

別添 2

厚生科学研究研究費補助金

化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究
(H13-生活-012)

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 清

平成 14 (2002) 年 4 月

目 次

1. 総括研究報告書	
化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究	1
今井 清	
II. 分担研究報告書	
(1) <プレスクリーニング系追加開発>	
1. 酵母Two-Hybrid試験の改良とバリデーション—特に複合効果の検討—	22
西原 力	
2. 子宮等への影響をおよぼす遺伝子の解析	25
井上 達	
(2) <スクリーニング試験系確立研究>	
3. ES細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響	31
高木 篤也	
4. 子宮肥大試験およびHershberger試験における遺伝子発現変化に関する研究	34
永井 賢司	
5. 卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究	37
松島 裕子	
6. 内分泌かく乱化学物質の胎生期暴露による包皮分離試験に関する研究	44
吉村 慎介	
7. 内分泌かく乱化学物質の新生時期暴露による包皮分離試験に関する研究	47
吉村慎介	
8. 28日間試験の改良- $\alpha_{2\mu}$ グロブリン評価の利用について—	51
武吉 正博	
(3) <OECD対抗等試験開発部門>	
9. 臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析	57
高木 篤也	
10. 子宮肥大および Hershberger 試験	64
今井 清	
11. OECDガイドライン407：28日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究	67
広瀬 雅雄	
12. 内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究	72
金子 豊蔵	
(4) <確定試験等開発研究>	
13. 内分泌かく乱化学物質の肝臓構築過程に及ぼす影響に関する研究	

一経世代試験の改良	74
長尾 哲二	
14. (その1) ラットの胎児期子宮内位置と生後の発育・分化との関連に関する研究	78
(その2) 内分泌かく乱物質の神経系構築過程に及ぼす影響に関する研究	84
長尾 哲二	
15. 内分泌かく乱化学物質の発がんプロモーション作用の検討	87
白井 智之	
16. 内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究	101
広瀬 雅雄	
17. 内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんに及ぼす影響の検討	109
長村 義之	
18. 内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器官に与える影響に関する研究	111
吉田 緑	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	114
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

I. 総括研究報告書

化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究

主任研究者 今井 清 （財）食品薬品安全センター秦野研究所 特別参事

研究要旨： 内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究は、当申請者らの過去 3 年間の研究によって、基本的なスクリーニング法の開発を終了し、「少数の個体レベルスクリーニング系の確立」および「内分泌かく乱性を確認するための試験法の考案」が重要課題となってきた。したがって、本研究は、これらに対応する試験系の開発を推進することを目的とするものであり、1) 個体レベルスクリーニング系の課題として子宮肥大試験、Hershberger 試験を実用化する上での問題点の解決、包皮分離などを指標とした新たなスクリーニング系の確立、2) 確定試験として、胎生期、新生児期の高感受性時期に焦点を当てた新たな試験法の考案と経世代試験法の改良、複合効果や遅発性影響の検討を主な課題とした。

研究初年度にあたる本年度は、ラットと平行して OECD ガイドライン化が進んでいるマウスを用いた子宮肥大試験の実施上の問題点を検討し、幼若動物を用いる際、ラットに比較してマウスは性成熟が早く現れるため、被験物質の投与期間が限られることを明らかにした。さらに、遺伝子発現、包皮分離、など新たな指標を最終スクリーニング試験系あるいは確定のための試験系に組み込むことが可能か否かを検討するための基礎的な研究を行い、興味ある成績を得た。また、新生時期の初期段階でエストロゲン作用を受けた雌動物が、性成熟に達した段階で、生殖機能に障害が発現し、さらに子宮の化学発がんに対する感受性が亢進することが確認され、(遅延性影響)、胎生期、新生時期あるいは経世代試験の試験法の開発に新たな問題点が浮上してきた。

分担研究者氏名・所属施設名および所属施設における 役職名

菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 室長

西原 力

大阪大学大学院薬学研究科環境生化学（微生物動態学分野） 教授

井上 達

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 センター長

高木 篤也

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 主任研究官

永井 賢司

（株）三菱化学安全科学研究所鹿児島研究所 グループリーダー

松島 裕子

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 主任研究官

吉村 愼介

（財）食品薬品安全センター秦野研究所病理学研究室 室長

武吉 正博

（財）化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 課長

広瀬 雅雄

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病理部 部長

金子 豊蔵

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 室長

長尾 哲二

（財）食品薬品安全センター秦野研究所生殖生物学研究室 室長

白井 智之

名古屋市立大学医学部第一病理学教室 教授

長村 義之

東海大医学部内分泌病理乳腺細胞診 副医学部長、教授

吉田 緑

(財) 佐々木研究所 病理部 研究員

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究は、当申請者らの過去 3 年間の研究によって、基本的なスクリーニング法の開発を終了し、「少数の個体レベルスクリーニング系の確立」および「内分泌かく乱性を確認するための試験法の考案」が重要課題となってきた。従って、本研究は、これらに対応する試験系の開発を推進することを目的とするものであり、1) 個体レベルスクリーニング系の課題として子宮肥大試験、Hershberger 試験を実用化する上での問題点の解決、包皮分離などを指標とした新たなスクリーニング系の確立、2) 確定試験として、胎生期、新生児期の高感受性時期に焦点を当てた新たな試験法の考案と経世代試験法の改良、複合効果や遅発性影響の検討を主な課題とした。その詳細は以下の通りである。

(1) 〈プレスクリーニング系追加開発〉

- ・ 酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーション - 特に複合効果の検討- (西原 力)

酵母 Two-Hybrid 試験を基に、代謝活性化物質やアンタゴニストの検出系の開発と、食品や環境試料などの混合物についての総合評価手法の確立を目的とした。

- ・ 子宮等への影響をおよぼす遺伝子の解析 (井上達)

本研究では、cDNA マイクロアレイ実験プラットフォームに用いられる 2 種のシステム、即ち Genechip システムとガラスアレイシステムによるデータの比較と、網羅的遺伝子発現解析を実施するに当たり、ほ乳類の遺伝子と相同性の無いファージ、バクテリア由来の遺伝子の RNA 用いた spike RNA 法による標準化を目的とした。

(2) 〈スクリーニング試験系確立研究〉

- ・ ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響 (高木篤也)

内分泌攪乱化学物質を含む種々の化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として ES 細胞が有用であると思われることから、ES 細胞培養系を用いて DES の初期発生過程への影響を調べるた

め、DES の EB における遺伝子発現への影響を検索することを目的とした。

- ・ 子宮肥大試験および Hershberger 試験における遺伝子発現変化に関する研究 (永井賢司)

子宮肥大試験および Hershberger assay における標的臓器での遺伝子発現の変化を代表的なエストロゲンあるいは (抗) アンドロゲン様作用物質を用いて比較検討することにより、その作用メカニズムを明らかにし、特徴的な遺伝子について、確定試験と目される試験 (二世代繁殖試験等) における発現の変化と対応させることにより、スクリーニング試験と確定試験とをリンクさせていくことを目的とした。

- ・ 卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究 (松島裕子)

内部標準としてマウス遺伝子とホロモジーの無い λ phage の配列を spike RNA として用いることにより、 E_2 投与による子宮の housekeeping gene の経時的変動をリアルタイム RT-PCR により検討する。更に、子宮肥大に関連する標的遺伝子のうち、 $ER\alpha$ および VEGF の経時的発現を定量 PCR で検討し、その絶対的変動パターンを評価することを目的とした。

- ・ 内分泌かく乱化学物質の胎生期及び新生時期暴露による包皮分離試験に関する研究 (吉村慎介)

本研究では雄動物を対象に、内分泌かく乱化学物質の投与時期、投与期間と雄ラットの性成熟時期を含む雄性生殖器および副生殖器のその後の分化、発達への影響との関係を明らかにし、ならびにこれらの影響を検出するためのスクリーニング試験を確立することを目的とした。

- ・ 28 日間試験の改良- α_{2u} グロブリン評価の利用について- (武吉正博)

内分泌攪乱作用の検出を目的とした改良 28 日間反復投与毒性試験における α_{2u} グロブリンの測定意義を明白にすることを目的とした。

(3) 〈OECD 対応等試験開発部門〉

- ・ 臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析 (高木篤也)

内分泌かく乱化学物質の全身に対する生体作用

を遺伝子発現の変動として捉える場合に、各臓器における遺伝子発現変動の基礎データが必要である。そこで本研究では、子宮、視床下部等の性ホルモンに応答する臓器において、性ホルモン依存的に発現変動する遺伝子群を網羅的に拾い出し、性ホルモン応答において必須の役割を果たす遺伝子群をその配列情報及び応答時の発現パターン等の検討により選別し、それら遺伝子群を用い、化合物のホルモンかく乱作用をとりこぼしなく解析するハイスループット検出系を構築することを目的とした。

- ・ 子宮肥大および Hershberger 試験 (今井 清)

化学物質のエストロゲン様作用やアンドロゲン様作用を *in vivo* で検出するために OECD ガイドライン化が予定されているマウスを用いた子宮重量試験とラットを用いたハーシュバーガー試験の問題点を明らかにし、ガイドライン制定に資することを目的とした。

- ・ OECD ガイドライン 407 : 28 日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究 (広瀬雅雄)

‘OECD テストガイドライン 407, enhanced’ において、内分泌かく乱作用を高感度に検出する新規パラメータの導入を計るための研究として、Genome wide にスクリーニングを行うこととして、肝臓を標的とした各種 RNA 分子の網羅的発現解析を行った。

- ・ 内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究 (金子豊蔵)

本研究を通して開発された新しい技術の移転・普及を図る目的で、酵母にヒト性ステロイドホルモン受容体遺伝子、性ステロイドホルモン反応領域遺伝子およびレポーター遺伝子 (β -Galactosidase) を導入したツーハイブリッド法ビデオ作製を行った。

(4) 《確定試験等開発研究》

- ・ 内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究-経世代試験の改良- (長尾哲二)

内分泌かく乱化学物質の胎児期暴露による生殖巣原基における傷害と、生後の生殖器官の発達ならびに生殖機能の障害について検討し、性腺構築過程における傷害性の有無が内分泌かく乱化学物質の次世

代生殖影響を早期かつ短期に検出できる指標となり得るかを検討した。

- ・ 胎児の子宮内位置と生後の発育・分化との関連に関する研究 (長尾哲二)

マウスあるいはラットなどの胎児の子宮内での位置 (例: 子宮内で両側が雄胎児である雄あるいは両側が雌胎児である雌) が、子宮内での両側胎児から分泌される性ホルモンの影響により生後の性成熟の時期、行動・機能などに差が生じるか否かを明らかにすることを目的とした。

- ・ 内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究 (長尾哲二)

胎生期あるいは新生児期の内分泌かく乱化学物質暴露後のラット視床下部に位置する性的二型核 SDN-POA や前腹側脳室周囲核 AVP/N-POA をはじめとする神経核の形成に及ぼす影響を細胞生物学的に検索し、その変化が後の生殖影響と如何に関連しているかを考察することを目的とした。

- ・ 内分泌かく乱化学物質の発がんプロモーション作用の検討 (白井智之)

肝中期発がん性試験法は被験物質のプロモーション作用の用量相関性を検討するのに適していることや、少ない量の被験物質でも検索が可能であり、低用量でも評価が可能であるなど、内分泌かく乱化学物質の発がん性や発がんプロモーション作用を検索するのにこの試験法は適していると考えられることから、内分泌かく乱作用に起因した発がん性検出系として有用であるか否かを検討することを目的とした。

- ・ 内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究 (広瀬雅雄)

内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を鋭敏に検索する試験系はまだ確立されておらず、早急にその試験系の確立が望まれている。本研究では、発癌イニシエーターと抗甲状腺剤の最適な組み合わせを選び、化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出するためのモデルの確立を目的とした。

- ・ 内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんに関する影

響の検討 (長村義之)

内分泌かく乱物質は、多くの物質がエストロゲン作用を有することが広く知られてきている。1) エストロゲンが単独で乳癌誘発作用があるか、2) またエストロゲンが DMBA による乳癌発癌の促進作用を有するか否か、3) その際の乳腺におけるエストロゲンレセプター (ER) の動態などを明らかにすることにより、乳腺発癌への化学物質の修飾作用を評価するための試験法開発の基礎資料を得ることを目的とした。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究 (吉田 緑)

内分泌かく乱物質問題の中で胎児期および新生児期暴露による影響は、男性あるいは女性ホルモンの胎児期および新生児期暴露が生殖器系の発育・分化へ不可逆かつ重篤な変化をもたらすことから、最も懸念されているものの一つである。従って、本研究では、生殖器系への影響が懸念されている内分泌かく乱化学物質を高用量から環境中に存在する低用量まで胎仔期あるいは新生仔期ラットに曝露することによって、雌性生殖器への影響を検出する有効な指標を検討するとともに子宮発癌への修飾作用について検討し、試験法開発のための基礎資料を得ることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 〈プレスクリーニング系追加開発〉

・酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーション - 特に複合効果の検討-

S9Mix 前処理条件 (30°C、4時間) を確立し、スチレンダイマーやトリマー、ビフェニル化合物等を S9Mix で前処理し、酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) でエストロゲン様活性を測定した。陽性物質については代謝物の同定も試みた。

ER-TIF2 系において 17 β -Estradiol (E2) 共存下に約 60 種の化学物質についてエストロゲン様活性を酵母 Two-Hybrid 試験で測定することにより、アンタゴニスト活性物質を検索した。なお、本試験において系への影響を評価するためにコントロール系 (p53 系)

を用いた。陽性物質については、ER 結合性試験および培養細胞レポーター遺伝子試験により確認した。

・子宮等への影響をおよぼす遺伝子の解析

マウス組織からの RNA の分離精製

マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが 5mm 以下となるように細切した。その後、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存し、RNAlater を除いた後、ISOGEN (日本ジーン社) を用いて全 RNA を抽出した。得た全 RNA は、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製し、1 μ g を電気泳動し分解の有無を検討した。

スライドガラス型マイクロアレイ解析

スライドガラス型マイクロアレイとしては、主にクロンテック社から市販されている Glassarray (Mouse Glassarray 1.0 : 1081 遺伝子/アレイ、全長 cDNA) を用いた。ターゲット液の調製は、(1) 蛍光物質 (Cy3、Cy5) を直接 cDNA 合成時に取り込ませる方法および、(2) cDNA にはビオチンもしくは Fluorescein を取り込ませ、ハイブリダイゼーション後に抗体を用いて Cy3、Cy5 を付加して検出する方法 (Tyramide signal amplification 法) の 2 種類を検討した。(1) の方法にはクロンテック社の Glassarray fluorescein labeling kit を用い、添付のプロトコールに従った。(2) の方法には NEN 社の TSA kit を用い、添付のプロトコールに従った。

Spike RNA ; Spike RNA として、マウス遺伝子と相同性の無い Lambda phage DNA (Bacteriophage lambda B capsid component)、Bacillus DNA (DAP、PHE、THR、TRP、LYS) の計 6 種類の遺伝子を spike RNA に用いた。Lambda phage DNA 断片は plasmid vector pBluescriptII を鋳型に PCR にて増幅し、増幅断片に poly A 配列 (16 ヶの A) および T7 promoter 配列を 3' 側に付加し、同 plasmid vector に組み込んだ。Bacillus DNA は ATCC より pBluescript II に T3 promoter 下流に組み込まれたベクターを購入し用いた。Ambion 社の T7 もしくは T3 in vitro transcription kit を用い、添付のプロトコールに従い、RNA を合成後、poly A+RNA を oligo dT を付加した磁性体を利用して

精製し、RNA 量を測定し、spike RNA として用いた。また、Spike RNA の検出・定量のための定量 RT-PCR 用のプライマーは ABI 社の PrimerExpress を用いて lambda phage について設計した。

Genechip 解析；マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)に浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作まで-80°Cにて保存した。RNAlater を除いた後、ISOGEN (日本ジーン社)を用い、全 RNA を抽出し、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 µg を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社キット)を用い、ピオチン化 CTP を取り込み、ピオチンラベルされた cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip はマウス MGU74A_{v2} を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°Cにて 16 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

Estradiol in vivo 暴露；17-β-estradiol はコーンオイルに溶解し、卵巣摘出術後 2 週間経過した後、体重 1kg 当たり 1 µg を皮下投与した。溶媒対象にはコーンオイルを用いた。

(2) (スクリーニング試験系確立研究)

・ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響

ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIF を除いた ES 培地で、浮遊培養した。DES はエタノールに溶解して、最終濃度 1nM で添加した。対照群にはエタノールを 0.1%の最終濃度で添加した。まず第一に EB におけるエストロジェン受容体並びに ERR の発現を RT-PCR で調べた。また、DES 添加、4 日後の浮遊培養により形成された胚嚢体より RNA を抽出後、c-DNA マイクロアレイを用いて影響を受

ける遺伝子を調べた。

・子宮肥大試験および Herslberger 試験における遺伝子発現変化に関する研究

基本的な実験系の確認を行うため、エストロジェン様活性物質として ethinylestradiol (EE 1 µg/kg/day) および genistein (GEN 100 mg/kg/day)、抗エストロジェン様活性物質として ICI-182, 780 (ICI 1 mg/kg/day) を幼若雌性ラット (6 匹/群) に 3 日間反復経口投与した。最終投与後 24 時間に解剖し、子宮および卵巣の重量を測定後、凍結保存した。これらの臓器から RNA を抽出し、ERα、ERβ および AR 遺伝子の発現量変化について、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System を用い、real-time RT-PCR 法により評価した。

・卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究

1) 動物の処置および子宮採取；動物は、6 週齢の雌性 C57BL/6CrSlc マウス (日本エスエルシー) を購入し、1 週間の馴化期間後、卵巣摘出手術を行った。術後 2 週間目に E₂ (溶媒 corn oil) を 1 µg/kg 単回皮下投与した。投与後、0 (無処置)、30min、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、12 時間および 24 時間毎に無処置群は 8 匹、E₂ 投与群は 3 匹ずつ頸椎脱臼により屠殺し、速やかに子宮を取り出し、子宮重量 (wet) と内腔液を取り除いた (blotted) 重量を測定し、4°C の RNAlater 中で 1 ヶ月間保存した。

2) λ phage の作製；Kit 添付のシークエンス不明の Bacteriophage λ RNA は、T7 プロモーターを付加した oligo dT プライマーにて逆転写し、一本鎖 cDNA とした後、二本鎖 cDNA に変換後、EcoRI、BamHI 部位にてプラスミドベクター(pBluescript II SK)に挿入し、in vitro 転写反応の鋳型ベクターとした。Bacteriophage λ 由来の塩基配列は蛍光 DNA シークエンスにより確定した。得られた鋳型ベクターは XbaI で切断し直鎖化した後、T7RNA polymerase による in vitro 転写反応により RNA を合成した。

3) 全 RNA の分離・精製および cDNA の合成；ホモジナイズ用 Buffer RLT に β-mercaptoethanol、子宮および λ phage (子宮 10mg に対し 100ng) を入れ、ミキ

サーミルでホモジナイズした。その後、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて全 RNA を分離・精製した。

全 RNA の最終濃度が 50ng/ μ l となるように調製し、PERKIN ELMER の Gene Amp RNA PCR Kit をもちいて cDNA を合成した。

4) 定量 PCR ; 定量 PCR 25 μ l の系に上記の cDNA を 1 μ l 入れ ABI PRISM7700 Sequence Detection System を用いて SYBR Green 蛍光色素で PCR 産物の増幅曲線をリアルタイムで検出した。標的分子の発現量に対して内部標準として添加した λ phage の値で補正をかけた。Housekeeping gene として β -actin および GAPDH、子宮における E_2 標的遺伝子として ER α および VEGF を測定した。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期暴露による包皮分離試験に関する研究

11 週齢で購入した雌雄ラットを交配し、各群 3 腹、計 6 群を設定した。交尾確認日を妊娠 0 日とし、第 1~3 群は投与期間を妊娠 14~17 日、第 4~6 群は投与期間を妊娠 18~21 日とした。オリーブ油に溶解したフルタミドを、第 2 および 5 群は 10 mg/kg、第 3 および 6 群には 100 mg/kg の用量で強制経口投与した。第 1 および 4 群は溶媒対照群としてオリーブ油を投与した。生後 6 日に出生児の肛門生殖突起間距離を測定した後、各腹より 4 匹の雄出生児を残し、雌は廃棄して他の雄は解剖後ホルマリンで固定し、保存した。生後 35 日から 55 日まで包皮分離時期を観察した後、生後 56 日に屠殺して剖検後、生殖器および副生殖器の重量を測定した。

・内分泌かく乱化学物質の新生時期暴露による包皮分離試験に関する研究

28 日齢で購入した雄ラットを、各群 10 匹、3 群に分けた。オリーブ油に溶解したフルタミドを、第 2 群には 1 mg/kg、第 3 群には 10 mg/kg の用量で、生後 35 日から 39 日まで強制経口投与した。第 1 群は溶媒対照群としてオリーブ油を投与した。生後 35 日から 55 日まで包皮分離時期を観察した後、生後 56 日に半数の各群 5 匹を屠殺して剖検後、生殖器および副生殖器の重量を測定した。残りの各群 5 匹は飼育を継続し、13 週齢で屠殺し、剖検後、器官重量測

定を実施する予定である。

・28 日間試験の改良- α_{2I} グロブリン評価の利用について-

DES を 0.01-1 mg/kg の用量で 14 日間反復経口投与し、肝臓における AUG mRNA の変動を RT-PCR で観察した。DES 投与により肝 AUG mRNA の現象がみられた個体と変動のみられなかった個体から得られた肝 total RNA を Template として蛍光標識 probe (Cy3、Cy5) を作製し TAKARA 社製 InteliGene Rat Toxicology chip Ver.1.0 を用いて網羅的に遺伝子の変動を観察した。

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

・臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析

マウス組織からの RNA の分離精製

マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが 5mm 以下となるように細切した。その後、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存し、RNAlater を除いた後、ISOGEN (日本ジーン社) を用いて全 RNA を抽出した。得た全 RNA は、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製し、1 μ g を電気泳動し分解の有無を検討した。

Genechip 解析 ; マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存した。RNAlater を除いた後、ISOGEN (日本ジーン社) を用い、全 RNA を抽出し、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 μ g を T7 プロモーターの付加したオリゴdT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社キット) を用い、ピオチン化 CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip にはマウス MGU74Av2 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16 時間行い、バッファーによる洗浄後、

phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

Estradiol in vivo 暴露；17- β -estradiol はコーンオイルに溶解し、卵巣摘出術後2週間経過した後、体重1kg当たり1 μ g を皮下投与した。4時間後に各臓器を採取した。溶媒対象にはコーンオイルを用いた。

・子宮肥大およびHershberger試験

試験は、幼若マウスを用いた3日間反復経口投与と、幼若マウスを用いた3日間反復皮下投与の2種類を実施した。動物は、ICR系雌マウスを使用し、幼若マウスへの投与は、19日齢から開始した。投与量は、経口投与は0.3~150 μ g/kg/day、皮下投与は0.1~50 μ g/kg/dayとした。対照群として、媒体のコーン油を投与した。最終投与24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、腔開口を観察した後、卵巣、子宮および腔を摘出した。まず、卵巣と腔を切除した後、子宮重量(Wet weight)を測定した。その後、子宮壁の一部を切開して子宮内液を除去し、再度、子宮重量(Blotted weight)を測定した。

・OECDガイドライン407:28日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

7週齢の雄性SD:IGSラット各群5匹に、ethinylestradiolを0.5、5、50 mg/kg、雌ラットにtestosterone propionateを1、10、100 mg/kgをそれぞれ2週間にわたり連日強制経口投与し、翌日の解剖時に凍結保存した肝組織からtotal RNAを抽出し、CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 Arraysによる網羅的な遺伝子発現の検索を行った。現在、得られた発現情報から遺伝子プロファイルの解析を進行中である。

・内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究

エストロゲン受容体を導入した酵母を至適条件下で培養し、化学物質を反応させたのちに、酵母壁を溶解させ、レポーター遺伝子に由来する酵素活性を測定する。ハイスループト性を高めるために96穴プレートを用いたプロトコルを用いる。レポーター遺伝子には、酵母に内在しない β -ガラクトシダーゼ

を用い、測定にマイクロプレートリーダーを用いて通常の酵素活性と同様な操作により測定する。これらの一連の試験操作およびツーハイブリッド法の試験操作についてのビデオ撮影を株式会社シネホーカスに依頼し、現在、シナリオを作成し、一連の撮影準備を行った。

ナレーションは英語で挿入し、東南アジアを中心とした外国での普及を目指し、PALコピー版も用意する予定である。

(4) 〈確定試験等開発研究〉

・内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究-経世代試験の改良-

ICRマウスの妊娠10-13日(陰栓発見日=妊娠0日)に、ジエチルスチルベストロール(DES)の100 μ g/kg/dayを連日背部皮下に注射し、最終投与の24時間後に開腹して子宮より胎児を摘出した。雄胎児の生殖巣を実体顕微鏡下で取り出し、パラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド混合固定液で固定し、樹脂包埋後、光顕ならびに電顕観察を行った。さらに生殖巣におけるHSP70あるいはbcl2発現を免疫組織学的に予備的に検討した。

・胎児の子宮内位置と生後の発育・分化との関連に関する研究

ICR雌マウスの交配前1週間、交配期間を通じて交尾確認後妊娠17日(陰栓発見日=妊娠0日)まで、コーン油あるいはエストロゲン(E₂)0.05 μ g/kgを連日皮下投与した。飼料としてPLD(phytoestrogen low diet、オリエンタル酵母工業株式会社)あるいはCE-2(日本クレア)を自由に摂取させた。いずれの妊娠雌も妊娠18日に帝王切開して胎児を摘出した。その際、生殖突起肛門間距離(AGD)および体重を各胎児について測定した。生存胎児は、原則として子宮内での着床位置が雄に挟まれた雄(MMM:2M)、雌に挟まれた雄(FMF:0M)、雌に挟まれた雌(FFF:2F)、雄に挟まれた雌(MFM:0F)の各タイプに該当するもののみを、無処置のマウスに養母哺育させた。着床位置が左右子宮角の両端部の胎児、隣接する着床位置に死亡胚が認められた胎児についても対象から除外した。性成熟の指標として雄では生後30日か

ら包皮分離の時期、雌では生後25日から臍開口の時期を調べ、雌雄とも完成日に体重を測定した。さらに雌については臍開口日から性周期を観察した。10週齢に剖検し、生殖器官（精巣、精巣上体、精嚢、卵巣）の重量を測定した。測定した器官および前立腺は磷酸緩衝ホルマリンに固定し組織検査をした。

・内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究

Sprague-Dawley系ラットの雌雄を終夜同居して交尾した雌ラットを自然分娩させ、新生児を得た。新生児は生後1日（出生日の翌日）から連続して5日間、ジエチルスチルベストロール (DES) の0、1、10、50あるいは100 µg/kg 体重を背部皮下に投与した。最終投与24時間後に、各腹の雄出生児の半数を屠殺して脳を摘出し、視床を含む部位を0.1M 磷酸緩衝10%ホルマリン液にて固定した。これらの固定標本について、bcl2あるいはFasの免疫染色をおこなった。残りの雄出生児も同様に屠殺し脳の視床を含む部位を液体窒素にて凍結してウエスタンブロッティングによる検討まで-80°Cで保存した。まず未変性条件下でマイクロ2次元電気泳動 (M2D-PAGE) 分析した。次いで免疫化学的染色法によるHSP 90の同定を行った。PVDF膜へのタンパク質の転写は、ブロッティング装置（ホライズプロット：アトー社製）を用いた。転写用の緩衝液は0.025 M トリス -0.19 M グリシンを用い、80mAで60分間行い転写膜を1% スキムミルク・1%BSA-PBSで1時間室温にてブロッティングした。ブロッティング後の免疫化学的染色は、転写膜に1次抗血清(monoclonal anti-HSP 90)で37°C、体（抗マウスイムノグロブリンウサギポリクローナル抗体）37°C、30分間で感作させ、0.05% Tween 20-PBSで5分間3回の洗浄後、DAB基質キットで発色させた。

・内分泌かく乱化学物質の発がんプロモーション作用の検討

6週齢のF344雄ラットを用い、diethylnitrosamine (DEN、200 mg/kg)を腹腔内に単回ip投与し、その2週間後より被験物質として、bisphenol A (BPA)を

2000、250、25および0 ppmの濃度で基礎飼料中に混じて経口投与した。投与濃度はBPAの毒性データをもとに決定した。実験第3週目に肝の2/3を部分切除し、肝の増殖、再生を刺激した。なお、DENの投与は行わず、溶媒である生食を投与し、BPA 2000 ppmを投与する群も設けた。実験は8週間で終了し、剖検時、肝を摘出、ホルマリン固定し、発生した肝の前がん病変である glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巣を指標病変として、画像処理装置を用いて定量的に解析した。そして、その単位面積当りの発生個数および面積を算出し、各群間での比較検討を行った。また、剖検時に、各群5匹ずつ採血し血中のテストステロンを測定した。臓器重量（絶対重量）として肝、腎臓の重量測定のほか、前立腺、精巣、精巣上体、肛門挙筋の重量を測定し、さらに精子の数、運動率、形態学的な異常の割合を検討した。

・内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究

[7日間予備実験] 卵巣を摘出したF344雌ラットにN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 2000mg/kg bwでイニシエーションを行い、その後EBの皮下埋植を行うと同時に抗甲状腺剤としてペルオキシダーゼ阻害作用のあるSDM (30、100ppm)、propylthiouracil (PTU、5、30ppm)、ヨード取込み阻害作用のある過塩素酸カリウム (KClO₄、30、100ppm)、ヨード剤であるイオバノ酸 (30、100mg/kg) あるいは低ヨード食を投与し、投与7日で屠殺した。EB埋植を行わない各群も併せて設けた。甲状腺を中心に病理組織学的に観察するとともに、免疫組織化学的にproliferating cell nuclear antigen (PCNA)を検出し、濾胞上皮細胞における陽性率を計測した。

[長期実験] 卵巣を摘出したF344雌ラットにDHPN 2000mg/kg bwでイニシエーションを行い、その後EBの皮下埋植を行うと同時に抗甲状腺剤としてSDM (30、100ppm)、PTU (2、5ppm)あるいはKClO₄ (30、100ppm)を投与し、投与26週ないし40週で屠殺する。EB埋植を行わない各群も併せて設け、甲状腺を中心に病理組織学的に観察した。

・内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんに関する影響

の検討

E2 の 0 溶媒、10 および 3000 g/kg/week を筋肉内に投与投与し 4 週後に解剖するとともに、(1) Sham 群 (溶媒を 1 週間に 1 回筋肉内投与)、(2) OVX 群 (溶媒を 1 週間に 1 回筋肉内投与)、(3) E2 群 (E2 3000 g/kg を 1 週間に 1 回筋肉内投与) を設けいずれも 13 週後に剖検しさらに、(4) BC 群 (BC 3 mg/kg を解剖前の 4 日間に 1 日 1 回皮下投与) を追加した。剖検後乳腺組織を摘出して、免疫組織化学的に ER α (抗 ER₁ 抗体、1:80、Novocastra、6F11、抗 ER₂ 抗体、1:100、Santa Cruz、Y-19、抗 Ki-67 抗体、1:80、Novocastra、MM1、S-AB 法(ニチレイ、ヒストファイブ)を行い、DAB にて発色)を染色して、顕微鏡観察を行ったほか、組織の一部は RT-PCR 法により ER α の確認を行った。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

子宮癌好発系の Cj.Donryu ラットを用いて生後 24 時間以内の雌新生仔の背部に OP100mg/kg を隔日に 15 日齢まで計 8 回皮下投与を実施した。本投与量は成熟および新生仔ラットに明らかなエストロゲン様作用を示す用量である。成熟前の雌性生殖器系の発育に対する OP の影響をみるために経時的に動物を剖検し、内分泌学および形態学的検索を行った。10 週齢に排卵数を確認し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (LHRH) 投与し排卵の有無を検討した。OP 新生仔期暴露した子宮および膈の変化と内因性エストロゲンとの関連性を卵巣摘出後の子宮重量および膈スメア像より検索した。また、性周期の異常を全実験期間にわたって観察した。

子宮発癌への修飾作用を検討するために、新生仔期大量暴露を行ったこれらのラットに 11 週齢にて N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(ENNG)を子宮腔内に投与して 15 ヶ月齢まで観察し、子宮の増殖性病変について形態学的に検索した。

C. 研究結果

(1) (プレスクリーニング系追加開発)

・酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーション

特に複合効果の検討

スチレンダイマー、スチレントリマー、スチルベンは S9Mix 処理により、陽性となることが知られているメトキシクロールと同様、代謝活性化され、エストロゲン様活性が検出された。さらに、ビフェニル化合物 3 種類 (ジフェニルアミン、エーテル、メタン) も S9Mix 前処理により代謝活性化された。これらの物質は ER 結合性試験および培養細胞レポーター遺伝子試験でも陽性であった。陽性代謝物のひとつは HPLC 保持時間および UV スペクトルが標品と一致したことより、それぞれの 4-水酸化体であることを確認した。

酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) により、アンタゴニスト活性物質を検索したところ、6 物質が陽性であった。これらの物質は ER に対する結合性を示し、培養細胞レポーター遺伝子試験でもアンタゴニスト活性を示した。

・子宮等への影響をおよぼす遺伝子の解析
マイクロアレイプラットフォーム間の比較

オリゴ DNA を基盤上に合成する Genechip (Affymetrix 社) とオリゴ DNA をスライドガラス上にピンでスポットしたガラスアレイの、2 種のプラットフォームにより得られる遺伝子発現データを比較した。ガラスアレイとしては、クロンテック社のマウスガラスアレイを用いた。同一の RNA から各プラットフォームに対応するターゲット液を調製し、得られた発現データを解析ソフト Genespring を用いて検討した。RNA サンプルとしては、卵巣摘出マウスに 17- β -estradiol を 1 μ g/kg 皮下投与し、2 時間後に分離した子宮から調製し用いた。得られた結果を Genespring にて解析し比較した。その結果、両者の結果は殆ど一致しなかった。どちらのデータが正しいかについて、個々の遺伝子の発現をより正確に定量する定量 RT-PCR 法を併用した解析を進め、判断する必要がある。

Spike RNA を用いた絶対的な遺伝子発現比較

従来、サンプル間の遺伝子発現の比較は、同じ量の RNA 中の対象遺伝子の発現量の比較として行われてきた。しかしこの方法で得られる情報は、一定

の RNA 量に対する相対的な比較情報であり、化学物質処理により細胞当たりの RNA の全量に変化する状況では絶対量で変動していない遺伝子も変動している結果が与えられるなどの問題点があることが予想される。そこで、本研究では、サンプル間の遺伝子発現比較を細胞当たりの発現量という絶対的な観点から実施可能とするために spike RNA を導入し、これを RNA 抽出前に組織サンプルにその細胞数に相関する量（ここでは組織重量）に応じて加えることにより、最終的に得られる遺伝子発現データに元の細胞数の情報も組み込まれた形で解析可能とできるか検討した。その際、本研究で代表的なマイクロアレイプラットフォームとして選んだ Genechip システムで利用可能な遺伝子 (Bacillus genes : DAP、LYS、PHE、THR、TRP) 5 種、Clontech システムで利用可能な遺伝子(Lambda phage)1 種、計 6 種の遺伝子を spike RNA として選び検討を進めた。

(1) spike RNA によるクロスハイブリダイゼーション程度の検討：ダイナミックレンジの検討；6 種類の spike RNA を、ハイブリダイゼーション時に TRP 1.2pM、THR 3.6pM、DAP 10.8pM、PHE 32.4pM、LYS 97.2pM、Lambda 32.4pM となるように加え、ターゲット液を調製した。Genechip MGU74Av2 に対してハイブリダイゼーションし、spike RNA に対するシグナルが用いた spike RNA の濃度に相関して得られるか、spike RNA のみによりクロスハイブリダイゼーションシグナルを与える遺伝子プローブが存在するか解析した。その結果、添加した spike RNA の濃度に志じたシグナルが得られ、クロスハイブリダイズする遺伝子プローブも殆ど無いことが判明した。弱くクロスハイブリダイズした遺伝子プローブの配列と spike RNA の配列の相同性を比較したが、有意な相同性は見いだせなかった。

(2) spike RNA によるクロスハイブリダイゼーション程度の検討：高濃度 spike RNA を用いた検討。

(1) の検討で低い濃度で加えた spike RNA を高濃度加えた場合のクロスハイブリダイゼーションを検討するために、(1) で検討した最高濃度の 97.2pM の spike RNA を用いてターゲット液を調製し、クロ

スハイブリダイゼーションの程度を検討した。その結果、spike RNA のシグナル強度がどれも 6000 以上であるのに対し、200 以上のシグナルを与える遺伝子プローブは 6 々に留まった。

以上より、本研究で選択した spike RNA 6 種は、少なくとも Genechip MGU74Av2 に関してはほとんどクロスハイブリダイゼーションを示さない遺伝子群であることを確認した。

遺伝子プローブの定量性の検討

Genechip 上に配置された遺伝子プローブの組み合わせ数は約 12000 である。これらのプローブの遺伝子発現検出定量性に関する情報は殆ど無い。そこで本研究では可能な限り多くの遺伝子プローブに対して、その定量性を検討すべく系を組み実験を行った。個々の遺伝子プローブが十分に発現している RNA サンプルを材料に用い、サンプル量を振ってシグナル強度を得、両者の相関性を検討した。具体的には、全体の遺伝子発現パターンが大きく異なると考えられる脳と肝臓から各々 RNA を抽出し、両者の混合比が脳/肝臓比として、100%/0%、75%/25%、50%/50%、25%/75%、0%/100%となるように変えてターゲット液を調製し、Genechip MGU74Av2 にハイブリダイゼーションし、得られたシグナルを解析した。脳と肝臓で 2 倍以上発現の異なる遺伝子数は 4110 個であった。それらの遺伝子のシグナルを混合比を横軸に取りグラフ化し、直線性を検討したところ、発現比が 2 倍から 5 倍の間にあった遺伝子群の中には直線性が得られないものもあったが、5 倍以上の発現比を持つ遺伝子群は直線性を示すものが多いことが示された。

以上より、Genechip に配置された遺伝子プローブは、発現比の大きい遺伝子に関してはその発現量に相関したシグナルを与えることが確認された。

(2) 〈スクリーニング試験系確立研究〉

・ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響

第一段階として、EB におけるエストロゲン受容体並びに ERR の発現を RT-PCR にて調べたところ、ER α 、ER β 、ERR α 、ERR β 、ERR γ のい

れの発現も確認された。次いで、EB の4日培養後に c-DNA マイクロアレイをのべ3回実施し、DES により影響を受ける遺伝子を調べたところ、複数の遺伝子発現の増加が確認された。さらに、これらの内のいくつかに対して、定量PCRを行った結果、1.5倍以上増加した遺伝子は、Oncostatin M(1.7x)、Leptin (1.7x)、Mast cell growth factor (1.7x)、Ets-2(2.0x)、Wnt-4 (1.5x)であった。一方、内胚葉、中胚葉、外胚葉のマーカー遺伝子に変化は見られなかった。また、減少した遺伝子も認められなかった。

・子宮肥大試験および Hershberger 試験における遺伝子発現変化に関する研究

子宮重量を測定した結果、GEN 100 mg/kg/day 群で有意な高値がみられ、ICI 1 mg/kg/day 群で有意な低値が認められた。卵巣重量は、いずれの被験物質投与群にも変化は認められなかった。子宮におけるER α 、ER β およびAR遺伝子の発現量変化をreal-time RT-PCR法により評価した。各遺伝子について、溶媒対照群に対する統計学的有意性を評価した結果、GEN 100 mg/kg/day 群において、AR遺伝子の有意な低値が認められた。ER α 遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 μ g/kg/day 群で164%、GEN 100 mg/kg/day で80%、ICI 1 mg/kg/day 群で113%であった。ER β 遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 μ g/kg/day 群で173%、GEN 100 mg/kg/day で49%、ICI 1 mg/kg/day 群で103%であった。AR遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 μ g/kg/day 群で123%、GEN 100 mg/kg/day で41%、ICI 1 mg/kg/day 群で113%であった。

・卵巣摘出マウスを伴った子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究

子宮重量は、E₂投与後、8時間でプラトーに達し24時間まで持続した。一方、子宮重量あたりの全RNA量は、投与後8時間目には減少したが24時間目には著明に増加した。Housekeeping geneである β -actinのmRNAの発現は、E₂投与後4時間目から増加し、12時間後では無処置に対して2.5倍に達し、24時間目まで持続した。一方、GAPDHのmRNAの発現は、投与後12時間目では1.5倍となったが、24時間目には

回復した。子宮肥大の標的遺伝子である、ER α はE₂投与24時間後、2倍になった。VEGF mRNAは投与後すぐに上昇し始め8時間後にはピークに達し、その後減少した。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期および新生時期暴露による包皮分離試験に関する研究

胎児期暴露の礼に関しては、妊娠動物の作出、妊娠期間中のフルタミド投与さらにその後の分娩まで試験は経過したが、出生児の肛門生殖突起間距離および包皮分離時期の観察は現在進行中である。

一方、新生時期暴露例では、包皮分離は対照群では生後41日から、フルタミド1 mg/kg投与群では生後43日から、フルタミド10 mg/kg投与群ではさらに遅く44日から始まった。各群の全例の包皮分離が完了したのは、1 mg/kg投与群では45日、10 mg/kg投与群ではさらに遅く48日であったが、対照群の1例にも分離完了の遅い例があり、この1例は48日になって完了した。各群の平均値は、対照群が42.9日、1 mg/kg投与群が43.8日、10 mg/kg投与群が45.5日であり、10 mg/kg投与群では対照群に比べ有意に遅延した。包皮分離完了時の体重は、対照群の213.4gに比較し、1 mg/kg投与群では216.9gであり、対照群に比べやや高い値を示したが有意差はなく、10 mg/kg投与群では234.2gであり有意に高い値を示した。56日齢の屠殺時における体重に有意差はなく、精巣の絶対重量が有意に高い値を示したが相対重量に有意差はなく、精巣上体、前立腺および精嚢に有意な変化はなかった。

・28日間試験の改良- α _{2U}グロブリン評価の利用について

100 μ g/kg x 14 dayのDiethylstilbestrol (DES)投与によって一部の動物において著しいAUG mRNAの減少が観察されたが、10 μ g/kg x 14 dayではmRNAの明らかな変動は観察されなかった。また、1mg/kg x 14 daysの投与では全例に著しいAUG mRNAの減少が観察された。これらの結果は雄動物にDESを投与した場合に肝におけるAUGのmessage labelの変動は100 μ g/kg x 14 day以上の用量で認められるが、その変動は個体によって著しく感受性が異なることが示

された。本動物から得られた肝 total RNA を Template として蛍光標識 probe (Cy3、Cy5) を作製し Atlas Rat 1.0 glass array を用いて網羅的に遺伝子の変動を観察した結果 (図 1 及び 2)、DES の投与の用量及び AUG mRNA 減少と連動した Solute carrier 16 (monocarboxylic acid transporter)、 member 1 (NM012716)、calreticulin (X53363)、ribosomal protein L41 (X82550)、ezrin (X67788)、5HT3 receptor mRNA (U59672) の発現増加並びに signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1)(AF205604)、Glutamate cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) (L22191)、Superoxide dimutase 1、soluble(Y00404) の発現抑制が観察された。特に STAT1 の発現抑制は顕著であった。

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

・臓器特異的のハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析

各臓器における 17-β-estradiol 投与に伴う遺伝子発現変動の網羅的解析：今年度は 17-β-estradiol(E₂)投与後 4 時間における遺伝子発現変動を検討した。投与後 4 時間を選択した理由は、この経過時間において変動している遺伝子は、E₂ によりエストロゲンレセプターを介して直接発現制御されており、E₂ によるホルモン作用を担う遺伝子である可能性が高いと考えられるからである。成獣マウスを卵巣摘出後 2 週間経過させ、体内の estrogen を低下させ、1μg/kg の 17-β-estradiol を皮下注射し、4 時間後に (1) 子宮 (2) 肝臓 (3) 腎臓 (4) 脳視床下部領域 (5) 海馬を摘出した。臓器は速やかに RNA later に浸せきし、全 RNA を抽出精製した。網羅的遺伝子発現変動検討のプラットフォームは Genechip システムを選び、約 12、000 遺伝子クラスターからなる MGU74Av2 を用いて検討した。対象として、溶媒であるコーンオイルを同様に投与したマウスから摘出した臓器を用いた。溶媒対象である Vehicle 群における遺伝子発現を 1 とした場合の E₂ 投与に伴う変動比をプロットしたグラフを示す。このデータを K-means クラスタ解析 (10 グループ) し、各グループの平均変動パターンを記したグラフを示す。そ

の結果、各々の臓器に特徴的な変動を示すグループが少なくとも 1 グループは見出された。全体の約 8 割にあたるほとんどの遺伝子群は E₂ 投与により大きな変動を示さず、臓器間で特徴的な発現パターンも示さない遺伝子群であった。残りの 2 割の遺伝子群が臓器特異的な変動パターンを示す遺伝子群であった。また、同じデータを、近似するパターンを示す遺伝子毎に系統樹を作成する解析(Gene tree 解析)にかけた結果を図 3 に示した。その結果、子宮では大きく変動する遺伝子が少ないことに加え、肝臓で発現が抑制される遺伝子群、海馬で発現が上昇する遺伝子群が存在することがわかった。

以上、本年度はマウスを対し、E₂ 1μg/kg 投与 4 時間における遺伝子発現を、子宮、肝臓、腎臓、視床下部領域、海馬について実施し、各々の臓器に特徴的な発現変動パターンを示す遺伝子群を同定した。

・子宮肥大および Hershberger 試験

子宮の blotted weight は、経口投与では 30 μg/kg/day 以上で、皮下投与では 1 μg/kg/day 以上で対照群と比較して有意に増加した。子宮の wet weight もほぼ同様の結果であった。また、膈開口の早期化が、経口投与では 30 μg/kg/day 以上の動物で、皮下投与では 1 μg/kg/day 以上の動物で観察された。

・OECD ガイドライン 407 : 28 日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

今年度に予定されている動物実験は終了し、3 千 8 百遺伝子の搭載されている microarray による発現データを解析中である。明らかな発現変動を示した遺伝子については、その用量依存性を検索し、検出パラメータとしての可能性を検討する。次年度以降に予定されている代表的な内分泌かく乱化学物質での発現解析結果との比較により、内分泌かく乱作用に関与する発現クラスターの同定を進める。

・内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究

平成 14 年 3 月 28、29 両日にビデオ撮りが終了した。

(4) (確定試験等開発研究)

・内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影

響に関する研究-経世代試験の改良-

胎生 14 日 (最終投与の 24 時間後) の生殖巣の光顕観察の結果、DES 投与群の間質細胞の細胞質に多数の脂肪滴と思われる褐色色素像がみられ、電顕観察により脂肪滴であることを確認した。さらに細胞質にグリコーゲンの蓄積も確認された。生殖索には、DES 投与の影響を示唆する変化は、セルトリ細胞および生殖細胞にはみられなかった。生殖索における HSP70 および bcl2 蛋白の局在については現在観察中である

・胎児の子宮内位置と生後の発育・分化との関連に関する研究

出生日における体重には雌雄とも群間に有意な差はみられず、E₂ の影響もなかった。AGD については、PLD 摂取群では差はみられなかったが、CE-2 摂取群では E₂ 投与の影響が雄出生児でみられた。雌の膈開口に時期および雄の包皮分離の時期には飼料、子宮内位置および E₂ 投与の影響は確認できなかった。さらにさらに雌の性周期にも群間に差はみられなかった。生後 10 週での剖検時に測定した生殖器官の重量には飼料、子宮内位置および E₂ 投与の影響はみられなかった。

・内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究

DES 投与群 (10 μg/kg) と対照群の新生児について免疫化学的染色法による HSP 90 の同定を行った結果、HSP 90 は等電点 5.2 付近ならびに分子量 20 万前後に HSP 90 のタンパク質として同定された。肉眼的観察から DES 投与群に明らかな HSP 90 を認めたことから、対照群より DES 投与群において多く産生されることが示唆された。アポトーシス関連遺伝子の発現に関しては現在観察中である。

・内分泌かく乱化学物質の発がんプロモーション作用の検討

実験期間中、DEN- BPA(2000 ppm)の群および BPA(2000 ppm)の両群でそれぞれの対照群に比して体重の増加抑制が見られた。摂餌量では同様に BPA(2000 ppm)の投与群で高値を示す時期があった。BPA の摂取量は投与濃度に比例していた。臓器重

量では BPA(2000 ppm)投与群、すなわち DEN-BPA(2000 ppm)群および Saline-BPA(2000 ppm)群で肝、腎、前立腺、精巣上体、精囊および肛門挙筋に統計学的に有意な低値が見られた。DEN-BPA25ppm でも一部の臓器に有意な低値あるいは低値傾向がみられた。血中の testosterone 値を表 2 に示すが、いずれの群も統計学的に有意差は見られなかった。精子の数、運動率、形態学的異常を表 3 と 4 に示すが、いずれにも有意な変化は観察されなかった。また、表 5 に精子生成過程の staging を示した。その Staging は stage I-VI、stage VII-VIII、stage IX-XI、stage XII-XIV の 4 つの時期に分類してその割合で示した。その結果、各群に差はみられず、BPA による精子形成過程に影響はないものと考えられた。

肝の前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の肝の単位面積当りの数及び面積の結果を表 6 に示す。DEN 処置群間で比較したが、数および面積で群間の差は認めなかった。BPA 単独投与群では、GST-P 陽性細胞巢 (直径 0.2mm 以上) は発生しなかった。・内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究

[7 日間予備実験] 投与終了時の体重において、各抗甲状腺剤の影響は認められなかったが、EB 投与により各群とも 5-11%程度低値を示した。甲状腺重量は、対照群と比較して PTU (5、30ppm)群において有意に (p<0.01) 増加した。病理組織学的には SDM、PTU および KClO₄ の各群で濾胞上皮細胞の肥大と濾胞コロイドの減少が用量依存的にみられ、特に PTU (30ppm)において顕著であった。また、SDM および KClO₄ の各群では、EB 非投与群と比較し EB 投与群で濾胞上皮細胞肥大の程度が増強する傾向がみられた。また、濾胞上皮細胞の PCNA 陽性率は、対照群と比較して PTU (30ppm) 群で有意に (p<0.01) また、SDM (100ppm)、PTU (5ppm)および KClO₄ (100ppm)の各群で明らかに高値を示し、さらにいずれの群でも EB 非投与群と比較して、EB 投与群で高値を示す傾向がみられた。

[長期実験] 現在投与 26 週まで経過した。26 週投与終了時の体重において、各抗甲状腺剤の影響は認め

られなかったが、EB 投与により各群とも 24-28%程度低値を示した。甲状腺比重量は、PTU (5ppm)の EB 非投与群と比較して EB 投与群で明らかに高値を示し、SDM (100ppm)でも EB 非投与群と比較して EB 投与群で有意に ($p<0.01$) 高値を示したが、その差は PTU 投与群より少なかった。病理組織学的には、SDM (100ppm)の EB 非投与群では増殖性病変が認められなかったのに対し EB 投与群では 2/4 例に過形成が、1/4 例には腺腫がみられた。また、PTU (5ppm)の EB 投与群においても EB 非投与群と比較し、腺腫および腺癌の頻度が高くなる傾向がみられた。

・内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんおよび影響の検討

ER α は、エストラジオール 3000 μ g/kg 投与により IHC による上皮内の蛋白、および組織内の mRNA とも down-regulate された。一方、ER β は、対照群 E210 μ g/kg では IHC、RT-PCR により陰性であったが、E2 を 3000 μ g/kg 投与により蛋白、mRNA とも発現が見られた。また、E2 を 3000 μ g/kg 投与により、乳腺では、乳管は増殖、各腸し、上皮細胞では MIB-1 (増殖細胞抗原)の陽性核が増加し、E2 による細胞増殖が示された。下垂体では、プロラクチンの分泌を抑制するプロモクリプチン投与の乳腺での ER α 、ER β への影響は明らかでなかった。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

新生仔期暴露群の体重は無処置対照群と同様で、一般状態にも異常は認められなかった。性成熟前の観察では、性腺刺激ホルモン(卵胞刺激および黄体形成ホルモン)が投与群で明らかな低値を示した。また子宮の重量には変化が認められなかったものの、曝露群では生後 14 日齢から発育する子宮腺の形成が明らかに抑制された。免疫組織化学染色の結果より 10 日齢から子宮被覆、腺上皮および間質のエストゲンレセプター発現および細胞増殖活性の異常が認められた。成熟後の子宮では 8 週齢から被覆上皮が過形成を示し、卵巣は明らかに小さく黄体がなく小卵胞のみからなる polycytic ovary を呈した。曝露群の膈開口は対照群より約 1 週間早い時期に認められ、性周

期は正常なサイクルを示さずに持続発情を示した。成熟後の曝露群の卵管内に卵は観察されなかったが、LHRH 投与により排卵が誘発された。また卵巣摘出により子宮は萎縮し、膈スミアは速やかに去勢スミア像を示したが、その程度に群間の差はなかった。

大量の OP 新生仔期暴露によるラット子宮発癌修飾作用については、15 ヶ月齢の検査において曝露群の子宮内膜腺癌の頻度は対照群と同様であったが、対照群では高分化型で子宮内の癌であったのに対し、曝露群では中・低分化型で、腹腔内に浸潤性増殖あるいは遠隔転移を示す癌が有意に増加した。また、上皮過形成の頻度が有意に減少した。

D. 考察

(1) 〈プレスクリーニング系追加開発〉

・酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーションに関する研究では、化学物質の体内代謝を考慮に入れるため、ラット S9 Mix 処理を試料の前処理として導入した結果、いくつかの物質が代謝活性化を受けることを明らかにできた。一般に S9 Mix で処理すると水酸化されるが、ビフェニル化合物の代謝活性化物質は 4 位 (パラ位)の水酸化体であった。もちろんその他の代謝体、例えばオルト位水酸化体や二水酸化体なども予想されるが、今までのデータから陰性あるいは極弱い陽性であると予想される。アンタゴニスト活性物質として 6 物質が検索されたが、構造上から共通の部分構造は明確ではない。アゴニストに比べてレセプターへの結合様式・部位に特異性がないのかもしれない。なお、培養細胞系でアンタゴニスト活性を示したビタミン A 酸は本試験および結合性試験では陰性であった。

内分泌攪乱作用を評価しようとする場合、単一物質が複数のレセプターの系でアゴニスト・アンタゴニスト活性を示す例も検出されており、代謝活性化も考慮に入れるべきとなると、インビトロのスクリーニング系で総合評価することはますます困難になる。したがって、インビトロの試験系は候補物質の確認に必要なメカニズムの検討に重要になってくる。

・子宮等への影響をおよぼす遺伝子の解析では、

(1) マイクロアレイプラットフォームの代表的な 2 種、Genechip 型、スライドガラス型を選び両者の比較実験を開始し、両者のデータを一致させるには検討を要することが明らかとした。そのためには、定量 RT-PCR 法のような個々の遺伝子発現定量に関し正確な値の得られる手法からのデータと比較しながら両プラットフォームデータを解析することが必要であると考えられる。(2) スパイク RNA を用いた遺伝子発現絶対量に基づく解析法の開発を開始し、実際に Genechip 型に適用可能であることを確認した。spike RNA によるクロスハイブリダイゼーションもほぼ無視できることが確認され、組織にあらかじめ spike RNA を添加した後に RNA 抽出を行い、最終的にそれらのシグナルを得られることも確認できている。(3) マイクロアレイ上に配置された遺伝子プローブの、遺伝子発現量と得られるシグナル強度の相関性を検討する系を立案し、実際にその検討が可能であること、Genechip 型については、少なくともサンプル間の発現差が大きい遺伝子群は直線性を示すことを明らかにした。この検討系は今後他の種の Genechip セットの性能をチェックするためにも適用可能であると同時に、プラットフォーム間の比較実験にも適用可能であり、今後本研究の基本となる実験系であると考えている。実験間のばらつきを補正するための標準サンプルの作製と併せて今後検討を続ける必要がある

(2) 〈スクリーニング試験系確立研究〉

・ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響を検討した結果、EB は各種エストロゲン反応性受容体を発現することから、エストロゲン様物質の検出系として適していると思われた。マイクロアレイ解析の結果、DES は発生初期において、少なくとも内胚葉、中胚葉、外胚葉の形成に対して、影響を及ぼさない事が示唆された。一方、DES は Oncostatin M、Leptin、Mast cell growth factor、Ets-2、Wnt-4 等の遺伝子発現を増加させた。これらの内、Leptin についてはエストロゲンで誘導されることが知られており、本実験でも増加したことから、EB がエストロゲン様物質を検出するよい系であるこ

とが示唆された。その他の遺伝子の生物学的意義、並びに、より短期の DES の影響については今後検討していく予定である。

・子宮肥大試験および Hershberger 試験における遺伝子発現変化に関する研究では、子宮重量を測定した結果、GEN 100 mg/kg/day 群で有意な高値がみられ、ICI 1 mg/kg/day 群で有意な低値が認められた。卵巣重量は、いずれの被験物質投与群にも変化は認められなかった。子宮における ER α 、ER β および AR 遺伝子の発現量変化を real-time RT-PCR 法により評価した。各遺伝子について、溶媒対照群に対する統計学的有意性を評価した結果、GEN 100 mg/kg/day 群において、AR 遺伝子の有意な低値が認められた。ER α 遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 μ g/kg/day 群で 164 %、GEN 100 mg/kg/day で 80 %、ICI 1 mg/kg/day 群で 113 %であった。ER β 遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 μ g/kg/day 群で 173 %、GEN 100 mg/kg/day で 49 %、ICI 1 mg/kg/day 群で 103 %であった。AR 遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 μ g/kg/day 群で 123 %、GEN 100 mg/kg/day で 41 %、ICI 1 mg/kg/day 群で 113 %であった。

・卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究では、子宮重量の経時的变化は、8 時間目に一見して増加したようにみえるが、間質等の水分の貯留によるもの可能性を明らかにした。このことは、VEGF の遺伝子発現が E₂ 投与後すぐに上昇し始め、8 時間後にはピークに達した事と一致する。そのため、E₂ 投与 8 時間後の子宮重量で全 RNA 量を割ると全 RNA が減少したようにみえる。24 時間目では細胞あたりの正味の mRNA 増加が生じていると推察された。また、これまで内部標準として使用されてきた β -actin および GAPDH の mRNA の発現は、E₂ を投与した子宮では変動することが確認された。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期および新生時期暴露による包皮分離試験に関する研究では、性成熟の確認のために包皮分離時期を観察することは、手法としては簡便であるが、尿道下裂が発生すると、