

包皮分離時期の確認の妨げとなること、肛門生殖突起間距離の減少が認められる場合には、雌雄の判別が困難になるなどの問題点が指摘された。

・28日間試験の改良に関連して $\alpha_{2u}$ グロブリンの評価指標としての有用性を検討した。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0.1 mg/kg x 14 day以上の用量で認められ、1mg/kgの14日間投与では確実に肝におけるAUG mRNAの発現が抑制されるが、0.1mg/kgでは、その変動は個体によって著しく変動する。一方、0.01 mg/kg x 14 daysのDES投与では肝AUG mRNAの発現に顕著な影響はみられない。本実験ではDES投与によって顕著に肝AUG mRNAの減少がみられた個体と変動のみられなかった個体の肝からtotal RNAを抽出し、それをTemplateとして蛍光標識probe (Cy3, Cy5) を作製しDNA microarrayによる網羅的に遺伝子の変動の観察を行った結果、一部の遺伝子にDESの投与の用量及びAUG mRNA減少と連動した変化がみられた。変動した遺伝子のAUG転写制御における意義は今回の実験では推定することは困難であるが、内分泌かく乱物質の作用点として5HT3 receptor mRNA (U59672)の発現増加並びにsignal transducer and activator of transcription 1 (Stat1)(AF205604)の発現抑制が注目される。

### (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に関連して、各臓器における17- $\beta$ -estradiol投与に伴う遺伝子発現変動の網羅的解析を行った結果、各臓器に特徴的な変動を示す遺伝子群を選別することができた。これら遺伝子群の中には、少なくとも、上記条件において各臓器に対するエストロゲン作用を引き起こす遺伝子群が含まれると考えられる。これら候補遺伝子群の中から各臓器におけるエストロゲン作用に必須な遺伝子群を同定することができれば、その遺伝子群を基本に他の検討化合物による影響を検討することができる。エストロゲン作用に必須な遺伝子群は、エストロゲンレセプター $\alpha$ もしくは $\beta$ を介した遺伝子発現を通じて起こると考えると、エストロゲン

レセプターを欠失したマウスを用い同様の実験を行い、欠失マウスにおいて変動しないことを指標に必須遺伝子群の選別を行うことが可能である。一方、評価の指標として候補となりうることが判明した遺伝子群の数は全体の2割に相当する約2,600に留まった。網羅的な遺伝子発現解析から、より詳細な情報を得るためにはこの母数を増やす必要があると考えられる。

・子宮肥大およびHershberger試験の実用化に祭し、ラットに比較すると基礎的な検討が十分ではないマウスについてOECDガイドラインに準拠した方法で子宮肥大試験を実施した結果、幼若マウスを用いた場合でもEEの用量に依存して子宮重量が増加することが確認されたが、幼若ラットを用いた同様の試験結果と比較したところ、皮下投与については、マウスラット間に感度の差は認められなかったが、経口投与については、ラットに比べてマウスのほうが、感度がやや低い傾向にあった。なお、マウスにおいては高用量のEE投与群で陰開口の認められる例があったが、同様の所見は17 $\beta$ -estradiolを幼若なCD-1マウスに投与した実験においても報告されており(E. Padilla-Banksら、2001)表1のようにラットと比較するとマウスでは雌雄ともに性成熟に達する日齢が早いことがその原因と考えられる(和田ら、2002)。従って、子宮肥大試験に幼若マウスを用いる場合には、被験物質の投与時期を生後18~19日からの3日間に限定する必要があるのではないかとと思われる。

・OECDガイドライン407:28日間反復投与毒性試験法改良のために、評価指標として遺伝子解析の可能性を検討するための基礎的な研究として、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、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-経世代試験の改良を目的として、DES の胎生期投与により生殖巣生殖索に生じる変化を観察した結果、間質細胞に脂肪滴の増加ならびにグリコーゲンの蓄積を認めた。これは脂肪滴のテストステロンへの合成に異常が生じ、さらに合成に必要なグリコーゲンの消費がなされなかったために細胞質に蓄積したためと考えられた。

・胎児の子宮内位置が生後の発育・分化影響を与えるとの報告があることから、先に Sprague-Dawley ラットを用いた子宮内位置による影響を検討したが、AGD、性成熟、性周期、行動および活動量、生殖器官の発達に関しては何ら変化はみられなかった。今回、マウスを用いて低用量の  $E_2$  を投与して子宮内の着床位置による影響の有無を確認したが、マウスにおいても AGD、性成熟、性周期、生殖器官の発達に関しては影響は観察されなかった。これらのことから、マウスあるいはラットなどの胎児の子宮内での着床位置が、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に差違が生じることはない判断される。したがって、内分泌かく乱化学物質の次世代への影響の有無を評価する際には、子宮内での胚の着床位置を考慮する必要はないと判断される。

・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では、ラット新生児への DES 投与により視床下部に HSP 90 レベルの上昇がみられた。ラットの視床下部には性行動の統御に関連する神経核 SDN-POA および AVP-N-POA が位置することから、HSP 90 レベルの上昇はこれら神経核構築過程におけるニューロンの伸長障害あるいは細胞死と何らかの関連があるものと思われる

・ラット肝中期発がん性試験法を用いて、BPA の発がん性ならびにそのプロモーション作用の有無を検討した。その結果、GST-P 陽性細胞巢の数と面積いずれも群間に差はなく、従って、BPA は肝発がんに対してプロモーション作用は無いものと考えられた。また、BPA の内分泌攪乱作用に関しては最高用量の 2000 ppm 群で肛門挙筋および前立腺重

量の減少がみられたが、血中の testosterone に変化はみられず、また、精子形成過程での影響は見られなかった。従って肛門挙筋および前立腺重量の減少は内分泌かく乱作用によるものではなく、単なる毒性によるものとかんがえるのが妥当であろう。

・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では、鋭敏に検索する試験系を確立する目的で、種々の抗甲状腺剤と EB を組み合わせて投与し、甲状腺発がんに対する修飾作用を比較検討した。7日間実験の結果では、病理組織学および細胞動態学的に SDM、PTU および  $KClO_4$  の各群で EB 投与による抗甲状腺作用の促進傾向が認められ、EDCs と組み合わせて長期投与することにより、甲状腺発がん修飾作用が鋭敏に検出できる可能性が示唆された。26 週投与終了時においても、SDM および PTU 群で EB 投与による甲状腺重量の増加および増殖性病変の発生頻度の増加がみられ、ペルオキシダーゼ阻害剤の併用が最も効果的であることが示唆された。文献的にはエストロゲン投与により、腫瘍を誘発したラット甲状腺のエストロゲン受容体レベルが上がるものが報告されている (Fujimoto N. et al., Carcinogenesis, 1992)。一方、血清中エストロゲンが肝 UDP-GT 活性に影響を与える (Watanabe M. et al., Pharmacol. Res., 1997) ことも知られている。従って今回、EB 併用投与により抗甲状腺作用が促進傾向を示したメカニズムとして、甲状腺に対する直接作用と、肝における甲状腺ホルモンの代謝促進を介する間接的な作用の可能性が考えられる。投与 40 週で屠殺する長期実験においては、甲状腺腫瘍の発生について比較検討するとともに、血清甲状腺ホルモン値や肝 UDP-GT 活性の測定等も考慮する必要があると考えられた。

・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では、エストラジオール 3000  $\mu$ g/kg 投与により乳腺組織中の  $ER\alpha$  は、上皮内の蛋白、および組織内の mRNA とも down-regulate された。一方、 $ER\beta$  は、対照群 E210  $\mu$ g/kg では陰性であったが、E2 を 3000  $\mu$ g/kg 投与により蛋白、mRNA とも発現が

見られた。また、E2 を 3000  $\mu$ 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  $\alpha$ 、ER  $\beta$  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では、OP 投与により 体重および一般状態などの外表検査では変化が認められなかったが、OP の新生仔期大量曝露は雌性生殖器系へ重篤な影響をもたらすことが明らかになった。性腺刺激ホルモンの性成熟前の低値が LHRH 投与により改善することから、OP 曝露は視床下部を障害し、それに伴って視床下部・下垂体・性腺コントロール系を破壊することが確認された。polycystic ovary による相対的エストロゲン高値に伴う持続発情、子宮内膜過形成などの変化が観察されたが、卵巣摘出により消失したことからこれらの変化は内因性エストロゲン依存性の変化であり、間接的な影響であると考えられた。一方、子宮腺の形成抑制、エストロゲン感受性発現および細胞増殖活性の異常および膣開口の早期化は、内因性エストロゲンの低い時期から観察された変化であり、したがってこれらは OP 曝露の子宮、膣への直接的な発育分化に対する影響であると考えられた。

子宮の上皮過形成は前腫瘍性変化であり内膜腺癌が腺上皮から発生すると考えられていることから、曝露群での過形成の頻度低下は子宮腺の形成抑制に関連した変化であると思われた。しかし、発生した腺癌の悪性度が明らかに増加していたことから、OP の新生仔期曝露はラットの子宮癌を誘発する可能性が示唆された。発癌の機序については今後検討する予定である。

上記のいずれの変化もエストロゲン様物質胎仔・新生仔曝露で報告されていることから、今回も OP がエストロゲン様作用物質として働いた結果であると考えられた。

## E. 結論

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する試験系

の確立が急務であり、日本のみならず欧米諸国において重要な研究課題であるが、現時点では、「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」に焦点が掬られてきている。従って、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して、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行った。

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癌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。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sato M., Wada K., Marumo H., Nagao T., Imai K., Ono H. Influence of com oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, **56**: 156-164 (2000).

太田 亮、今井 清：動物実験モデルによる新しい評価

法：ラットを用いる子宮重量試験とハーシュバーク  
試験、アニテックス、13：304-312, 2001

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## (1) 〈ブ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—

西原 力、西川淳一、長田茂宏（大阪大学大学院薬学研究科）

## 研究要旨

スチレンダイマー、トリマー、ビフェニル化合物のいくつかは S9Mix 前処理により、酵母 Two-Hybrid 試験（ER-TIF2 系）でエストロゲン様活性陽性となった。ビフェニル化合物の陽性代謝物のひとつはそれぞれの 4-水酸化体であった。約 60 種の化学物質について 17 $\beta$ -Estradiol (E2) 共存下に酵母 Two-Hybrid 試験を行い、アンタゴニスト活性を測定ところ、ペンタクロロフェノール、トリブロモフェノール、ビタミン K3 などが検索された。

## A. 研究目的

私たちが開発した酵母 Two-Hybrid 試験（図 1）を基に、代謝活性化物質やアンタゴニストの検出系を開発するとともに、食品や環境試料などの混合物について、個々の物質のメカニズムを検討することにより、総合評価手法の確立を試みる。すなわち、混合物を総合評価するため、酵母 Two-Hybrid 試験の測定条件や前処理法について検討し、改良とそのバリデーションを行う。

## B. 研究方法

S9Mix 前処理条件（30℃、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 $\beta$ -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（図 1）。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。

## C. 研究結果

スチレンダイマー、スチレントリマー、スチルベンは S9 Mix 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（図 2）。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（図 3）。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（図 4）。

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（表 1）。これらの物質は ER に対する結合性を示し（表 1）、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。

## D. 考察

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今回図 6 に示した 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。

E. 結論

代謝活性化物質およびアンタゴニスト活性化物質が酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) により検出できることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

西川淳一、西原 力：酵母を用いたツーハイブリッド試験、井上 達、内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、2000、p.20-27

2) 雑誌

○Jun-ichi NISHIKAWA, Koichi SAITO, Jun GOTO, Fumi DAKEYAMA, Masatoshi MATSUO, and Tsutomu NISHIHARA : Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Nuclear Receptor, Similar to an Embryonic Benzoate Receptor BXR Biochem. Biophys. Res. Commun. **277**, 209-215 (2000)

○Tsutomu NISHIHARA, Jun-ichi NISHIKAWA, Tomohiko KANAYAMA, Fumi DAKEYAMA, Koichi SAITO, Masayoshi IMAGAWA, Satoshi TAKATORI, Yoko KITAGAWA, Shinjiro HORI, and Hideo UTSUMI Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay J. Health Sci. **46**, 282-298 (2000)

○Jun-ichi NISHIKAWA, Koichi SAITO, Jun GOTO, Fumi DAKEYAMA, Masatoshi MATSUO, and Tsutomu NISHIHARA : New Screening Methods for Chemicals with Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator, Toxicol. Appl. Pharmacol. **154**, 76-83 (1999)

2. 学会発表

金山知彦、西川淳一、高木達也、西原 力：エストロゲン様活性を示す化学物質の構造活性相関 (SAR)、第 121 年会日本薬学会、2001 (札幌)

三和郡平、曾我佳史、西川淳一、西原 力：S9mix 代謝による化学物質の ED 活性への影響、フォーラム 2001 衛生薬学・環境トキシコロジー、2001 (金沢)

Joohee Jung, Kunie Ishida, Jun-ichi Nishikawa, Tsutomu Nishihara : Screening of Antagonists to Estrogen Receptor by Yeast Two-Hybrid Assay、SETAC Asia/Pacific Symposiumu 2001

2001 (Kanazawa)

Eriko Mikamo, Shingo Harada, Jun-ichi Nishikawa, Tsutomu Nishihara : Some Endocrine Disruptors Effect on PXR Mediated Transcription  
SETAC Asia/Pacific Symposiumu 2001  
2001 (Kanazawa)

Tomohiko Kanayama, Jun-ichi Nishikawa, Tatsuya Takagi, Tsutomu Nishihara : Structure-Activity Relationships of Estrogenic Activity of Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay、  
SETAC Asia/Pacific Symposiumu 2001  
2001 (Kanazawa)  
他、多数

G. 知的所有権の取得状況  
なし

図1 酵母Two-Hybrid試験の原理と概要

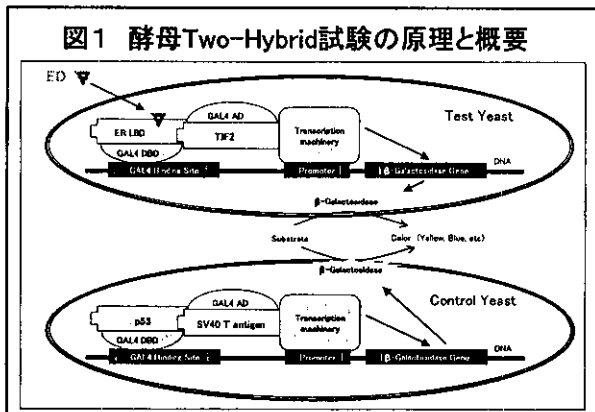


図2 S9処理によるエストロゲン様活性の変化

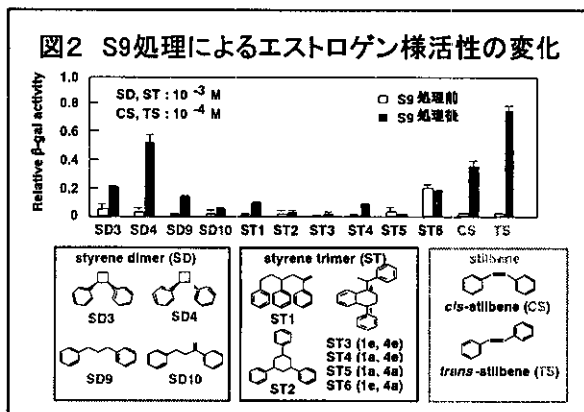


図3 S9処理によるジフェニル化合物の活性の出現

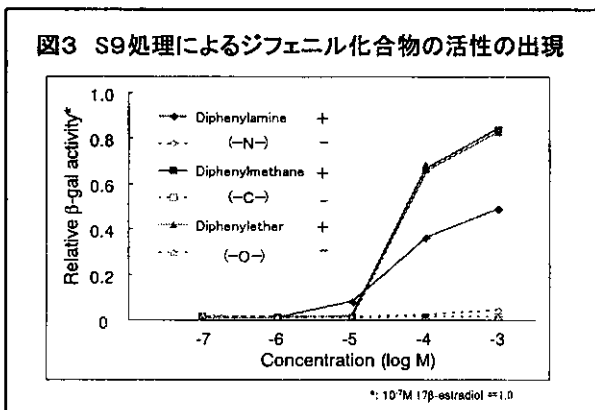


図4 ジフェニルアミンの代謝活性化体の同定

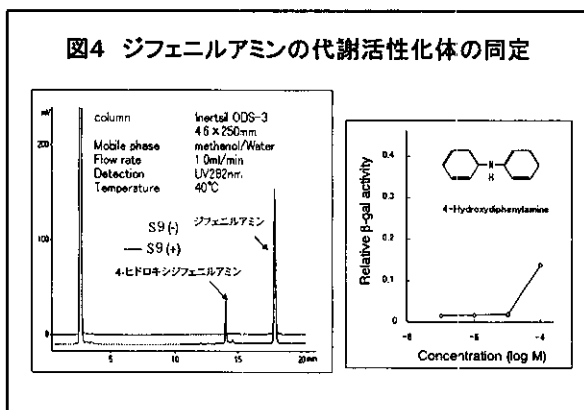
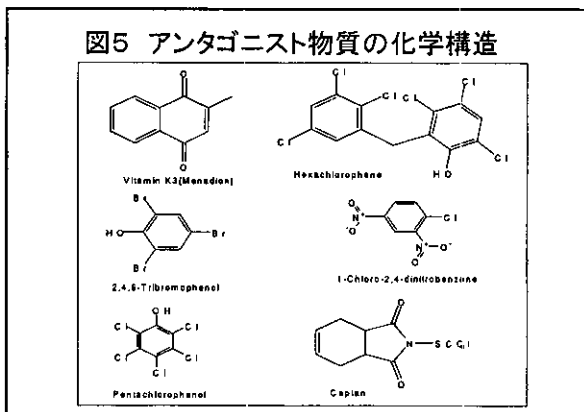


表1 ERαに対するアンタゴニスト物質

Compound	Yeast two-hybrid assay	
	RIC <sub>30</sub> (μM) *	Competitive binding assay IC <sub>50</sub> (μM)
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	10	N.D.
Captans	0.8	N.D.
Hexachlorophen	0.5	7.6
Pentachlorophenol	1	79
2,4,6-Tribromophenol	1	N.D.
Vitamin K3	50	8.6
4-Hydroxytamoxifen	1	0.03

\*RIC<sub>30</sub>: Relative inhibitory concentration, 30 %

図5 アンタゴニスト物質の化学構造



## 2. 子宮等への影響をおよぼす遺伝子の解析 (cDNA マイクロアレイ委託)

研究者 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

### 研究要旨

マイクロアレイ法の主たる方式である Genechip 型とスライドガラス型のプラットフォーム間の比較実験を実施した。同一の組織材料由来の RNA を用い、網羅的遺伝子発現を両システムで検討し、得られた結果を比較した。また、遺伝子発現比較を発現比から、より絶対的なスケールで検討するために、スパイク RNA を用いた測定系の開発を行い、利用の目途をつけた。さらに、これらの比較検討ストラテジーの一環としてマイクロアレイの用量相関性を検討するために、遺伝子発現プロファイルが大きく異なる 2 臓器として脳と肝臓を選び、それらの RNA をもとに混合比を変えたサンプルを調製し、一挙に多数遺伝子に関する検量線を作成し検討した。

### A. 研究目的

現在、cDNA マイクロアレイ実験プラットフォームには大きく分けて 2 種のシステムが存在する。一つは光リソグラフィ技術を応用し、基盤上にプローブとなるオリゴ DNA を合成する Genechip システムであり、もう一つはスライドガラスに DNA を溶解した液をピンでスポットもしくはインクジェットでスポットしプローブとするガラスアレイシステムである。この 2 つのシステムから得られるデータが一致するのか、異なる結果を与えるのかは厳密に比較されておらず、今後両システムからのデータが蓄積されてくることを予想し本研究では両者のデータの比較を行った。また、網羅的遺伝子発現解析を実施するに当たり、従来行われている

方法である、RNA 量をそろえて比較する方法では相対的な発現比較データが得られるに留まり、絶対的な発現比較データが求められる事例には対応できない問題となる。本研究ではこの問題に対処するために、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 を用いた spike RNA 法による標準化の可能性を検討した。具体的には、RNA 精製を行う前に spike RNA を組織重量 (理想的には細胞数、 $2n$  細胞が主となる検体については DNA 絶対量 (現在検討中)) に応じた量添加することで、細胞当たりの遺伝子発現比較 (絶対的な観点からの遺伝子発現比較) を行った。最後に、マイクロアレイチップ上に配置された遺伝子プローブの発現定量性、すなわち各プローブが対象



遺伝子の発現量に相関したシグナルを与えるかを、遺伝子発現の異なる臓器である脳と肝臓から得た RNA を用いて検討した。

## B. 研究方法

### 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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、 $1\mu\text{g}$  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 pBluescript II 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、polyA+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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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  $\mu\text{g}$  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、ビオチン化 CTP を取り込み、ビ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 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- $\beta$ -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  $\mu\text{g}$  を皮下投与した。溶媒対象にはコーンオイルを用いた。

### C. 研究結果

#### 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- $\beta$ -estradiol を 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  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 の濃度に応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 ヶに留まった。

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。

#### D. 考察

本年度の検討により、(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提案し、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応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。

#### E. 結論

本年度の研究により、マイクロアレイプラットフォーム間の比較検討結果等、本技術を内分

泌かく乱化学物質の試験研究に用いるに当たり検討すべき問題点を明らかにし、必要な実験系の立ち上げに成功した。様々な検討を行った結果、現時点で Genechip 型のプラットフォームの方が安定したデータを与えるものと考えている。スライドガラス型として、今年度用いたのがクロンテック社の製品であるが、本製品はピンでスポットされており、スライドガラス毎にスポット形状が異なるなどの問題点を抱えていることも判明している。次年度以降はピンスポット以外のスライドガラス型も検討し、両プラットフォームから得られるデータの信頼性の検討を続けたい。

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。しかし、本技術はまだ発展途上にある技術であり、より信頼性の高いデータを得るためには基盤調査をかかすことはできず、本研究の貢献は非常に大きい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yoon B-J, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kim D-Y, Inoue T: Mechanism of Action of Benzene Toxicity: Cell Cycle Suppression in Hematopoietic Progenitor Cells

(CFU-GM). *Expt'l Hematol*, 29, 278-285, 2001.

2. Kazuko Yoshida, Tohru Inoue, Yoko Hirabayashi, Kumie Nojima, Toshihiko Sado., Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/HE mice, *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 3(2), 121-126, 1999.
3. Hirokazu Kurata, Chang-Bai Liu, Jouljeta Valkova, Alisa E. Koch, Hans Yssel, Yoko Hirabayashi, Tohru Inoue, Takashi Yokota, Ken-ichi Arai, Recombinant Adenovirus Vectors for Cytokine Gene Therapy in Mice, *J Allergy Clin Immunol*, 103, S471-484, 1999

## 2. 知的所有権の取得状況

### A. 特許取得

なし

### B. 実用新案登録

なし

### C. その他

なし

## (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

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

#### 研究要旨

発生初期の胎児は小さく、かつ、培養も出来ないため、一般に解析が難しい。一方 ES 細胞から形成される胚様体は胎児の卵筒胚に近似している。そこで、この ES 細胞培養系を用いて内分泌かく乱化学物質の初期発生過程への影響を検索した。ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で浮遊培養し、内分泌かく乱化学物質として Diethylstilbestrol (DES) を 1nM の濃度で添加した。浮遊培養により形成された胚様体より 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検索した。この結果、leptin を始め、DES により変化する数種類の遺伝子が同定された。

#### A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。また、ES 細胞から形成される胚様体 (Embryoid body : EB と略す) は胎児の卵筒胚 (egg cylinder, 5~7 日胚) に似ており、主に発生学の分野で発生初期胎児に発現する遺伝子の解析等に利用されている。さらに、ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、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。本研究でとりあげる、DES は胎児に対して精巣発育障害や臍上皮の扁平上皮化・臆癌等の種々の毒性を示すことが報告されている。そ

こで、上記の 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した。

#### B. 研究方法

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 におけるエストロゲン受容体並びに 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様体より 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。

(倫理面への配慮)

特になし。

### C. 研究結果

第一段階として、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 にて調べたところ、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ERR $\alpha$ 、ERR $\beta$ 、ERR $\gamma$  のいず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。

### D. 考察

EB は各種エストロジェン反応性受容体を発現することから、エストロジェ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ジェ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 がエストロジェ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。

### E. 結論

EB は各種エストロジェン反応性受容体を発現することから、エストロジェン様物質の検出系として適していると思われた。また、エストロジェン反応性の遺伝子を含む数種の遺伝子が DES により増加した。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 書籍  
高木篤也、胚幹細胞を用いた検討、井上達監修、内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、シュプリンガーフェアラーク社、東京、2000年、pp143-149。

#### 2) 雑誌

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y., **Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: Differential usage of enhancers during development.**, *Mechanisms of Development*, 108 59-69, 2001.

Takahashi. Y., Koizumi Ken-ichi, Takagi A., Kitajima S., Inoue T., Koseki H. and Saga Y. Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway, *Nature genetics*, 25, 390-396, 2000.

Kitajima S., Takagi A., Inoue T., and Saga Y., Mesp1 and Mesp2 are essential for the development of cardiac mesoderm, *Development*, 127, 3215-3226, 2000.

Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyasaki, J and Inoue, T. Mesp1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126:3437-3447, 1999.

## 2. 学会発表

1. ES細胞の分化に及ぼすTCDDの影響。  
高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、井上達、第28回日本トキシコロジー学会学術年会、東京2001年6月
2. Synergistic function of Mesp2 and Paraxis on the vertebral development.  
Atsuya TAKAGI, Satoshi KITAJIMA, Yu TAKAHASHI, Tohru INOUE, Alan Rawls and Yumiko SAGA. 国際発生生物学会、京都2001年7月
3. Synergistic function of Mesp2 and Paraxis on the vertebral development.  
Atsuya TAKAGI, Satoshi KITAJIMA, Yu TAKAHASHI, Tohru INOUE, Alan Rawls<sup>2</sup> and Yumiko SAGA. Somite meetings in Nara, 奈良2001年7月
4. Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. Atsuya Takagi, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 21<sup>st</sup> International

Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Korea, 2001年9月

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし



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

研究者 永井賢司 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
グループリーダー

##### 研究要旨

化学物質の(抗)エストロゲン活性あるいは(抗)アンドロゲン活性を評価するための *in vivo* スクリーニング試験法として、子宮肥大試験および Hershberger assay が開発されてきた。しかし、これらの方法の評価指標である副生殖器官重量および病理組織学的検査の結果から外来性ホルモン様物質の作用機序を知ることは困難である。本研究では、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評価 (real-time RT-PCR により定量) することにより、その作用を分子生物学的なレベルで比較検討する。さらに、特徴的な遺伝子について、確定試験と目される試験 (二世世代繁殖試験等) 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も目的とする。本年度は、基本的な実験系の確認試験を実施した。

##### A. 研究目的

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する。さらに、特徴的な遺伝子について、確定試験と目される試験 (二世世代繁殖試験等) 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も目的とする。

##### B. 研究方法

基本的な実験系の確認を行うため、エストロゲン様活性物質として ethinylestradiol (EE 1 $\mu$ g/kg/day) および genistein (GEN 100 mg/kg/day), 抗エストロゲ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、ER $\alpha$ , ER $\beta$  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。

(倫理面への配慮)

(株)三菱化学安全科学研究所の動物実験倫理委員会において、承認されている。

##### C. 研究結果

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 $\alpha$ , ER $\beta$  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 $\alpha$  遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 $\mu$ 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 $\beta$  遺伝子発現量の溶媒対照群に対する割合は、EE 1 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

#### D. 考察

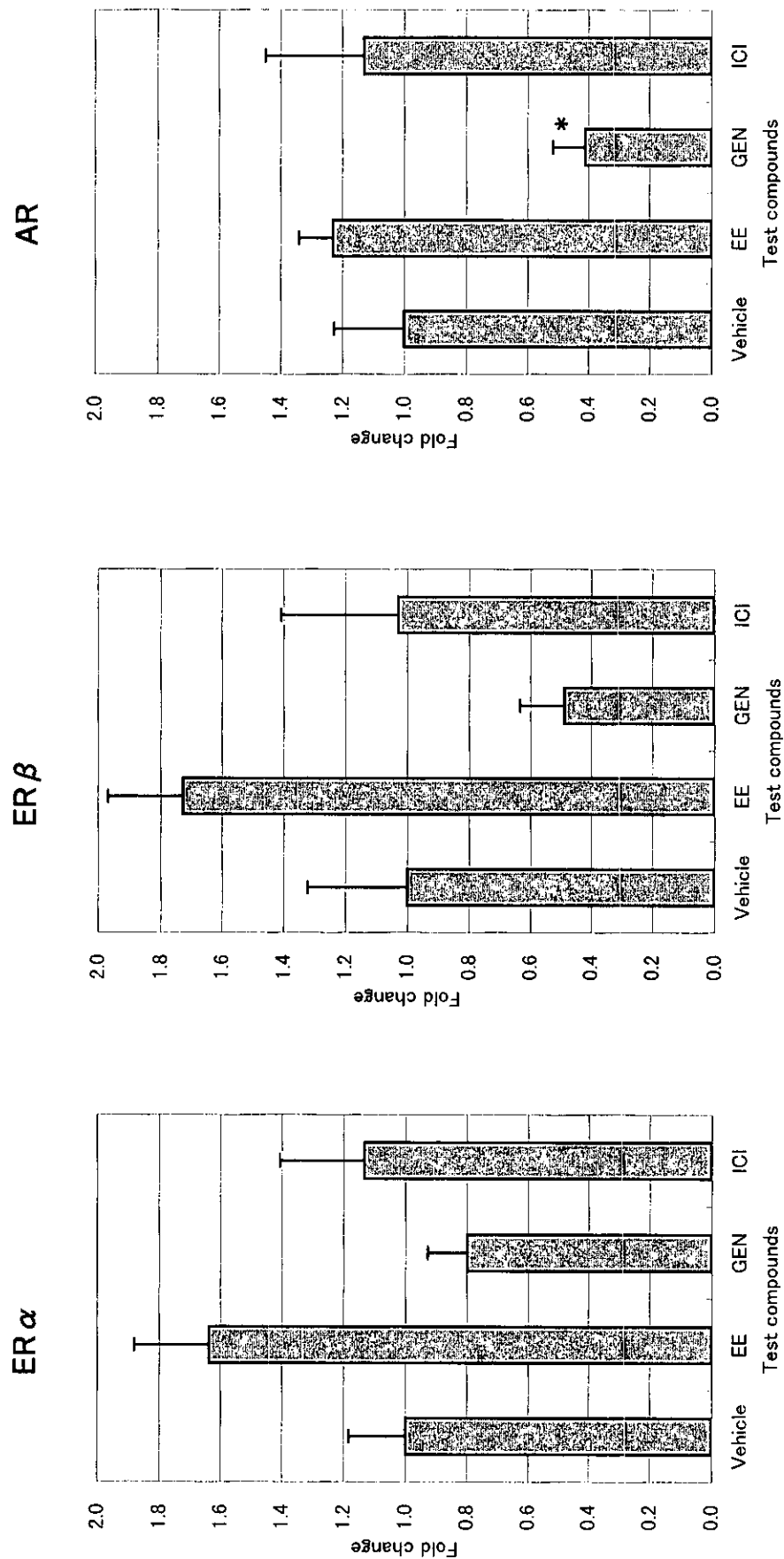
今回の検討では、単一の用量および投与期間を設定し、実験を行った。今後は、投与期間と各遺伝子発現量との関係および用

量反応性について検討する必要がある。

#### E. 結論

ラット ER $\alpha$ , ER $\beta$ および AR 遺伝子の発現量変化について、real-time RT-PCR 法により評価するための基本的な実験系の確認ができた。

Gene expression changes of estrogen receptor alpha (ER  $\alpha$ ), estrogen receptor beta (ER  $\beta$ ) and androgen receptor (AR) in the immature rat uterus.



Vehicle : Corn oil containing 1 % ethanol, EE : ethynyl estradiol (1  $\mu$ g/kg/day), GEN : genistein (100 mg/kg/day), ICI : ICI-182,780 (1 mg/kg/day)  
 Significantly different from Vehicle group : \*,  $p < 0.05$   
 Data represents means  $\pm$  SE.

## 5. 子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究

研究者 ○松島 裕子、五十嵐勝秀、井上 達、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  
主任研究官

研究要旨：mRNA 発現量の定量実験を行う際には、ターゲット遺伝子の変動量を明らかにするために、処置によって発現が変動しないと考えられる遺伝子（群）を内部標準として設定する必要がある。内部標準として、全 RNA に対して一定の割合で発現していると考えられる遺伝子を用いることがあり、それには一般には  $\beta$ -actin や GAPDH などの housekeeping gene が用いられることが多い。しかし、化学物質を投与した時にはこれらの内部標準遺伝子の発現も変動するという報告が多数みられる様になった。他方では、特定の遺伝子を内部標準として定めずに全 RNA 量を不変定数と仮定して実験している場合もある。いずれにしても、理論的に絶対的な変動評価は不可能であり、時として、ターゲット遺伝子の変動を誤って認識する可能性がある。これを正しく評価するには、種々の spike RNA を導入することが考えられるが、本研究では、検体中に存在する総細胞数に比例する形での spike RNA の導入を試みている。これにより、理論的には1個の細胞あたりの mRNA の定量的比較が可能となる。

今回は、このような spike 補正法を用いる事により、経時変化の描出、および、発現量の少ない遺伝子の発現変動の描出、が従来法よりも格段に明瞭に行える事を示す。具体的には、子宮肥大に関連する標的遺伝子である ER $\alpha$  (Estrogen Receptor alpha) mRNA および VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) mRNA の経時的発現を定量 PCR で検討した。ER $\alpha$  は 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) 投与 24 時間後には 2 倍になり、VEGF は E<sub>2</sub> 投与後すぐに上昇しはじめ、8 時間後にはピークに達した。これらの変動は、従来の「処置群値」/「溶媒対照群値」なる「比」を用いて表現する場合と異なり、かつより多くの情報を提供する事が示唆された。

### A. 研究目的

内部標準としてマウス遺伝子とホロモジーの無い  $\lambda$  phage の配列を spike RNA として用いることにより、E<sub>2</sub> 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。

### B. 研究方法

1) 動物の処置および子宮採取