経時的な発現パターンを雄、雌 1 例ずつ示す。

次に、DES を妊娠 16 日目、17 日目、18 日目に母体皮下に母体体重当たり 0.2 μ g/kg/day 投与し、出

生直後に胎児脳視床下部領域を取得し、網羅的遺伝子発現解析を行った。DES 処理していない出生直後の遺伝子発現解析結果と比較した scatter plot を示したが、DES 処理により多くの遺伝子発現が変動していることが判明した。一方で、DES 処理による遺伝子発現を雄と雌とで比較すると、出生後 1 日の時点では雌雄差はそれほど大きくないことが判明した。そこで雄で発現が上昇している遺伝子群、雌で発現が上昇している遺伝子群を選別し(発現差2倍以上)、それらの発生期における発現を調べた。結果を雄雌について整理した。雄で DES 処理に伴い発現が上昇した遺伝子は、発生期においても雄で発現が高い遺伝子か雌雄差の無い遺伝子であるのに対し、雌で上昇した遺伝子は、発生期に雄で発現が高い遺伝子が多いことが判明した。

以上、マウス脳性分化過程を研究対象に選び、本研究で導入した cDNA マイクロアレイシステムを利用して、性分化に関わる遺伝子群の同定およびそれら遺伝子群の内分泌かく乱化学物質による発現変化を検討し、雌雄で発現パターンの異なる遺伝子群の存在、DES 処理により、雌雄で応答の異なる遺伝子群を明らかとした。

D. 考 察

I. リスク調査研究

現時点では、ヒトに対する内分泌かく乱作用が確認された事例はない。低用量域のホルモン様作用の問題は、内分泌かく乱性を考察する上での中心的課題であるが、現時点で入手できる科学的知見からは、低用量域における内分泌かく乱作用を直ちに断定することには疑問がある。

II. 基盤研究

【生殖】

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響(井口泰泉)

ホルモン作用を有する内分泌かく乱化学物質が遺伝子発現に与える影響が必ずしもエストラジオールの影響とは一致しないということは、従来から考えられているホルモンレセプターを介した遺伝子発現調節とは別の作用が内分泌かく乱化学物質には存在することを示唆する。ホルモン感受性の臨界期を理解するためにも、臨界期前後での遺伝子発現を調べるのが有効であろう。さらに、臓器特異的なホルモン応答性の遺伝子の整理が必要である。

ビスフェノールの低用量影響は確認できたが、既報の結果とは異なる部分もあり、動物の系統差、実験手技の差が大きく影響することが考えられる。また、本研究結果から悪影響といえる結果は得られていないが、マクラランらが 1982 年に報告しているように、数回の妊娠出産を繰り返すことによって何らかの影響が現れる可能性は否定できない。

周期期の性ホルモンによるマウス生殖器官不可逆化に関連する遺伝子の検索を継続し、幾つかの特異的な遺伝子を見出したが、さらに探索を継続し、本質に関わる遺伝子を特定する必要がある。また、生殖器官の正常発生・発達に伴うホルモン受容体の発現をきちんと押さえておく等の、基礎的な

知見の集積が必要である。

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用および低用量影響に関する研究(鈴木勝士)

鶏胚のステージ10でも早期にER受容体との相互作用があると胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造の形成が起これると考えられるが、BPAについてはこのような作用は調べられた最も高用量の10.0 μgBPA/embryo 群でも認められなかった。その次に早い時期の胚で起これると考えられる体軸の分裂に関しては、5.0 μgBPA/embryo 以上の投与群でしか観察されなかった。神経管の閉鎖不全等の影響については調べた用量域で用量反応相関が認められた。体節数の減少などの影響についてはいずれの用量群でも影響は認められなかった。体軸の分裂については、明らかにその発生に閾値があると考えられる結果が得られた。このことは、胚盤葉下層の脱落については、より高用量のBPAを投与すれば発現する可能性があることを示唆している。しかし、BPAのより高濃度の水溶液を作成するのが物理的に困難であるので、確実には実証されてはいない。一方で、神経管の発生に対する影響は、0.313 μgBPA/embryo でも約20%の胚に発生した。また発生には明瞭な用量相関があるので、さらに低用量での実験をすることにより域用量が存在することが実証できる可能性がある。これらのことは、ERの活性化における時期特異的な影響がそれぞれ異なった表現型を生じること示唆している。今回の実験により、少なくとも神経管の形成が冒される経路での遺伝子発現について発生時期を変えて採材することにより、関与する遺伝子がとらえられる可能性が生じたと考えられる。今年度、ER以外のレセプターを介しての発生攪乱が期待されるレチノイン酸(RA)についても実験する予定であったが、BPAの用量を逐次下げていっても奇形が発生し、総体的な閾値が得られなかったため、RAについては実施できなかった。RAとうよによる表現型の変化がERを介する物と一致する部分があれば、ERとRARの共通する経路が見つかる可能性があるため、さらに実験する予定である。

【免疫】

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する影響(広川勝彦)

成熟胸腺リンパ球では低用量のEDCsの存在下ではレクチン刺激による増殖能が抑制され、用量の増加により死細胞が増加した。この事はEDCsによる胸腺リンパ球の細胞死へのシグナルがレクチン刺激による増殖へのシグナルより勝っていることが低用量でも生じているものと思われる。さらに、胎仔胸腺ストローマ細胞と未熟胸腺リンパ球を用いたHOS-FTOCの実験においても、未熟胸腺リンパ球の分化・増殖が低用量のEDCsにより抑制されていることが確認された。

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究(山崎聖美)

DTHは、細胞性免疫反応であり、抗原に暴露されたTヘルパー1(Th1)より産生されたIFN-γやケモカインがマクロファージを活性化する事によって引き起こされる炎症反応である。今回調べたNP、BPA、DEHP、DEP、DBP、BBP、DCHPのうち、DEPはDTHに変化がなく、DCHPはDTHを増加させ、その他の物質は減少させる、あるいはその傾向にあった。ヒト末梢血リンパ球をCon A刺激した際に放出さ

れる IFN- γ 量に、これら化学物質がどのような影響を及ぼすかについて昨年度報告したが、その結果では、DCHPとDEPは低濃度ではIFN- γ 産生量がコントロールと変わらず、高濃度では産生量が減少したのに対し、その他の化学物質では低濃度でIFN- γ 産生量が上昇し、高濃度で産生量が減少した。マウスの血液中の化学物質濃度、及び局所のIFN- γ は測定していないが、Th1から放出されるIFN- γ 産生量に変化が起きたために、DTHに影響があらわれたものと考えられる。

今後は、内分泌攪乱物質投与量を減らして低用量での影響をみるとともに、投与期間を短縮して影響について検討したい。また、NP、BPA、DEHP、DBP、BBP、DCHPは瞬時に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させたことから、これらの物質は、少なくとも一部はノンジェノミックな反応により細胞に影響を及ぼしているものと考えられる。今後は細胞内の他の分子についても影響について検討したい。

【神経】

核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析(垣塚 彰)

核内受容体の転写活性化能は、様々なコファクターにより制御を受けている。核内受容体の組織特異的な作用もコファクターによる制御の違いにより説明がつくと想定し、組織特異的に発現するコファクターの一つPGC-1 (PPAR γ coactivator-1)に注目して研究を進めた。PGC-1と類似のコファクターが存在することを予想し、ESTサーチでPGC-2を見出し、全長のcDNAをクローニングした。PGC-2は各種細胞株の脂肪分化過程で発現誘導がかかるが、コファクターとしての機能は有していなかったことから、PGC-2は蛋白性のリガンドであり、その発現の有無によって核内受容体の転写活性可能を制御するユニークな蛋白質であると結論した。この結果は核内受容体の転写活性可能の制御がエストロジェン等の低分子リガンドのみでなく、蛋白性のリガンドで制御されうる可能性を示唆するものである。今後内分泌攪乱化学物質の作用点として蛋白性リガンドへの作用も考慮すべきであると考えられる。

神経系初期発生におけるエストロジェンレセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析(菅野 純)

今回の検討結果より、ERが神経幹細胞で発現していること、発生期DES暴露は神経幹細胞の増殖分化に影響を与えること、DESは神経幹細胞からのアストロサイト分化を促進することが明らかとなった。また、網羅的な遺伝子発現解析により、in utero DES暴露に伴い、発現抑制される遺伝子の方が多く、細胞周期制御に関連する遺伝子が多いこと、誘導される遺伝子にはプロテアーゼ類が多いことがわかった。これらの結果から、ERは脳形成過程初期から機能していると考えられ、我々は以下のような可能性を考えている。(1)胎生初期から脳性分化の方向付けがERを介して開始されている。(2)胎生初期においては脳性分化は開始されておらず、その段階におけるERを介したシグナルは、中枢神経系の形成維持に関わっている。これらの可能性を踏まえ、今後内分泌攪乱化学物質の胎生期暴露が神経幹細胞に及ぼす影響の解析を進める必要がある。

また、DESをin utero投与すると、その後DES無添加条件下で培養しても、神経幹細胞内の遺伝子

発現に影響が生じていた。このことは、DES 暴露により神経幹細胞に不可逆的な遺伝子発現変化が生じている可能性を示唆するものである。不可逆的な遺伝子発現変化のメカニズムとして、DES 暴露により、ER を介し、神経幹細胞内の一群の遺伝子のプロモーター部位のメチル化が変化している可能性が考えられ、今後の検討を要する。

なお、神経幹細胞への影響を解析するに当たり、どうしても一旦神経幹細胞の培養操作を経る必要がある。胎児体内では実際には何らかのホメオスタシス維持機構あるいは発生プログラム監視機構が働いていることが考えられ、それらによる外来性刺激による影響の緩和が起こっている可能性がありうる。今回得られた低濃度での DES の神経幹細胞に対する影響は、そのような緩和機構が取り除かれた実験環境で増幅された可能性がやや強調されている可能性があると考えている。実際の intact な状態での暴露影響に関しては、遺伝子発現解析を含む手法を用いたさらなる検討が必要であると考えている。

【核内レセプター】

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究(加藤茂明)

今年度の解析により、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期待している。今後は、同定した転写共役因子群が核内レセプターを介した転写制御能において、内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する予定である。

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究(藤本成明)

D-1. ラット前立腺での ER mRNA 発現調節

Several investigations have indicated that ER α in the rat prostate is developmentally regulated probably by androgen. The present results clearly demonstrated that androgen regulated the expression of ER α mRNA as well as ER β in the rat prostate gland. More importantly, we showed that the significant amount of ER β mRNA was expressed in the prostate gland in neonatal rats when ER α expression was still low. That is, ER β would be a target receptor for estrogen and many other endocrine disrupting chemicals in the prostate gland at early stage of life.

It has been reported that ER β is localized in prostatic epithelial cells as opposed to stromal localization for ER α . At birth, low levels of ER β message were observed in the epithelial and mesenchymal cells. ER β levels decreases afterward as differentiation of mesenchymal cells. The increase in ER β begins around day 15 by elevations in testosterone. The maximal expression of ER β is observed at day 90 when adult testosterone levels are at their peak.

It is interesting to note that down-regulation of ER by androgen has been demonstrated clearly in humans and monkeys, but in rats there are evidences of an opposite effect since castration decreases ER expression in the prostate according to the early competitive binding studies. This might be explained by the opposite regulation of ER α and ER β expression by androgen since ER α mRNA is abundant in the rat prostate but at only a low level in the prostate gland in man.

D-2. 5'RACE 法

ER α については構造遺伝子上流にプロモーター領域が、複数存在し、このうちの一つのプロモーターから転写が開始されることが知られている。どのプロモーターが選択されるかは、臓器特異的に決定しており、活性化したプロモーター領域の3'端にあるエクソンが、スプライスされて、転写されることにより、プロモーターの種類に特異的な mRNA が合成されることが知られる。 β についても同様のプロモーター解析が待たれていたが、近年相次いで、ヒトとマウスにおける ER β の5'端の解析が報告され、特にヒトでは ER α と同様に異なる5'側エクソンを有する mRNA が2種類同定され、組織特異的に発現していることが認められ、ER β にも ER α と同様の多重プロモーターを用いた発現機構が存在する可能性が示唆された。しかし、今回我々は5'RACE法により、未知領域を含む cDNA を同定したが、基本的に単一分子種であり、これは単一プロモーターの可能性を示唆するものであった。

【ステロイド代謝】

ヒト成人及び胎児組織における steroid sulfatase 及び estrogen sulfotransferase の分布に関する研究 (笹野公伸)

今回の検討結果から、ヒト正常組織において STS mRNA はほとんど発現していないことが判明した。成人の肝臓、精巣、甲状腺、肺及び大動脈、胎児各組織で若干の発現が認められたが、成人のこれらの組織ではアロマトラーゼの発現が確認されており、テストステロンやアンドロステンジオンから E1 や E2 が生成される経路に加えて、量的には多くはないものの STS による E1 供給路が存在する事が考えられた。また、胎児組織でも同様の傾向が認められている。これらの組織における免疫組織化学では、mRNA の発現が認められた組織を含めて陽性対象以外に陽性像はみられなかったが、このことは STS の発現量が極めて少なく免疫組織化学の限界以下であった事を示唆している。

EST については STS とは逆に成人及び胎児ともにほとんどの組織において EST mRNA の発現が認められた。この事は、過剰のエストロゲンを EST によって不活する事により全身及び局所でのエストロゲン作用、動態を制御している可能性があるものと考えられる。特に EST の発現が高かった副腎では免疫組織化学において束状層から網状層に発現が認められている。EST には E1S の E1 化以外の別の作用がある。すなわちモルモットの EST(gpEST)は、E2 と結合活性を有し、さらにプレグネロンとのかなり高い親和性を持っており、E2 の gpEST との結合と競合するものの gpEST によってプレグネロンは硫酸抱合されず、E2 の硫酸抱合を制御しない。このプレグネロンへの gpEST の結合は、EST の pregnenolon-binding carrier protein として説明されている。副腎皮質においては E2 よりプレグネロンの量が圧倒的に多いことから、EST は副腎皮質においてはプレグネロンの代謝に一定の役割を担っているとも考えられる。

肝臓、腎臓及び腸管において EST はいずれも過剰のエストロゲンを親水性の高い硫酸抱合体に代謝して体外に排泄する排泄臓器としての作用に関与していると考えられる。さらに腎臓では E1S に関与する有機アニオン輸送(OAT)システムが発達しており、腎臓近位尿細管の基底側膜及び管腔側膜に

OAT ファミリーがそれぞれ存在することが知られている。この事はすなはち EIS を血中から尿細管細胞へ取り込む作用と、尿細管細胞から尿細管腔へ排出する作用を腎臓は有している事を示唆している。すなはち尿細管細胞においては、E1 を EST によって EIS へと不活化し、速やかに排出する機構が備わっているものと考えられる。今回の検討ではヒト胎児の腎臓において尿細管細胞ではなく周囲間質においてタンパクの発現を確認したが、これは E2 を E1 へ変換する 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 (17 β HSD2)の発現と一致している。すなわち胎児の尿細管は未発達なため、尿細管中の E1 や E2 が間質へリークすることが予想され、17 β HSD2 と EST によって過剰なエストロゲンの不活化を腎臓の間質では行っているものと考えられる。17 β HSD2 の発現は EST の発現が顕著であった消化管の上皮においても同様に観察されており、これらの組織では E2 \rightarrow E1 \rightarrow EIS の経路を経てエストロゲン作用の不活性化ならびに排泄に関係していると考えられる。

精巣、大動脈及び肺ではアロマトラーゼの発現も確認されており、精巣と大動脈については組織内の局在する細胞も一致している。このことはこれらの組織ではアロマトラーゼによる活性化エストロゲンの産生に対して EST が産生される活性型のエストロゲン量を調節する働きを担っているとも考えられる。実際にテストステロンの生合成は過剰なエストロゲンによって妨げられることも知られており、精巣における EST は過剰なエストロゲンの作用から精巣機能をいわば保護している事も考えられる。

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立(五十嵐勝秀)

本年度は、当班基盤研究への cDNA マイクロアレイ技術の導入および各班員の研究サポートを計画し、各班員が実施中の研究をサポートする体制を整えることを第一目的とした。あわせて、高次系解析の中心である脳神経系発生への影響解析に本技術を適用する目的で、マウス脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析とその内分泌かく乱候補化学物質による変動の解析を実施した。cDNA マイクロアレイ技術の導入に当たり、本技術の主流をなすと考えられる2つのプラットフォームである、Genechip システム(オリゴ DNA 基盤上合成型)およびスライドガラス型 cDNA マイクロアレイの導入に成功し、実際に各班員の研究をサポートする体制が整った。同時に、スライドガラス型マイクロアレイを実施する際に必要な全 RNA 量を減らすため、TSA 法を検討し、実際に全 RNA 必要量を 20 μ g から 2 μ g に低下させることができることを確認した。さらに、遺伝子発現比較解析の際に問題となる、比較基準の問題に対処するために、spike RNA を組織破砕前に添加する系を検討し、その系が機能することを確認した。

以上より、cDNA マイクロアレイ実験のサポート体制として、スライドガラス型マイクロアレイについては、用いるマイクロアレイ毎に若干の予備検討が必要ではあるものの、必要な全 RNA 量を減らしつつ実施することが可能であり、Genechip システムについては安定的に実施可能な体制を整えることができた。今後、各班員と相談の上、各班員の研究を網羅的遺伝子発現解析の面からサポートしていく。

E. 結論

I. リスク調査研究

US EPA では、内分泌かく乱性のスクリーニングに関してさしあたり 500 物質程度、2005 年を目途として終了する計画を出している。本作業班では、Ema ら(2001)による bisphenol A 低用量試験結果と、前記の独自の文献調査結果を踏まえて考察された bisphenol A 低用量反応によるリスクの評価(関澤ら、印刷中)などを進めてきた。今後、DES 陽性対照が再現性をもって陽性反応を示す試験系の確立とそのための背景データベースの構築や統計解析手法の検討、及びホメオスタシス反応の寄与を確認する遺伝子発現解析などを含む対応するメカニズムの研究を進め、前記の時期に照準を合わせて試験法の開発とそれに基づく試験目標を達成すべく、一刻も早くその実態を明らかにしたい。

II. 基盤研究

【生殖】

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響(井口泰泉)

DNA マイクロアレー法により、卵巣摘出マウス子宮におけるエストロゲン投与 6 時間後の遺伝子発現の変動について解析した。約一万遺伝子についての発現を調べたところ、およそ 5%の遺伝子がエストラジオールにより発現が誘導されることが明らかになった。ビスフェノール A、ノニルフェノールなどのエストロゲンの濃度に依存して、子宮で発現誘導あるいは発現抑制される遺伝子数が増加した。周生期のエストロゲン投与により不可逆化した膺ではセリンプロテアーゼが膺上皮に特異的に発現していること、新しいタイプのレクチンが DES 処理マウスの膺で高い発現を示すことが明らかとなった。

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用および低用量影響に関する研究(鈴木勝士)

BPA の初期発育鶏卵に対する ER を介しての発生攪乱について、(1)胚盤葉下層の脱落などステージ 10 でも早期の影響については BPA は $10 \mu\text{gBPA/embryo}$ の投与によっても認められなかった、(2)その次に早期の影響としての体軸の分離は $5 \mu\text{gBPA/embryo}$ 以上の用量で、低頻度で観察され、この影響には明瞭な閾値がある、(3)神経管の発生異常には明瞭な用量相関があり、 $0.313 \mu\text{gBPA/embryo}$ でも約 20%に発現し、この作用に対する閾値はさらに低いと考えられる、との結論が得られた。今後、他のシグナル伝達系路による発生攪乱との比較により、初期のボディプランに関わる遺伝子に対する化学物質の影響が理解されると考えられた。

【免疫】

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する影響(広川勝昱)

低用量の EDCs が *in vitro* における胸腺リンパ球のレクチンによる増殖、及び胸腺内における胸腺リンパ球の増殖・分化を抑制することが分かった。このことから、環境にある低用量の EDCs が生体内に取り込まれれば、胸腺を始めとする T 細胞系免疫系に影響を及ぼす可能性が十分にあることが示唆された。

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究(山崎聖美)

今回調べた NP、BPA、DEHP、DEP、DBP、BBP、DCHP のうち、DEP は DTH に変化を起こさず、DCHP は DTH を増加させ、その他の物質は減少させる、あるいはその傾向にあった。NP、BPA、DEHP、DBP、BBP、DCHP は細胞内カルシウムイオン濃度を一過性に上昇させたが、DEP は変化させなかった。

【神経】

核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析(垣塚 彰)

これまで PPAR γ のコファクターとして同定されていた PGC-1 (PPAR γ coactivator-1) の類似蛋白質 (PGC-2) を同定した。PGC-1 及び PGC-2 は、寒冷等の環境の変化で誘導される蛋白質で、核内受容体の蛋白質(プロテイン)リガンドとして働くことが明らかとなり、特に、これまで孤児受容体として分類されてきた複数の受容体様蛋白質がこれらの蛋白質リガンドで活性化を受けることが初めて示された。さらに、PGC-1 及び PGC-2 を発現させたトランスジェニックマウスの表現型のいくつかのものが、標的となる(孤児)受容体に想定されている機能高進として説明が可能であり、プロテインリガンドは、これまで知られていない新しい核内受容体の活性化機構として、生体内でも機能していることが示された。

神経系初期発生におけるエストロゲンレセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析(菅野 純)

神経幹細胞内で ER が発現していることは、脳発生初期に内分泌かく乱化学物質に暴露されることにより、ER シグナルのかく乱を介し、神経幹細胞機能に影響が生じる可能性を示唆するものである。その影響の可能性として、神経幹細胞の増殖能、アストロサイトへの分化制御のかく乱が考えられる。今後それらを踏まえつつ、神経幹細胞を対象とした研究をさらに進め、神経系発生において ER がいかなる機能制御を司っているかを受けているのかについて明らかにする必要がある。それにより、低用量内分泌かく乱化学物質の神経系への作用点を分子レベルで明確にすることが可能となる。

【核内レセプター】

性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究(加藤茂明)

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。性ステロイドホルモンは核内レセプターを介した標的遺伝子群の転写制御によりその作用を現す。今年度は、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにすることを目的とした。具体的には、男性、女性ホルモンレセプターの転写促進領域の同定、及びこれらレセプターの転写共役因子の同定を目指した。今後は、同定した転写共役因子群が核内レセプターを介した転写制御能において、内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する。

ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究(藤本成明)

本研究では、ER を介する内分泌かく乱化学物質の低用量影響をみる目的で、ER の発現調節とその機構を解析する。それは、1) 低用量内分泌かく乱化学物質の作用において、代表的なターゲットであるER の発現がいつどの様子に調節されているか理解しておく必要があること、および、2) 内分泌かく乱化学物質によりER発現自体が影響を受けることが指摘されているので、その低用量での作用を把握する必要があるからである。そこで研究の第一段階として、ラット前立腺 *in vivo* での調節様式を定量的に検討した。その結果、ER の mRNA 発現は、成長過程を通じて α 型から β 型へ動的に発現移行していることが明らかになった。さらに、 β 型発現は T 依存して調節されており、逆に α 型の発現は T により抑制的に調節されていることが明らかになった。それらの調節は比較的短時間でみられ、直接的な ER 転写調節が関与していることが示唆された。エストロゲン受容体発現調節は、一般に構造遺伝子上流にある複数のプロモーターによっているであろうことが示されてきた。ラットの ER Δ eta についても複数プロモーターとそれに依存的な複数エクソンを仮定して、cDNA の上流構造を 5'RACE 法で検索したが、結果的に単一種類の分子種のみが発現していることを見いだした。

【ステロイド代謝】

ヒト成人及び胎児組織における steroid sulfatase 及び estrogen sulfotransferase の分布に関する研究(笹野公伸)

以上のことから生体におけるエストロゲン代謝、作用を調整していると考えられている EST, STS であるが、STS は成人、胎児をとわずほとんどのヒト組織で発現しておらず、生体内では主に EST による E1 の不活化によりエストロゲンの作用、代謝、排泄などの制御が行われていることが示唆された。近年、内分泌かく乱物質の一つである Polychlorinated biphenyls (PCBs) のハイドロキシ化された PCB-OHs に強力な EST 阻害作用があることが報告されている。このことは EST によってエストロゲンの作用が調節されているほとんどの組織に対して PCBs が影響を及ぼすことが示唆される。しかし、エストロゲンの調節には様々な酵素が関与しているため、これらの酵素の組織分布や内分泌かく乱物質の影響については今後の検討が必要ではないかと考えられる。

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立(五十嵐勝秀)

本年度の研究により、cDNA マイクロアレイ解析技術を当班に導入し、班員の研究をサポートする体制を整えることに成功した。脳性分化発達に伴う網羅的な遺伝子発現変化の検討から、DES により性分化過程の初期の時期に発現変化する遺伝子群も判明し、低用量内分泌かく乱化学物質の脳神経系への影響を検討する基盤となりうる知見が得られた。

網羅的遺伝子発現解析技術は数万以上のマーカーを対象に内分泌かく乱化学物質の影響を、検討できる非常にパワフルな技術である。この技術はスクリーニングとして用いることも可能であるが、むしろ、そのメカニズムに立ち入って解析する際に本領をは発揮するものと期待される。本技術を各班員の研

究に適用することで、低用量で変動する遺伝子を特定し、その遺伝子の機能解析を通じ、低用量影響を解析する基盤となる重要な知見が得られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Yoon, B.I., Hirabayashi Y., Kaneko T., Kodama Y., Kanno J., Yodoi J., Kim D.Y. and Inoue T. (2001) Transgene expression of thioredoxin (trx/adf) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd)-induced hematotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol*, **41**, 232-6.
2. Yoon, B.I., Hirabayashi Y., Ogawa Y., Kanno J., Inoue T. and Kaneko T. (2001) Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. *Chemosphere*, **43**, 819-22.
3. Haraguchi, S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y. (2001) Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development. *Mech Dev*, **108**, 59-69.
4. Yoon, B.I., Hirabayashi Y., Kawasaki Y., Kodama Y., Kaneko T., Kim D.Y. and Inoue T. (2001) Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp Hematol*, **29**, 278-85.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I 文献調査班

平成13年度厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究

—特に低用量効果・複合効果・作用機構について—

“低用量問題に関する文献調査”

総括研究報告

主任研究者 関沢 純 国立医薬品食品衛生研究所・化学物質情報部

分担研究者

日本化学物質安全・情報センター	井藤 悦朗 課長
食品薬品安全センター秦野研究所	今井 清前 副所長
名古屋市立大学医学部	白井 智之 教授
日本獣医畜産大学獣医生理学教室	鈴木 勝士 教授
東海大学医学部	長村 義之 教授
大阪市立大学大学院医学研究科	福島 昭治 教授
東京農工大学農学部	三森 国敏 教授
国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター井上達センター長	
国立医薬品食品衛生研究所病理部	渋谷 淳 室長
国立医薬品食品衛生研究所総合評価室	長谷川隆一 室長
国立医薬品食品衛生研究所総合評価室	広瀬 明彦 室長
国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部	関澤 純 室長
国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部	中田 琴子 室長
国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部	江馬 眞 室長

研究要旨

低用量作用について報告していると考えられる重要な最新の関連文献の計64文献について(1)試験条件(動物を含む)の違い、(2)観察条件と観察内容の違い、(3)未解明のメカニズムによる影響の関与などについて精査し、データベースに整理した。用量—作用曲線パターン、閾値の有無、反応における逆U字現象の有無、反応における相加・相乗性の有無について問題点を抽出し、検討を加えた。さらにジエチルスチルベストロール(DES)を陽性対照として用いた試験について、実際に陽性結果が得られた場合及び得られなかった場合の試験条件及び結果について比較検討し、解析した。この結果を基にして、陽性対照であるDESについて再現性をもって陽性結果を得られる試験系を確立するため、試験に用いる動物種と系統、生殖・発生毒性試験にかかわる背景データについて、データベースを構築して、違いが生じたときの要因についての検討を支援し、ホメオスタシスを含む生理的な反応による効果を確かめ陽性反応を示す条件を確認するための試験研究を実施することを提案した。

ポリカーボネート(PC)樹脂およびポリスルホン(PS)樹脂などの原料であるビスフェノールA(BPA)が低用量で内分泌攪乱影響を及ぼす可能性が指摘されおり、前記樹脂が医療用具分野では歯科材料および血液透析器に使用されているので、血液透析器からのBPAの溶出状況とあわせて、BPAの内分泌攪乱影響について最近の知見を基にリスクベネフィットについて検討した。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質については従来の毒性試験で観察されてきた無毒性量よりも低い用量で見られる影響の報告があり、生理的作用と生体障害性の関連について議論を呼んできた。これらの報告を精査することをとおして、問題の解明に資するとともに低用量における問題解決のため今後必要な研究について提案することを目的とした。

B. 研究方法

2000年10月に米国環境保護庁が行った低用量問題に関する文献査読会議で使用した文献および、独自の文献検索により前記会議後に出版された文献のうち vom Saal らのグループによる5報告について、試験条件における問題点と、結果の解析における問題点に分けて検討した。後者については、用量-作用曲線パターン、閾値の有無、反応オシレーション(逆U字現象など)の有無、反応における相加・相乗性の有無を中心に検討を加えた。前記査読会議報告を参考のために翻訳した。

(倫理面への配慮)

特に必要なし。

C. 結果

以下分担報告のまとめを列記する。

- (1) 調査依頼のあった5編の文献について査読を行った。そのうち、Welshons W. V. らの総説では、estradiol (E2), bisphenol A (BPA), octylphenol (OP), diethylstilbesterol (DES), methoxychlor (MC), いずれも妊娠動物に投与すると低用量でF1動物の前立腺重量が増加すると報告しているが、総説であることから内容の妥当性を評価するためには、詳細な記述が不足していた。他の3論文は、いずれもエストロゲン様作用物質に対するF

344ラットとSDラットの反応性を比較した論文で、SDラットに比較するとF344ラットのほうがより低用量で反応することを明らかにした論文であるが、いずれも卵巣摘出という特異的な条件下で行われた実験であり、使用した動物数が少ないことなど低用量問題を評価するためには不十分な実験と判断された。他の1つの論文は、新生児期にBPA, OP, DESを投与して血中プロラクチン濃度、視床下部、下垂体前葉、子宮、前立腺のエストロゲン受容体の発現を比較して、各エストロゲン様作用物質の作用機序が異なるのではないかと推論しているが、1群の動物数が少ないこと、測定値の変動幅が大きいことなどから、結論を導くためには更なる実験の追加が必要であると思われた。

- (2) 内分泌かく乱物質の濃度とそのホルモン活性作用は、S字曲線で示されると考えられていたが、感受性限界濃度以下においても生体に対する影響が観察され、U字曲線を描くと言う報告も存在し、いまだ意見の一致を見ない。これらの問題を解決すべく様々な *in vivo* 試験法の開発が試みられているが、飼料に含まれる植物由来のエストロゲン様物質や実験動物の遺伝的な背景などが試験に影響を与える因子を熟慮し、実験系をデザインする必要がある。
- (3) 文献検索などの結果により、低容量問題は、内分泌かく乱化学物質の関与の可能性があると思われる精子の質的・量的低下、免疫系への影響、子宮内膜症などの諸問題のそれぞれに関わっていると考えられた。その際に、前立腺肥大または子宮の発育加速が前立腺または子宮/卵巣がんのような臨床上の病的状態と関連しているか否かを確定する実験的モデルがデザインされる必要がある。
- (4) 内分泌攪乱物質による低用量暴露問題について、文献による発がん・一般毒性についての低用量影響に関する調査を行った。担当分の実験報告から、調査問題に関して肯定的な知見を得ることは出来なかった。一方、低用量影響に関しては、同一種においても系統に