

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℃の RNAlater 中で 1 ヶ月間保存した。

2) λ phage の作製

Kit 添付のシーケンス不明の 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 転写反応用の鋳型ベクターとした。Bacteriophage λ 由来の塩基配列は蛍光 DNA シーケ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/μl 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 μl の系に上記の cDNA を 1 μl 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 E₂ 標的遺伝子として ER α および VEGF を測定した。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、苦痛の少ない頸椎脱臼法を用いた。

C. 研究結果

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。

D. 考察

子宮重量の経時的変化は、8 時間目に一見して増加したように見えるが、間質等の水分の貯留によるものと考えられる。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 が減少したように見える。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。

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、 E_2 を投与した子宮では変動することが確認された。

E. 結論

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、臓器重量に対応して付加された λ phage を内部標準として用いることにより、変動することが確認された。今回は、各 mRNA の変動を臓器重量で検討したが、今後は、臓器重量の代わりに、検体中の細胞数を直接的あるいは間接的に、より正確に反映する指標（たとえば、総 DNA 量）に置き換えることで、1 細胞当たりの絶対的比較が正確に行えるようになると期待される。また、溶媒対照群での発現量が低い遺伝子については、処置群との発現量の比較が、 λ phageRNA 量を共通指標とした間接比較によって正確に評価される事が確認された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

松島裕子、ヒト影響モデルとしての動物試験・子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験；子宮肥大試験 -卵巣摘出法-、井上 達、内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、シュブリンガー・フェラーク東京株式会社、東京、p54-64、2000

2) 雑誌

M. Saitoh, T. Umemura, Y. Kwasaki, J. Momma, Y. Matsushima, et al., Toxicity Study of fa Rubber Antioxidant, Mixture of 2-Mercaptomethylbenzimidazoles, by Repeated Oral Administration to Rats., Food and Chemical Toxicology, 37, p.777-787, 1999

2. 学会発表

松島裕子、井上 達、菅野 純、子宮肥大反応の特性について、第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、p.127、2001

松島裕子、井上 達、菅野 純、 17β -estradialol の思春期前ラット投与における子宮肥大について -内分泌かく乱作用を照準とした経世代試験改良のための考察-、第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、横浜、p.244、2000

松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上 達、卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の関係について、第 2 回日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、神戸、p.88、1999

H. 知的所有権の状況

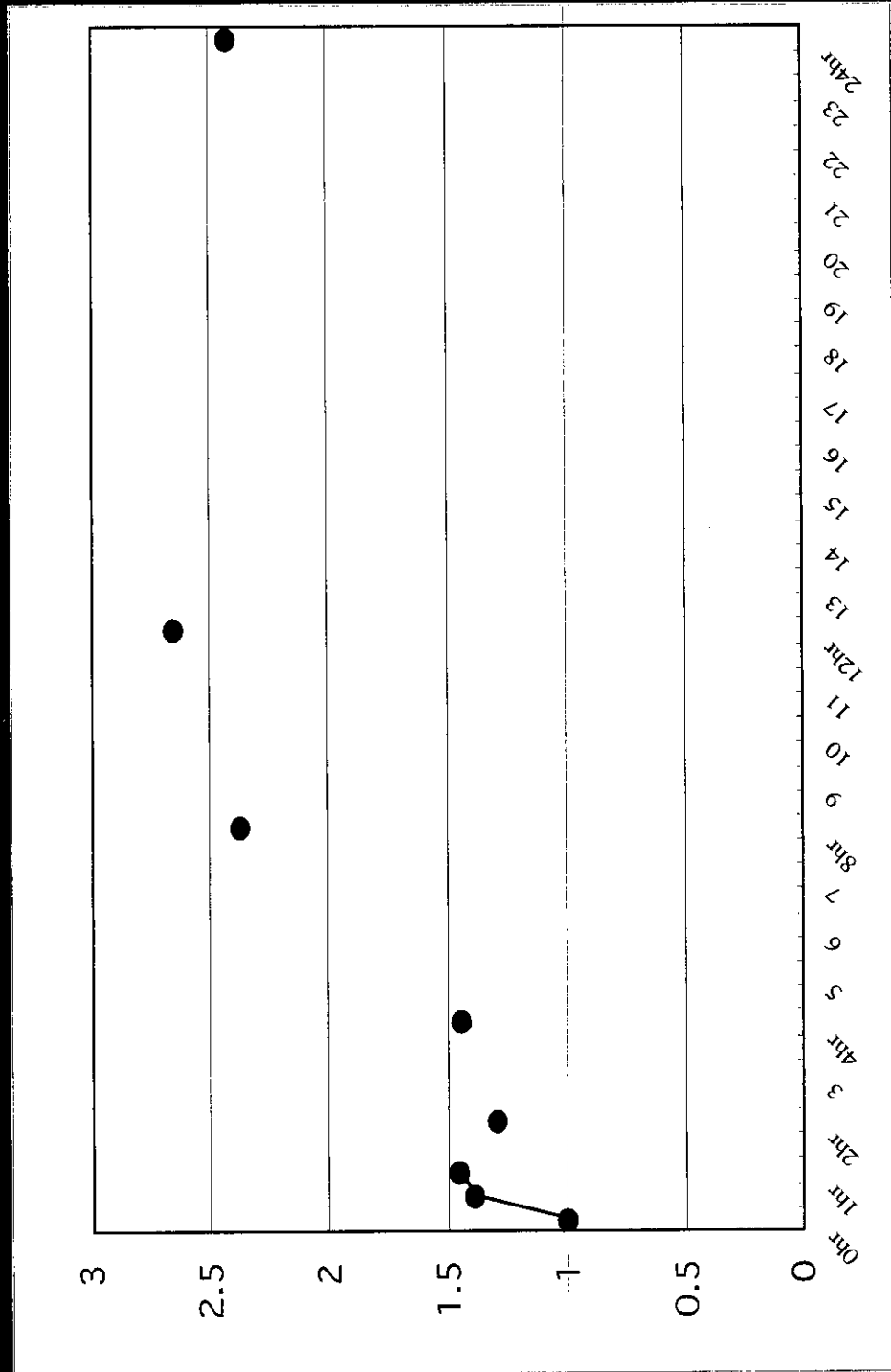
1. 特許取得

無し

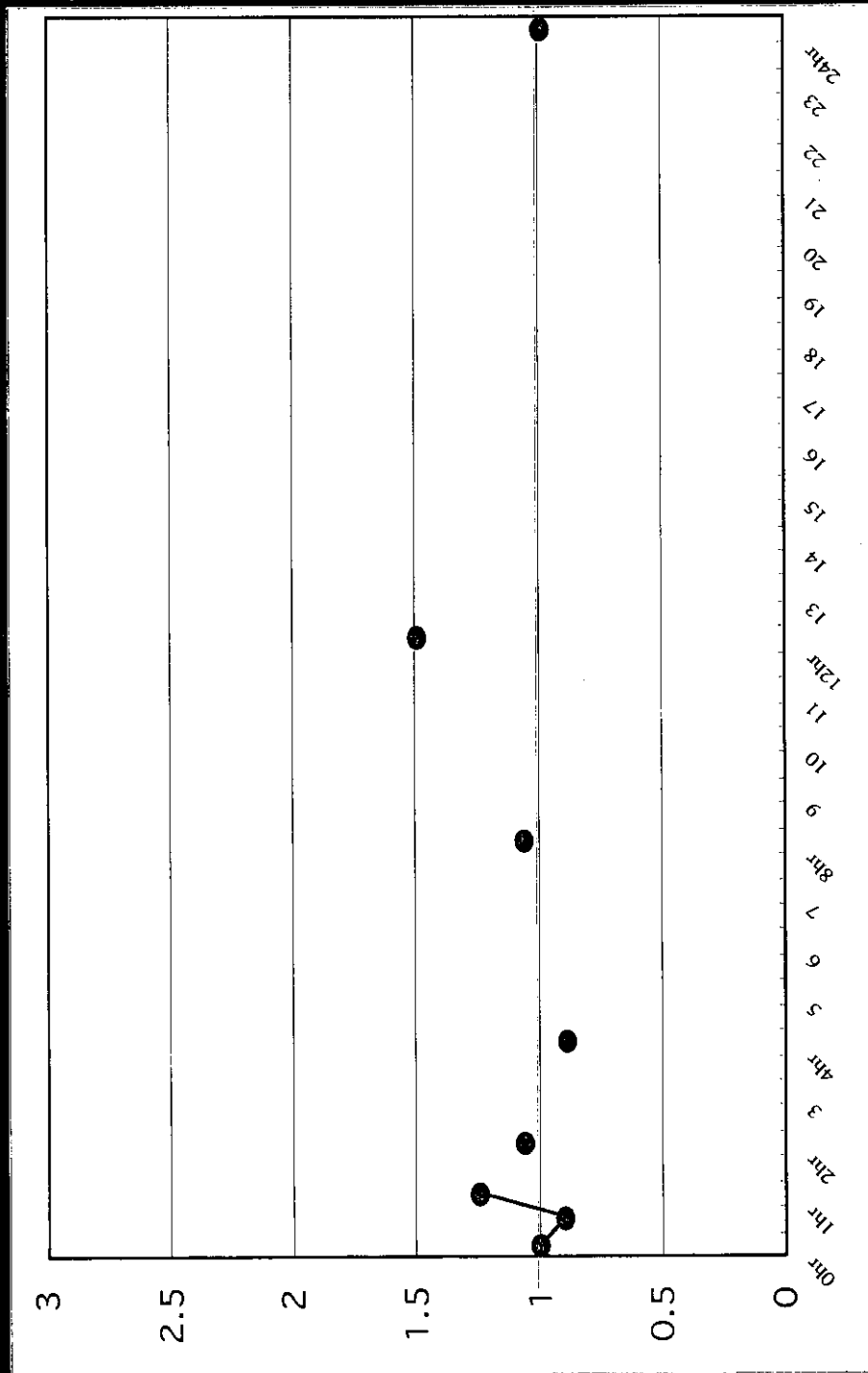
2. 実用新案登録

無し

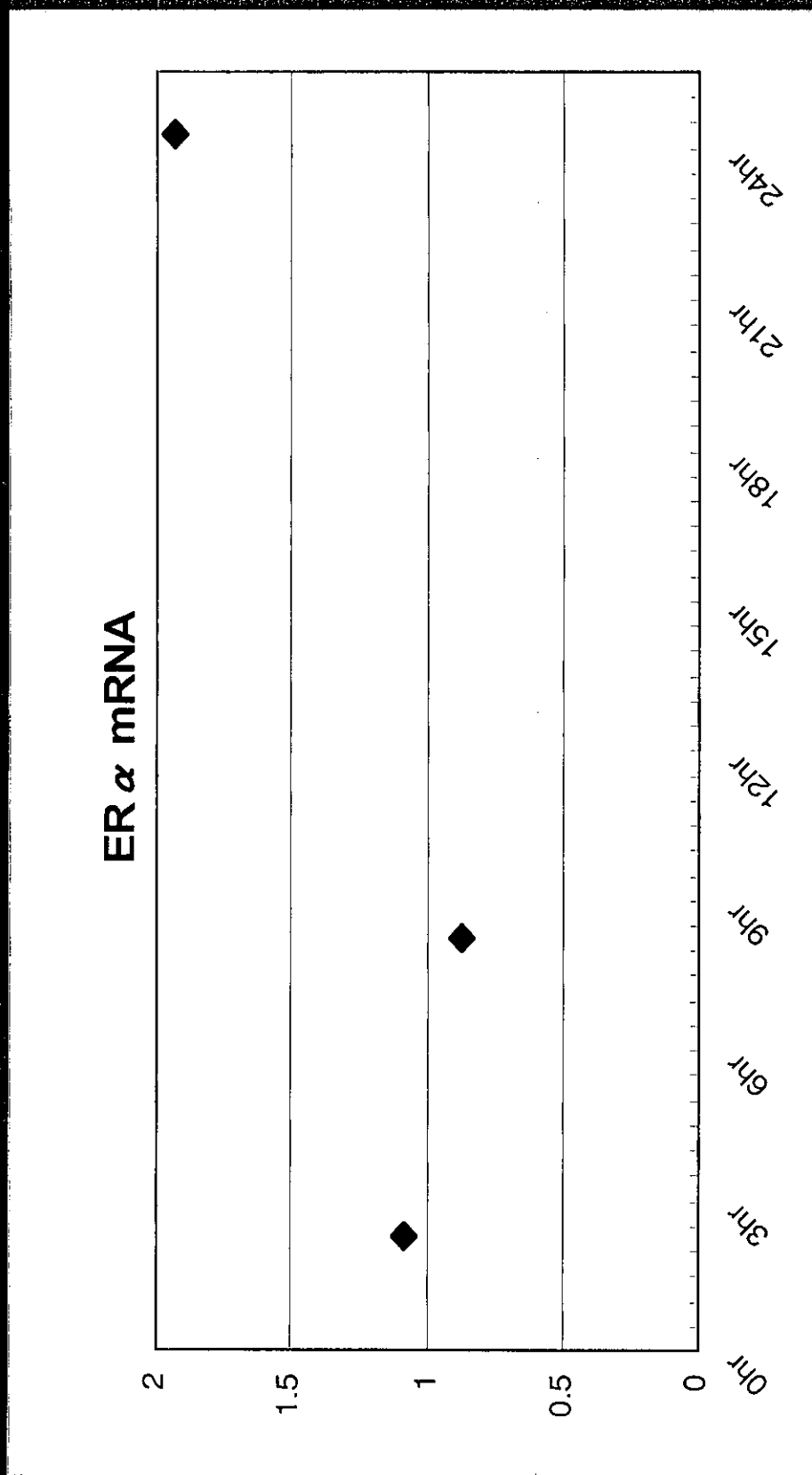
β-actin mRNAの変動



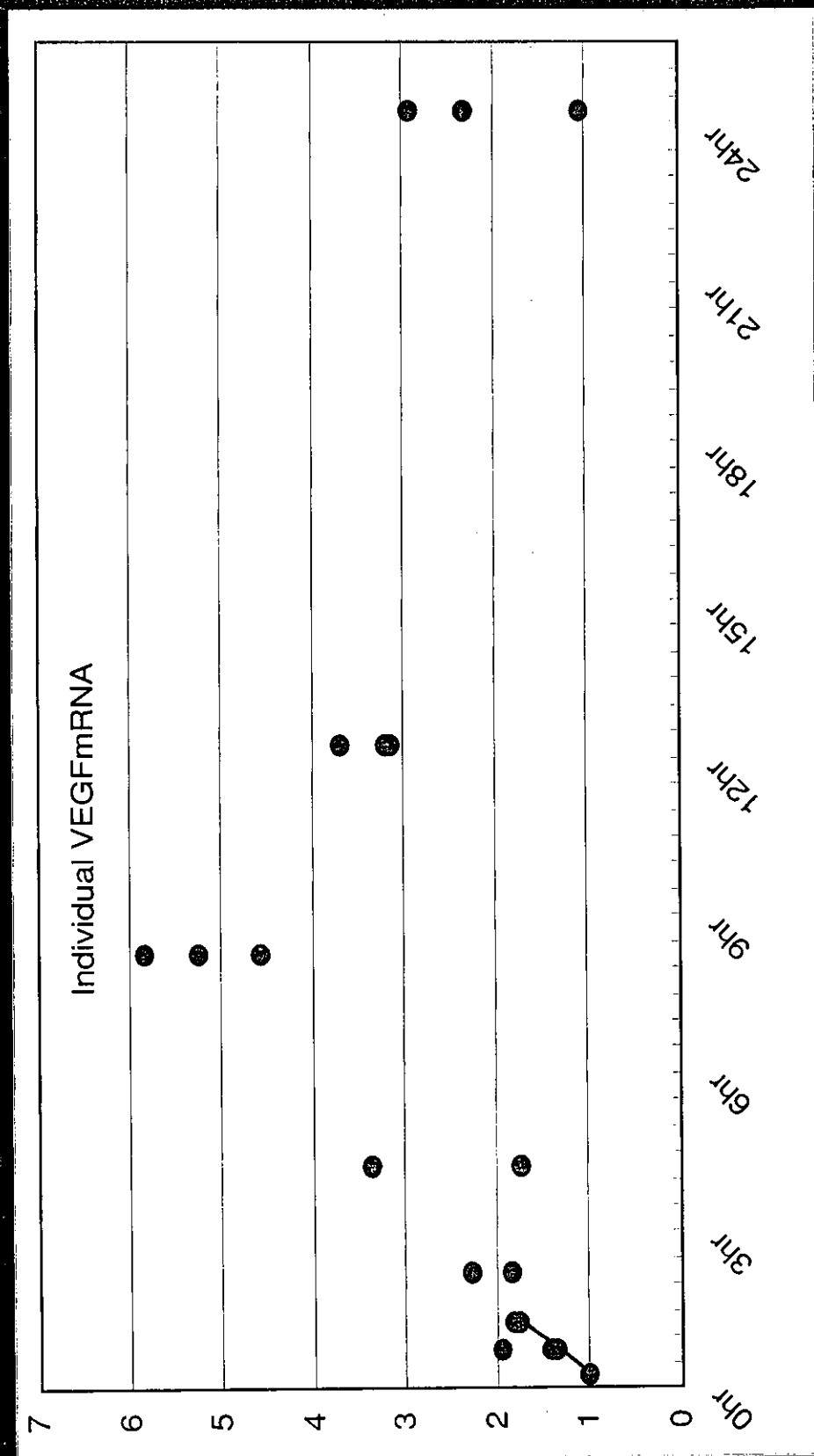
GAPDH mRNAの変動



ER α の変動



VEGF mRNAの変動



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

研究者 吉村慎介、長尾哲二、丸茂秀樹、斎藤義明、山口 肇、大原直樹、今井 清
財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 室長

研究要旨

化学物質の投与時期と雄ラットの性成熟時期の変化との関連を明らかにするため、フルタミドを妊娠 14～17日、あるいは 18～21日にラットに投与し、出生児の肛門生殖突起間距離を測定したほか、雄出生児の包皮分離時期の変化を観察した。

A. 研究目的

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ために、胎生期の異なる時期に、代表的なエストロゲン様物質あるいは抗アンドロゲン物質を投与して、包皮分離時期を観察し、さらに病理形態学的手法を用いて雄性生殖器・副生殖器関連組織を観察する。

B. 研究方法

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(表1)。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10mg/kg、第3および6群には100mg/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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

フルタミドを含む種々の化学物質の投与により、ラットの出生児に尿道下裂が生じる

ことが知られている。Finasterideを妊娠16～17日に投与したラットの雄新生児に尿道下裂が起きることが報告され(Clark, 1993)、今回使用したフルタミドの代謝物である、hydroxy flutamideを妊娠14～18日に投与したマウスの雄新生児にも尿道下裂が生じており(Silversides, 1995)、これらの時期を避けて投与すると発生しないことが確認されている。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、包皮分離時期の確認の妨げとなることが考えられる。今回はラットを用いているため、文献的に尿道下裂が発生すると思われる投与時期である妊娠16～17日を含む14～17日と、発生しないと思われる18～21日を投与期間とした。実際にスクリーニング試験として行うには、尿道下裂の発生を避けるべきであると思われるが、包皮分離時期に及ぼす投与時期の影響はまだ明らかではない。

肛門生殖突起間距離の測定も化学物質のホルモン作用の指標に用いられており、今回の試験でも測定作業はまだ継続中であるが、距離の減少が確認されている。包皮分離時期の観察をスクリーニング試験として用いることを予定しているため、雄のみを選択して試験に供する計画であるが、100mg/kg投与群では肛門生殖突起間距離の減少が著しく、雌雄の判別が困難になっている。これは、今後の課題であると思われる。

E. 結論

包皮分離完了時期の観察を用いて内分泌かく乱化学物質の検出を行うためには、尿道下裂の発生や、曝露後の新生児の雌雄判別の困難さなど、排除すべき課題が明らかにされてきた。今後は、いかに効率よく包皮分離時期の観察を実施するか、その方法を模索するほかに、肛門生殖突起間距離の測定を含む、種々の検査方法との感度の比較が必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S., Ono, H.: Reproductive effect of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reproductive Toxicology* 15: 293-315 (2001)
- 2) Nagao, T., Yoshimura, S., Saitoh, Y.: Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C. *Teratology* 61: 248-261 (2000)
- 3) Nagao, T., Ohta, R., Marumo, H., Shindo, T., Yoshimura, S. and Ono, H.: Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reproductive Toxicology* 14: 513-532 (2000)

2. 学会発表

- 1) 桑形麻樹子、斉藤義明、白見憲司、吉村慎介、長尾哲二：内分泌攪乱化学物質の新生児期投与による生殖障害 第 39 回 日本先天異常学会学術集会 1999 年
- 2) 長尾哲二、斉藤義明、吉村慎介、桑形麻樹子、中込まどか、今井 清、小野 宏：ノニルフェノールのラット新生児期曝露による生殖機能障害 日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会 1999 年
- 3) 長尾哲二、吉村慎介、澁谷 徹、小野宏：内分泌攪乱化学物質の精巣毒性と継世代催奇形性 日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会 1999 年
- 4) 長尾哲二、斉藤義明、吉村慎介：マイトマイシンCの着床前投与による奇形の発現機序に関する一考察 第 40 回日本先天異常学会学術集会 2000 年
- 5) 斉藤義明、白見憲司、渡辺千朗、永田伴子、大澤徳子、吉村慎介、今井 清、加藤正信：DEHPの妊娠期曝露による胎仔および出生仔の雄性生殖器への影響 第 18 回日本毒性病理学会 2002 年

表1. 内分泌かく乱化学物質の胎生期曝露による
包皮分離に関する研究

群構成

投与期間	群	投与物質	投与量 (mg/kg)	母動物数	包皮分離 観察数
妊娠 14-17日	対照群	オリーブ油	0	3	12
	低用量群	flutamide	10	3	12
	高用量群	flutamide	100	3	12
妊娠 18-21日	対照群	オリーブ油	0	3	12
	低用量群	flutamide	10	3	12
	高用量群	flutamide	100	3	12

7. 内分泌かく乱化学物質の新生児期暴露による包皮分離試験に関する研究

研究者 吉村慎介、長尾哲二、丸茂秀樹、斉藤義明、山口 肇、大原直樹、今井 清
財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 室長

研究要旨

化学物質の投与時期と雄ラットの性成熟時期の変化との関連を明らかにするため、フルタミドを生後 1～5 日、あるいは 35～39 日にラットに投与し、雄出生児の包皮分離時期の変化を観察した。その結果、生後 35～39 日投与試験では包皮分離完了時期は、対照群に比べ有意に遅延した。生後 1～5 日投与試験は現在進行中である。

A. 研究目的

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ために、新生児期の異なる時期に、代表的なエストロゲン様物質あるいは抗アンドロゲン物質を投与して、包皮分離時期を観察し、さらに病理形態学的手法を用いて雄性生殖器・副生殖器関連組織を観察する。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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 (図 1)。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 (表 1)。

包皮分離完了時の体重は、対照群の 213.4 g に比較し、1 mg/kg 投与群では 216.9 g 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 234.2 g であり有意に高い値を示した (表 1)。

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 (表 2, 3)。

D. 考察

フルタミド投与により、用量依存性に包皮分離完了時期が遅延した。投与期間は 5 日間であるが、10 mg/kg 投与群は約 3 日間の遅延を示していることから、この日齢で投与したフルタミドの作用は一時的で、投与の中止とともに包皮組織の変化は再開したものと思われる。包皮分離完了時の体重は分離時期の遅延とともに高値を示し、この遅延は発育抑制によるものではないことが示されている。

対照群の 9 例は、41 日齢から 4 日間のうちに包皮分離を完了したが、残り 1 例は 48 日齢まで完了せず、対照群の全例が分離を完了したのは低用量群よりも遅く、高用量群と同時期であった。対照例でこれほど分離完了時期が遅いのは稀であるため、これ例を除いて検定したところ、低用量群でも有意な遅延を示した。今後、スクリーニング試験として包皮分離観察を利用する際には、このような例の取り扱いを検討すべきであると思われる。

さらに幼若例を用いた試験として生後 1～5 日の投与を計画しているが、出生直後はまだ生殖器の発育が不十分であることから、この時期におけるフルタミド投与の影響は今回の性成熟直前の投与とは異なることが予想される。

E. 結論

包皮分離完了時期の観察方法を用いて内分泌かく乱化学物質の検出を行うためには、その個体差の有無が結果を左右することが明らかになった。今後は、個体差を少なくできる試験方法の開発や、背景データとの比較などの検討、さらに、投与時期の検討や種々の検査方法との感度の比較が必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usami, K. and Ono, H.: Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to *p*-octylphenol. *Reproductive Toxicology* 15: 683-692 (2001)
- 2) Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usami, K., Ono, H.: Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology* 15: 399-411 (2001)
- 3) Nagao, T., Saito, Y., Usami, K., Nakagomi, M., Yoshimura, S. and Ono, H.: Disruption of the reproductive system and reproductive performance by administration of nonylphenol to newborn rats. *Human & Experimental Toxicology* 19: 284-296(2000)

2. 学会発表

- 1) 桑形麻樹子、齊藤義明、白見憲司、吉村慎介、長尾哲二：内分泌攪乱化学物質の新生児期投与による生殖障害 第 39 回 日本先天異常学会学術集会 1999 年
- 2) 長尾哲二、齊藤義明、吉村慎介、桑形麻樹子、中込まどか、今井 清、小野 宏：ノニルフェノールのラット新生児期曝露による生殖機能障害 日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会 1999 年
- 3) 長尾哲二、吉村慎介、澁谷 徹、小野宏：内分泌攪乱化学物質の精巣毒性と継世代催奇形性 日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会 1999 年
- 4) 長尾哲二、齊藤義明、吉村慎介：マイトマイシン C の着床前投与による奇形の発現機序に関する一考察 第 40 回日本先天異常学会学術集会 2000 年
- 5) 齊藤義明、白見憲司、渡辺千朗、永田伴子、大澤徳子、吉村慎介、今井 清、加藤正信：DBHP の妊娠期曝露による胎仔および出生仔の雄性生殖器への影響 第 18 回日本毒性病理学会 2002 年

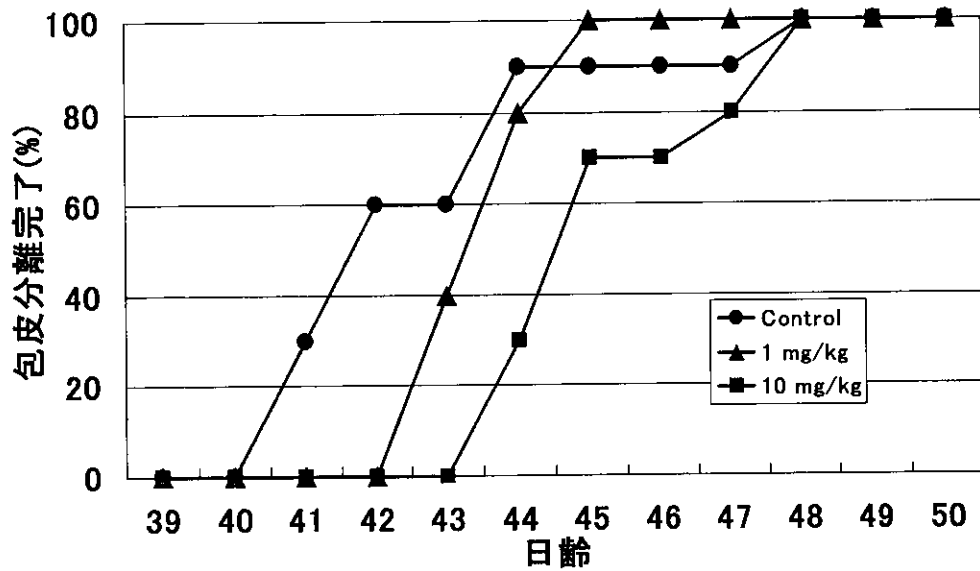


図1 生後35～39日にflutamideを経口投与した雄ラットの包皮分離時期の観察

表1 生後35～39日にflutamideを経口投与した雄ラットの包皮分離時期の観察

群	n	分離完了時日齢	分離完了時体重(g)
Control	10	42.9 ± 2.2	213.4 ± 23.9
1 mg/kg	10	43.8 ± 0.8	216.9 ± 16.5
10 mg/kg	10	45.5 ± 1.6 **	234.2 ± 14.2 *

Mean ± S.D.

表2 生後35～39日にflutamideを経口投与した雄ラットの
56日齢における器官重量

絶対重量	n	体重(g)	精巢(mg)	精巢上体(mg)
Control	5	314.4 ± 25.1	2506.7 ± 132.3	458.3 ± 37.8
1 mg/kg	5	300.5 ± 24.7	2530.9 ± 105.3	500.4 ± 46.7
10 mg/kg	5	307.3 ± 19.5	2768.6 ± 85.5 **	507.0 ± 45.3

相対重量	n	体重(g)	精巢(mg/kg)	精巢上体(mg/kg)
Control	5	314.4 ± 25.1	8.019 ± 0.876	1.467 ± 0.186
1 mg/kg	5	300.5 ± 24.7	8.469 ± 0.775	1.665 ± 0.061
10 mg/kg	5	307.3 ± 19.5	9.028 ± 0.414	1.660 ± 0.228

Mean±S.D.

表3 生後35～39日にflutamideを経口投与した雄ラットの
56日齢における器官重量

絶対重量	n	体重(g)	前立腺(mg)	精囊(mg)
Control	5	314.4 ± 25.1	264.3 ± 72.9	695.2 ± 118.9
1 mg/kg	5	300.5 ± 24.7	312.5 ± 45.8	772.2 ± 65.7
10 mg/kg	5	307.3 ± 19.5	301.1 ± 123.7	670.0 ± 159.4

相対重量	n	体重(g)	前立腺(mg/kg)	精囊(mg/kg)
Control	5	314.4 ± 25.1	0.838 ± 0.201	2.217 ± 0.373
1 mg/kg	5	300.5 ± 24.7	1.040 ± 0.118	2.577 ± 0.229
10 mg/kg	5	307.3 ± 19.5	0.965 ± 0.361	2.190 ± 0.561

Mean±S.D.

8. 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、野田修二、佐脇正邦、山崎寛治

財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 課長

研究要旨： α_{2u} グロブリン (AUG) mRNAの発現はDiethylstilbestrol (DES)を10 μ g/kg の用量で14日間反復投与した場合には明らかな変動を示さないが、1mg/kg の用量で14日間投与した場合には著しく減少し、血清AUGも消失する。DES投与の影響により肝AUG mRNAの著しく減少した個体と変化のみられなかった個体の肝臓から抽出したtotal RNAを鋳型としてCyanine 3 (Cy3) 或いはCyanine 5 (Cy5)標識cDNAを調製し、これをTAKARA製DNA arrayにハイブリダイズさせ、遺伝子発現の変動を観察した。その結果、DES投与に伴う著しいsignal transducer and activator of transcription 1 (Stat1) mRNAの抑制が観察され、本転写因子のAUG発現制御機構への関与が示唆された。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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 level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

(表1)。

D. 考察

雄動物に DES を投与した場合に肝における AUG の message level 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 (図1及び2)。その結果、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 (表1)。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。

E. 結論

今回の実験において変動した遺伝子群の AUG 転写制御における意義を明確にすることはできなかったが、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。

F. 健康危険情報

該当する情報なし。

G. 研究発表

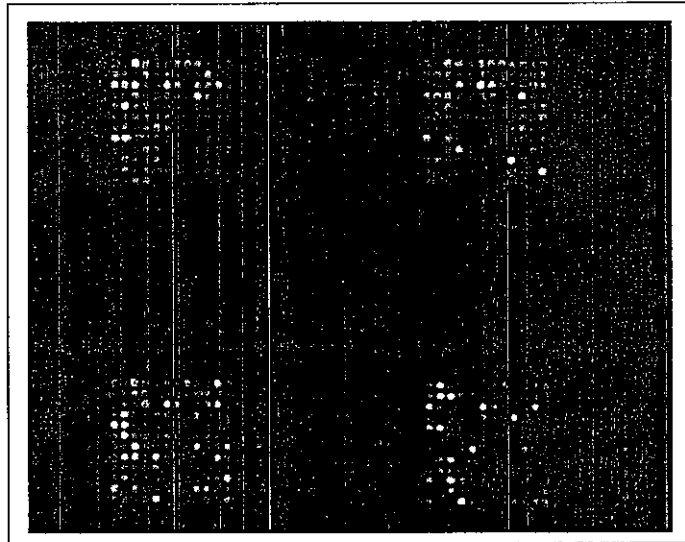
1. 論文発表

- Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K., Hepatic α_{2u} -globulin mRNA levels and diethylstilbestrol-associated testicular atrophy in rats. *Reprod Toxicol.* 2000; 14(4): 355-357.
- Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K., Changes in serum α_{2u} -globulin levels in male rats given diethylstilbestrol and applicability to a screening test for endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol.* 2000; 74(1): 48-53.

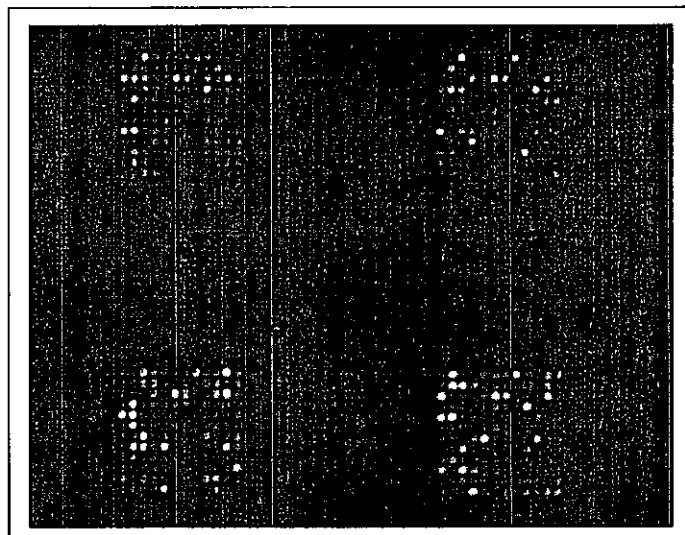
2. 学会発表

- 武吉正博、穴井俊二、飯田憲二、Diethylstilbestrol(DES)投与雄ラットの血清 α_{2u} -globulin level の変動と endocrine disrupter screening への応用、日本トキシコロジー学会総会、1999 (札幌)
- 武吉正博、佐脇正邦、野田修志、山崎寛治、高月峰夫、血清 α_{2u} -globulin level の内分泌攪乱物質スクリーニング法への応用、日本トキシコロジー学会総会 (横浜)、2000

- Takeyoshi, M., Sawaki, M., Yamasaki, K., Takatsuki, M. Changes in serum alpha 2u globulin levels in male rats given diethylstilbestrol and bisphenol A and its applicability to screening test for estrogenic chemicals, EUROTOX annual meeting (LONDON), 2000
 - 武吉正博、佐脇正邦、山崎寛治、高月峰夫、Diethylstilbestrol 及び Bisphenol A 投与雄ラットの血清 α 2u-globulin 濃度の変化と女性ホルモン様作用物質スクリーニング試験への適用性、内分泌攪乱化学物質学会研究発表会（横浜）、2000
- H. 知的所有権の取得状況
特になし。



0.01mg/kg x 14 days (AUG mRNA 変化なし)



1mg/kg x 14 days (AUG mRNA 減少)

図1 AUG mRNAの変動に伴う遺伝子発現の変化
(TAKARA InteliGene Rat Toxicology chip Ver. 1 使用)

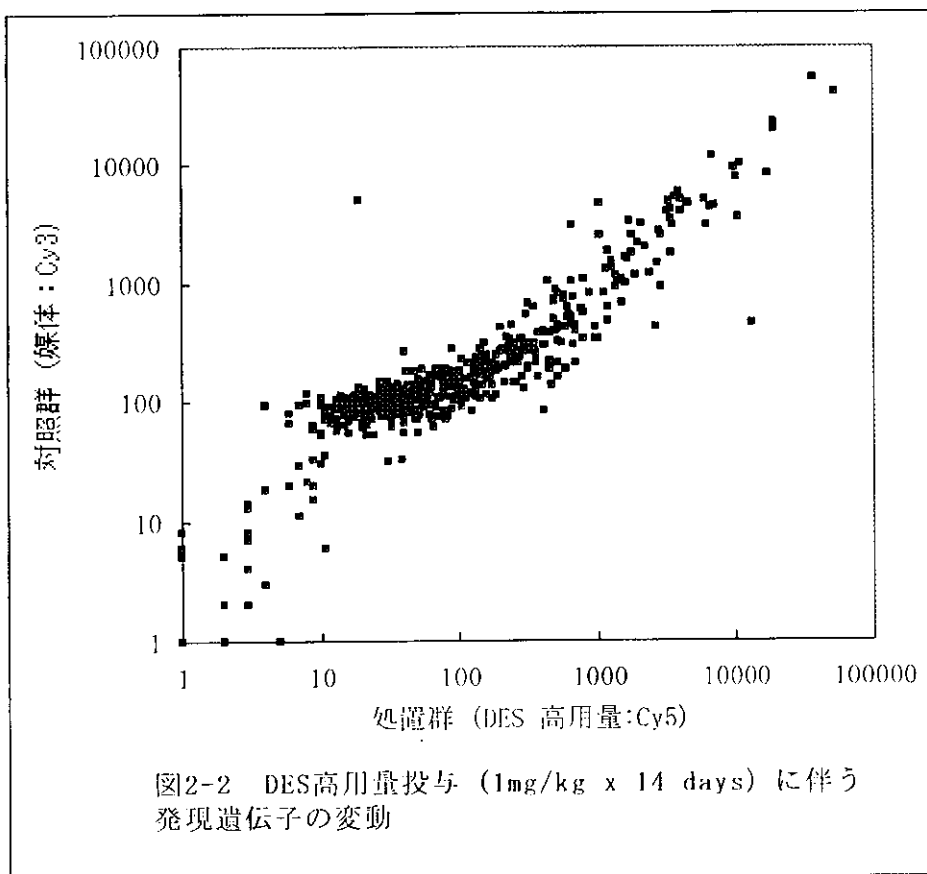
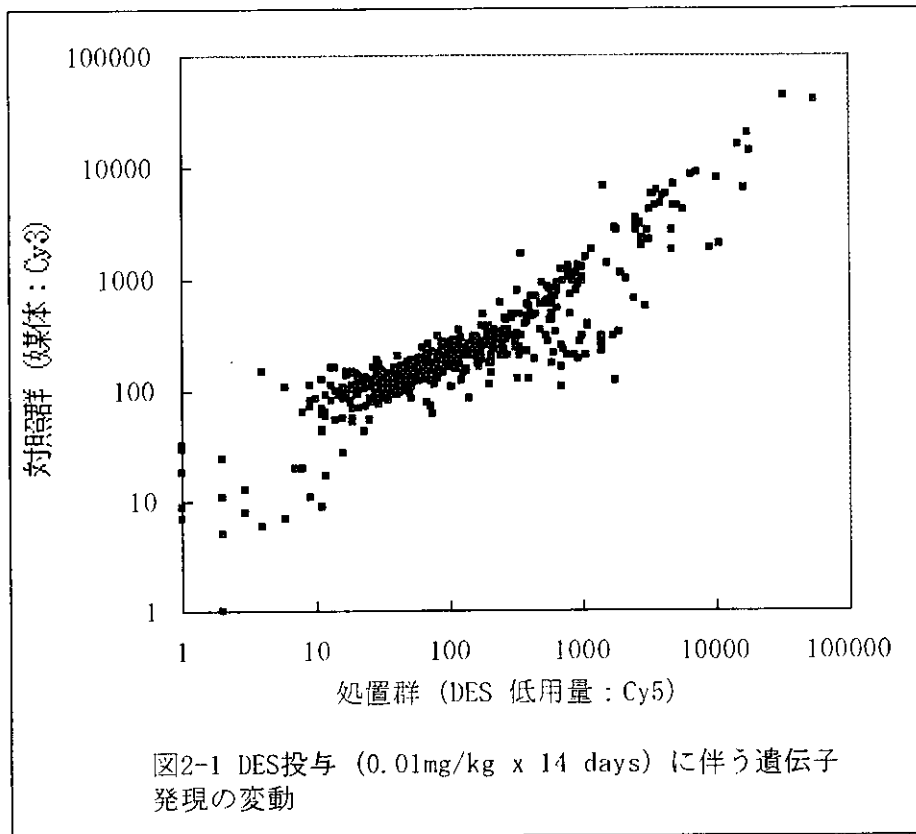


表1-1 Up regulateされた遺伝子群

T/C ratio (Low dose)	T/C ratio (High dose)	変化率	GenBank Acc. No.	Gene Name
0.20	5.04	24.68	NM_012716	Solute carrier 16 (monocarboxylic acid transporter), member 1
0.40	2.40	6.06	X53363	Rat mRNA for calreticulin, complete cds
5.13	29.76	5.81	X82550	R. norvegicus mRNA for ribosomal protein L41
0.37	1.64	4.38	X67788	ezrin
0.20	0.81	3.96	U59672	Rattus norvegicus 5HT3 receptor mRNA, complete cds

表1-2 Down regulateされた遺伝子群

T/C ratio (Low dose)	T/C ratio (High dose)	変化率	GenBank Acc. No.	Gene Name
0.21	0.00	56.33	AF205604	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1) mRNA, complete cds
14.21	0.95	14.94	L22191	Glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase), regulatory
1.11	0.16	6.95	Y00404	Superoxide dimutase I, soluble

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

9. 臓器特異的ハイスループット検出系開発のための網羅的な遺伝子発現解析

研究者 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

本研究では、内分泌かく乱化学物質の各臓器に対する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に、子宮、視床下部を始めとする5種類の臓器を選び、内分泌かく乱化学物質による遺伝子発現変動パターンを網羅的に解析する。本年度は、標準物質として17-β-Estradiol (E₂)を用い、E₂投与により初期に発現が誘導される遺伝子群を同定するため、卵巣摘出マウスへのE₂投与後4時間の各臓器の遺伝子発現パターンを解析した。

A. 研究目的

ホルモンは核内レセプターに結合し遺伝子発現を制御することで作用を現す。内分泌かく乱化学物質が極低用量で作用する場合、外見上の症状には現れずとも、遺伝子発現変動を伴った影響を及ぼす可能性が指摘されており、内分泌かく乱化学物質が引き起こす遺伝子発現変動を網羅的に解析し整理することが求められている。

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反応する臓器において、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、各臓器に対する性ホルモンの影響の有無を評価する遺伝子群として選択、分類する。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。

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℃にて