

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

C. 研究結果

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 (E_2) 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、 E_2 によりエストロジェンレセプターを介して直接発現制御されており、 E_2 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、1 μ g/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。図 1 に、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図2に示す。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。各グループを構成する遺伝子数をまとめ、表1に示した。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。

D. 考察

本年度は、網羅的遺伝子発現変動解析技術の導入と同時に、本テーマの基本となるE₂に

よる遺伝子発現変動の解析を開始した。その結果、ここでは示さなかったが、スライドガラス型のマイクロアレイ解析を実施することも可能となり、Genechip 型のマイクロアレイ解析を実施する体制も整えることができた。今後、主に Genechip システムを用い、さらに多くのデータを得ていくことが可能である。

本年度は、臓器5種類、E₂ 1μg/kg に絞って検討した結果、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要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要な遺伝子群は、エストロゲンレセプターαもしくはβ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。当方では、エストロゲンレセプターαの欠失マウスを利用可能であり、次年度はその発現解析を行い、遺伝子群の選別を行っていく。

また、本年度の研究により候補となりうる

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。本年度はGenechipをMGU74Av2のみに絞ったが、次年度はMGU74Bv2, MGU74Cv2も併用し母数を増やしていく。また、E₂投与後4時間についてのみならず、より初期および後期の変動パターンを調べることで、候補遺伝子群の母数を増やすことが可能である。よって、次年度は投与後1時間および24時間における変動も併せて解析する。

以上により、次年度はまず、E₂ 1μg/kg 投与による各臓器に対するエストロゲン作用を評価しうる遺伝子群の同定を完了する。その後、E₂の投与量を振った検討を実施し、濃度が異なる場合に、化合物が同じなら同様の変動パターンを示すのか否かを含めた解析を行う。E₂による遺伝子発現解析に目途がついた時点で、DES, BPA, NP等の化合物による遺伝子発現変動の解析を実施し、変動パターンから各化合物が引き起こすホルモンかく乱作用を臓器毎に測定可能であるか検討する。

E. 結論

本年度は、本テーマの基本データとなるE₂による各臓器における網羅的遺伝子発現変動データの取得に成功した。このデータを基礎にさ

らに詳細なデータを集め、検討化合物の各臓器におけるホルモンかく乱作用を遺伝子発現パターンから予測可能な試験系として確立していくことを目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

1. 学会発表

ES細胞の分化に及ぼすTCDDの影響。高木篤也、五十嵐勝秀、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

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

Synergistic function of Mesp2 and Paraxis on the vertebral development. Atsuya TAKAGI, Satoshi KITAJIMA, Yu TAKAHASHI, Tohru INOUE , Alan Rawls² and Yumiko SAGA. Somite meetings in Nara, 奈良 2001 年 7 月

Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. Atsuya Takagi, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 21st International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Korea, 2001 年 9 月

3. 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

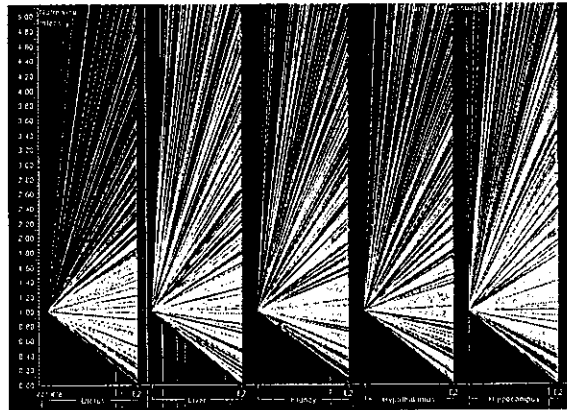


図1 E₂投与後4時間経過後の各臓器における遺伝子発現変動

卵巣摘出後2週間経過した成獣マウスにE₂を1 μ g/kg皮下注射し、4時間経過後に子宮、肝臓、腎臓、視床下部領域、海馬を摘出し、全RNAを調製し、Genechip解析を実施した。コーンオイルを注射した溶媒対照群における遺伝子発現強度を基準に相対的な変動値をグラフにプロットした。

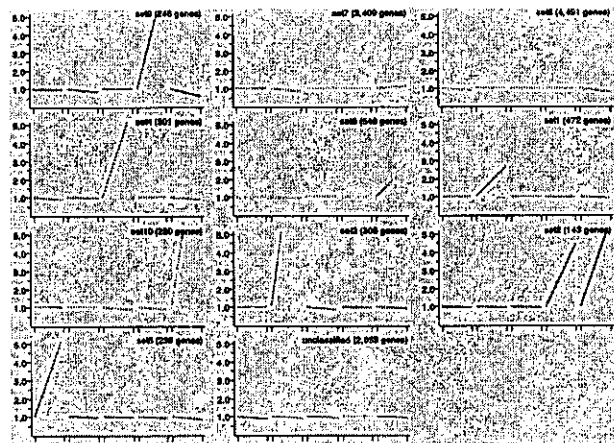


図2 K-means analysis

図1に示したデータを解析ソフトGenespringにてK-meansクラスタ解析にかけた結果を記す。グループ数は10とした。各群は左から子宮、肝臓、腎臓、視床下部、海馬に分かれている。

表1 各臓器に特徴的な変動を示した遺伝子群

臓器	遺伝子数
Uterus	239
Liver	780
Kidney	301
Hypothalamus	246
Hippocampus	380
Hypothalamus & Hippocampus	689
Not changed	9953
Total	12588

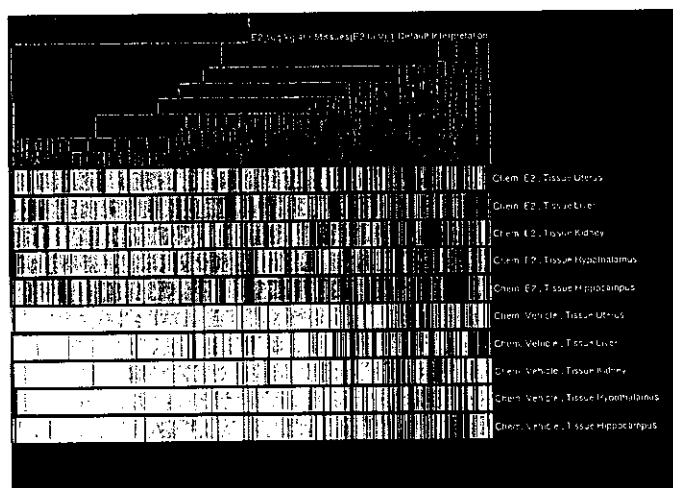


図3 Gene Tree Analysis

図1に示したデータを解析ソフトGenespringにてGene tree解析にか
けた結果を記す。各群は上から子宮、肝臓、腎臓、視床下部、海
馬に分かれている。下方5段はコントロール群。

10. 子宮肥大および Hershberger 試験に関する研究

研究者 今井 清、太田 亮

(財)食品薬品安全センター秦野研究所 特別参事

研究要旨：OECD バリデーションプロトコールに準じて、エチニルエストラジオール (EE) による子宮重量増加の用量依存性を、幼若マウスを用いて実施し、幼若ラットを用いた試験結果と比較検討した。

A. 研究目的

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する。

B. 研究方法

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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、皮下投与は 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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 時間後にベントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、膣開口を観察した後、卵巣、子宮および膣を摘出した。まず、卵巣と膣を切除した後、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。

C. 研究結果

子宮の blotted weight は、経口投与では 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上で、皮下投与では 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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、膣開口の早期化が、経口投与では 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の動物で、皮下投与では 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の動物で観察された。

D. 考察・結論

子宮肥大試験は、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。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 投与群で膣開口の認められる例があったが、同様の所見は 17 β -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思われる。

参考文献

- 1) E. Padilla-Banks, W.N. Jefferson, and R.R. Newbold, The Immature Mouse Is a Suitable Model for Detection of Estrogenicity in the Uterotrophic Bioassay, Environ. Health Perspect. 109:821-826 (2001)
- 2) 和田和義, 私信

F. 健康危険情報

特になし

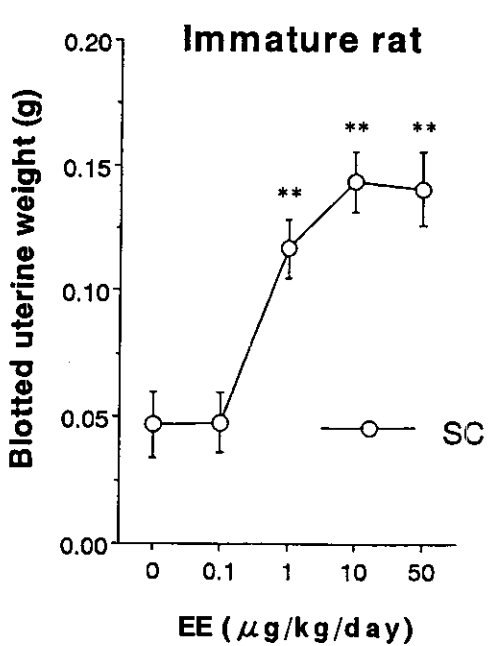
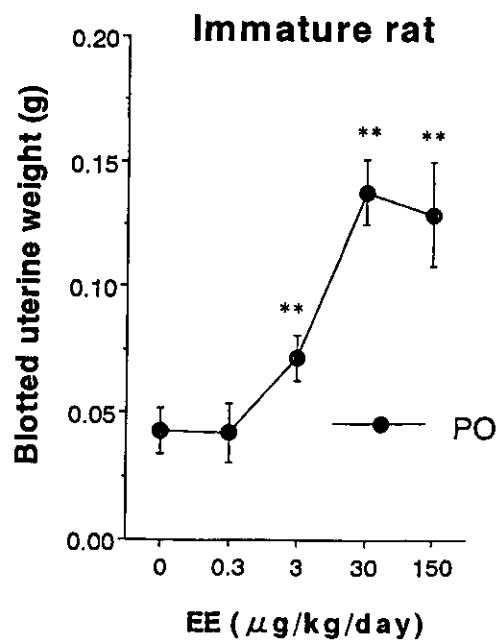
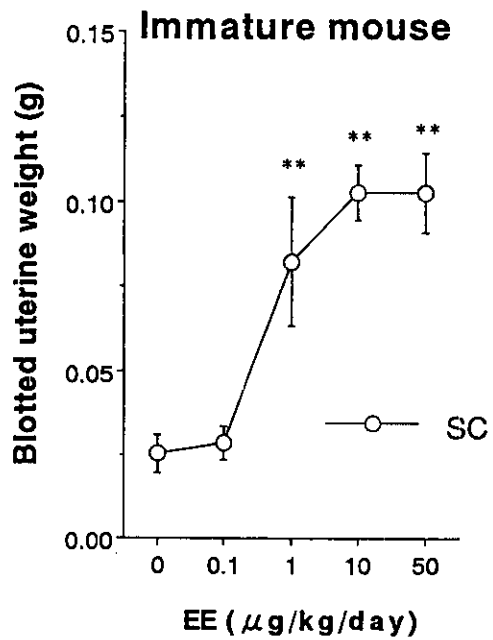
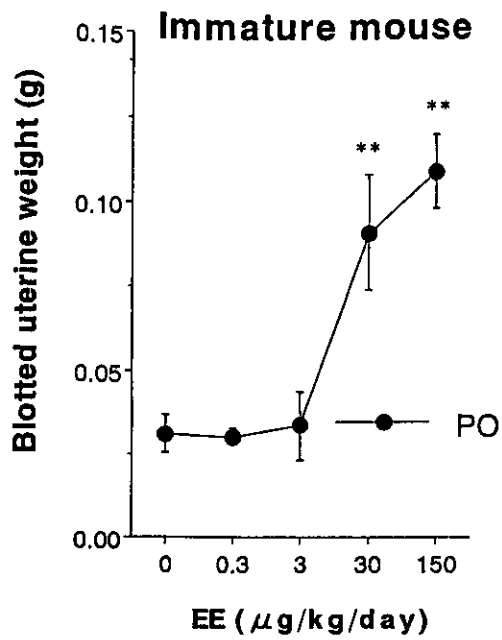
G. 研究発表

1. 書籍

なし

2. 雑誌

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ガー試験、アニテックス、13：304-312, 2001



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

研究者 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

研究要旨：内分泌かく乱化学物質を成熟動物に一定期間投与した時の生体影響を検出する目的で、投与動物の肝臓で発現の変動する遺伝子の網羅的解析に着手した。その予備的な検討として、7週齢の雄性 SD:IGS ラット 5 匹に、ethinylestradiol を 50 µg/kg、雌ラット 5 匹に testosterone propionate を 100 mg/kg、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 を抽出後、CLONTECH Atlas Glass Rat 1.0 Arrays を用いて雌雄各々の無処置動物との間で発現変動を示す遺伝子の解析を行った。その結果、構成的な発現に性差の認められた遺伝子の殆どは、雌で高い発現を示すものであり、検索した遺伝子の約 1/3 を占めていた。しかし、雌雄とも高用量の性ステロイドの投与により肝臓で強い発現変動を示す遺伝子は、今回の 1101 遺伝子の検索では認められず、特にエストロゲン作用を高感度に検出することが期待できる遺伝子は得られなかった。現在、エストロゲン作用検出パラメータの探索を目的として CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 Arrays による 3 千 8 百遺伝子の網羅的発現解析を企画している。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。

A. 研究目的

“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目的として、前年度までの本研究担当課題で、代表的化合物投与例でラット雄特異的に発現する α_2 -globulin の肝・腎における発現量を検索し、いずれもホルモン作用に起因した用量依存性の変動を示さないが、いくつかの物質で低用量投与による肝 mRNA 発現のブレを見出した。

今回は、成熟動物に対して内分泌かく乱化学物質 (EDCs) を一定期間投与した時の生体影響を検出する目的で、肝臓を標的として投与動物で発現の変動する遺伝子を genome wide にスクリーニングする。EDCs の投与により、用量に依存しないで蛋白質発現に反映されない転写産物の発現変動を認める場合、その生物学的な意義を検討することは重要な課題であるが、その前段階として投与に

起因して変動を示す遺伝子群の探索が必要となる。

Microarray 法の技術の確立に伴い、一度に多数の遺伝子の RNA 発現挙動を検出する網羅的解析手法の導入により、遺伝子指標の探索と同時にその用量依存性の検討が可能となり、将来的に変動遺伝子チップのカスタマイズ化も期待される。

3年間を通じた研究計画としては、ethinylestradiol (EE), testosterone propionate (TP) 投与例の他、methoxychlor, nonylphenol, genistein を 28 日間反復経口投与したラット肝臓での RNA 発現解析を microarray 法を用いて行う。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。

B. 研究方法

7週齢の雄性 SD:IGS ラット各群 5 匹に、EE を 50 µg/kg、雌ラットに TP を 100 mg/kg、それぞ

れ2週間にわたり連日強制経口投与した(図1)。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 1.0 Arrays による網羅的な遺伝子発現の検索を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は経口投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はすべてネンプタール深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺したため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

C. 研究結果と考察

今回検索した 1101 遺伝子中、構成的な発現に性差の認められた遺伝子の殆どは、雌で高い発現を示すものであり、検索した遺伝子の約 1/3 を占めていた(表1)。また、雌雄とも高用量の性ステロイドの投与により肝臓で強い発現変動(5倍以上)を示す遺伝子は認められなかった。

雄の 50 µg/kg EE 投与例では、2 倍程度の発現増加する遺伝子が 2 つ得られたのみで、他の遺伝子は発現変動を示さなかった(表2)。一方、雌の 100 mg/kg TP 投与例で発現変動する遺伝子の殆どは低下するものであり、2 倍以上の低下を示すものは 6 個あった。2 倍以上の増加を示すものは 1 個得られたのみであった。更に、雌での TP 投与により、発現低下を示すものの殆どは、雌で構成的に強く発現するものであった。特に、雌で 5 倍以上の発現を示した 10 個のうち 6 個が、TP 投与に反応するものであった。

現在、エストロゲン作用検出パラメータの探索を目的として CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 Arrays による 3 千 8 百遺伝子の網羅的発現解析を企画している。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關与する発現クラスターの同定を進める。

D. 結論

成熟動物に対して EDCs を一定期間投与した時の、肝臓を標的とした網羅的遺伝子発現解析に着手した。その予備的な検討として、雄ラットに対する EE 投与例、雌ラットに対する TP 投与例で CLONTECH Atlas Glass Rat 1.0 Arrays による遺伝子発現の検索を行った。その結果、1101 遺伝子の検索で、エストロゲン作用を高感度に検出することが期待できる遺伝子は得られなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

Okazaki K, Okazaki S, Nishimura S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Nakamura A, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M. A Repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals. Arch Toxicol. 75: 513-521, 2001.

Okazaki K, Imazawa T, Nakamura H, Furukawa F, Nishikawa A, Hirose M. A repeated 28-day toxicity study of 17 α -methyltestosterone in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals. Arch Toxicol 2002, in press.

2. 学会発表

特になし。

F. 知的所有権の取得状況

特になし。

表 1. 構成的な発現量が雌雄で異なる遺伝子数 (/1101 遺伝子)

Fold difference	male > female	female > male
> 2.0	2	333
> 5.0	0	10

表2. 発現量に差の見られた遺伝子のまとめ (> 2.0 or < 0.5)

雌雄での発現量の比較 (雌/雄)	雄EE投与例での発現倍率	雌TP投与例での発現倍率	Gene Name
	0.72		platelet glycoprotein IV (GPIV); GPIIIB; CD36 antigen; fatty acid translocase (FAT); PAS4; adipocyte membrane protein
	1.11		urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form (U-PAR; PLAUR); monocyte activation antigen MO3; CD87 antigen
	1.35		inhibitor of DNA binding 2 (ID2)
	1.00		G2/M-specific cyclin G (CCNG)
	0.77		fos-related antigen 1 (FRA1); fos-like antigen 1 (FOSL1)
	0.60		cytochrome P450 51 (CYP51); CYPL1; P450-14 DM; sterol 14-alpha demethylase; lanosterol 14-alpha demethylase (LDM)
	1.28		sodium/dicarboxylate cotransporter
	0.63		cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase; HMGCS1); 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase
	0.96		2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase; UDP-galactose-ceramide galactosyltransferase; ceramide UDP-galactosyltransferase; cerebroside synthase
	1.20		phosphatidate phosphohydrolase type 2
	0.68		67-kDa glutamic acid decarboxylase (GAD67); GAD1
	0.94		11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2
	0.98		heparin-binding growth associated protein
	1.04		calretinin
		1.04	SHPS-1 receptor-like protein with SH2 binding site
		1.18	ADP-ribosylation factor 2
	0.96		granzyme M (GZMM); MET-ASE; natural killer cell granular protease; RNK-MET-1

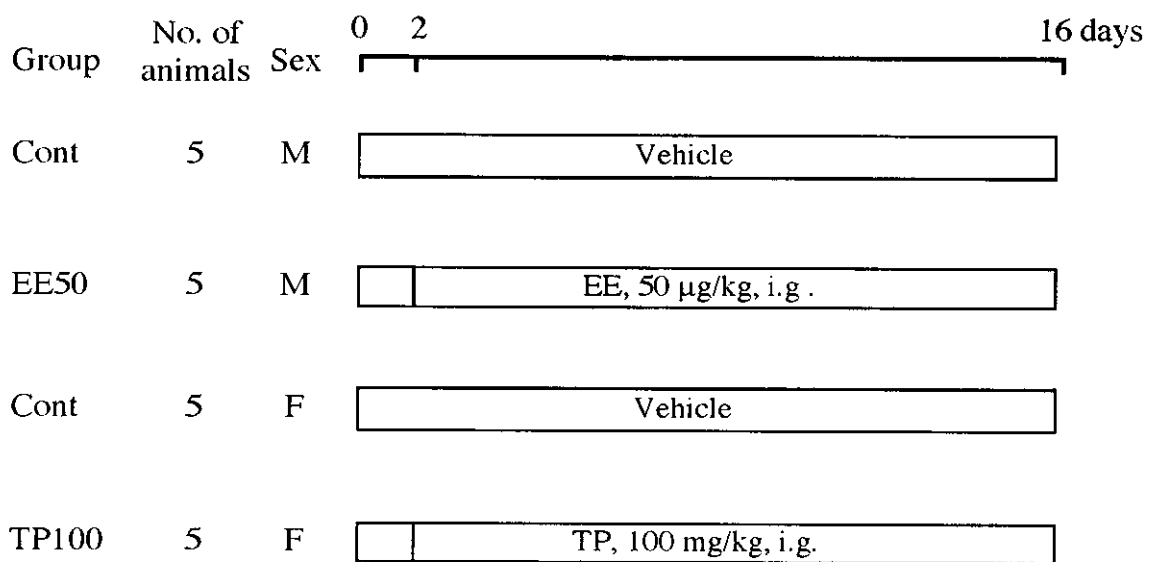
雌雄で発現差無し (2倍以下)

雌で2倍以上発現増加

雌で5倍以上発現増加

投与例で2倍以上の発現低下

投与例で2倍以上の発現増加



EE: Ethinylestradiol
 TP: Testosterone propionate
 Vehicle: Corn oil

図 1. 実験デザイン

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

研究者 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

研究要旨

医薬品や、農薬、工業用化学物質のなかには内分泌ホルモン様の生体作用を持つ物質が少なくないことが既に明らかにされており、化学物質の性ホルモンに関係した生殖機能障害等の影響が懸念されている。こうした作用を持った物質のスクリーニング法の一つとして酵母を用いたステロイド受容体応答試験がある。本法はEPAの内分泌かく乱化学物質のスクリーニング計画にも取り上げられており、安価で簡便に行える方法であると考えられるので、本法をとりあげ技術移転普及を図る目的で、試験法のビデオ作製を試みた。

A. 研究目的

性ステロイドホルモン受容体に作用する物質の作用のスクリーニングのためには、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) を導入した応答試験系がある。この系は、検出にかかる時間が短く、感度が高いことから、多種類の化学物質を様々な濃度で短期間に測定することが容易である。また、より哺乳類に近い条件での分析を可能にして

いるとされているツウハイブリッド法についても取り上げ、技術移転普及を図る目的で、試験法のビデオ作製を試みた。

B. 研究方法

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。ハイスループッ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ている。

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。

C. 研究結果

平成 14 年 3 月 28 日（木）ビデオ撮影が終了した。

(4) 〈確定試験等開発研究〉

13. 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
— 継世代試験の改良 —

研究者 長尾 哲二、斉藤義明、臼見憲司
(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
室長

研究要旨：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にかつ短期に検出できる指標となり得るか結論するために、まず今年度はマウス胎児に DES を経胎盤的に暴露し、生殖巣の形態変化を組織学的に観察した。その結果対照群の生殖巣と比較して間質細胞に多数の脂肪滴の存在を認めた。さらにグリコーゲンの蓄積も観察されたことから、DES 投与後に胎児生殖巣に生じた初期変化を組織変化として捉えることが可能であった。

A. 研究目的

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にかつ短期に検出できる指標となり得るかを結論する。

B. 研究方法

ICR マウスの妊娠 10-13 日(産栓発見日=妊娠 0 日)に、ジエチルスチルベストロール (DES) の 100 µg/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 hcl2 発現を免疫組織学的に予備的に検討した。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、秦野研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応をとった。

C. 研究結果

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。生殖巣には、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。

生殖巣における HSP70 および hcl2 蛋白の局在については現在観察中である

D. 考察

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。

E. 結論

DES の妊娠期曝露後、胎児の生殖巣に生じた初期変化は、組織学的に観察することが可能であった。したがって今後、この初期生殖巣変化が成熟後の生殖器官の形態的变化あるいは生殖機能変化といかに関連するかを調べ、さらに DES 以外の合成ホルモンあるいは内分泌かく乱化学物質についても同様に検討することにより、生殖巣の初期形態変化が内分泌かく乱化学物質曝露による adverse な変化であると結論できる。

F. 研究発表

1. 論文発表 (2000-2002)

Nagao T., Ohta R., Marumo H., Shindo T., Yoshimura S., Ono H. Effects of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod. Toxicol.*, **14**: 513-532 (2000).

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Ono H. Effects of prenatal and postnatal exposure to styrene dimers and trimers on reproductive function in rats. *Reprod. Toxicol.*, **14**: 403-415 (2000).

Nagao T., Fujikawa K. Two-generation approach to evaluate the reproductive effects of the environmental estrogens, butyl benzyl phthalate and nonylphenol. *Cong. Anom.*, **40**: S121-S127 (2000).

長尾哲二 内分泌攪乱物質の次世代の発生・生殖への影響 治療学 **34**: 29-33 (2000).

Nagao T., Saito Y., Usumi K., Nakagomi M., Yoshimura S., Ono H. Disruption of the reproductive system and reproductive function by administration of nonylphenol to newborn rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **19**: 284-296 (2000).

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

Nagao T., Saito Y., Yoshimura S. Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C. *Teratology* **61**: 248-261 (2000).

Nagao T., Yoshimura S. Oral administration of clomiphene to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **21**: 213-221 (2001).

Nakagomi M., Suzuki E., Usumi K., Saito Y., Yoshimura S., Nagao T., Ono H. Effects of endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **21**: 453-462 (2001).

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usumi K., Ono H. Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to *p*-octylphenol. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 683-692 (2001).

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usumi K., Ono H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure

to genistein. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 399-411 (2001).

Nagao T., Wada K., Marumo H., Yoshimura S., Ono H. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 293-315 (2001).

Kuwagata M., Saito Y., Usumi K., Ono H., Nagao T. Disruption of brain development in male rats exposed prenatally to 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Cong. Anom.*, **41**: 312-320 (2002).

Kuwagata M., Yoshimura S., Nagao T. Reproductive effects of early neonatal exposure to genistein in Wistar rats. *Cong. Anom.*, **41**: 338-339 (2002).

Nagao T., Saito Y., Usumi K., Yoshimura S., Ono H. Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile or embryonic stage. *Reprod. Toxicol.*, in press.

Nagao T., Yoshimura S., Totsuka Y., Wakabayashi K. Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline. *Human Exp. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表 (2000-2002)

桑形麻樹子、松本亜紀、長尾哲二、赤堀文昭、小野 宏：BrdU を胎生期に曝露した雄ラットの行動薬理的検討 第 27 回日本トキシコロジー学会 (横浜) 2000.

桑形麻樹子、斎藤義明、臼見憲司、松本亜紀、長尾哲二：胎生期に BrdU 曝露した雄ラットの行動異常—行動薬理的検討— 第 40 回日本先天異常学会 (島根) 2000.

小野 宏、長尾哲二、小島幸一：繁殖影響、体内動態等に関する調査研究 平成 10 年度厚生科学研究生活安全総合研究成果報告会 (東京) 2000.

長尾哲二、斎藤義明、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 (島根) 2000.

長尾哲二：性腺障害を介さない生殖毒性の発現機構 第 27 回日本トキシコロジー学会ワークショップ (横浜) 2000

3. 実用新案登録
なし

Nagao T.: Reproductive and Developmental Effects of Dioxins and Endocrine Disrupters. Two-generation Study to Evaluate the Effects of Butyl Benzyl Phthalate or Nonylphenol on Reproduction in Rats. 6th Scientific Meeting of the International Federation of Teratology Society. Satellite Symposium in Hiroshima. (Hiroshima) 2000.

中込まどか、鈴木恵真子、斉藤義明、臼見憲司、吉村慎介、長尾哲二：内分泌攪乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響 第3回日本内分泌攪乱化学物質学会（横浜）2000.

Shibuya T., Kashima T., Saito Y., Nagao T., Imai K., Ono H.: Induction of mutation and apoptosis in mouse primordial germ cells by ENU. 39th Annual meeting, Society of Toxicology, U.S.A. 2000. Toxicologist 54 (1): 117.

Nagao T.: Post-implantation embryo malformations. 2nd International Meeting on Male Mediated Developmental Toxicity. Montreal, Canada. 2001.

桑形麻樹子、渡辺千朗、臼見憲司、斉藤義明、長尾哲二：胎生期 BrdU 曝露による雄出生児の生殖障害 — 脳の形態変化 — 第41回日本先天異常学会（横浜）2001.

Kuwagata M., Muneoka K., Nagao T., Ono H., Takigawa M.: Behavior and neurochemical evidence of the dopaminergic and serotonergic dysregulation in male rats exposed to 5-bromo-2'-deoxyuridine in utero: A possible model of hyperactivity disorder. 2001年国際薬理学会広島会議（広島）2001.

Kuwagata M., Muneoka K., Takigawa M., Nagao T., Ono H.: Dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in adulthood in prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine. 14th Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Sydney, 2002.

G. 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

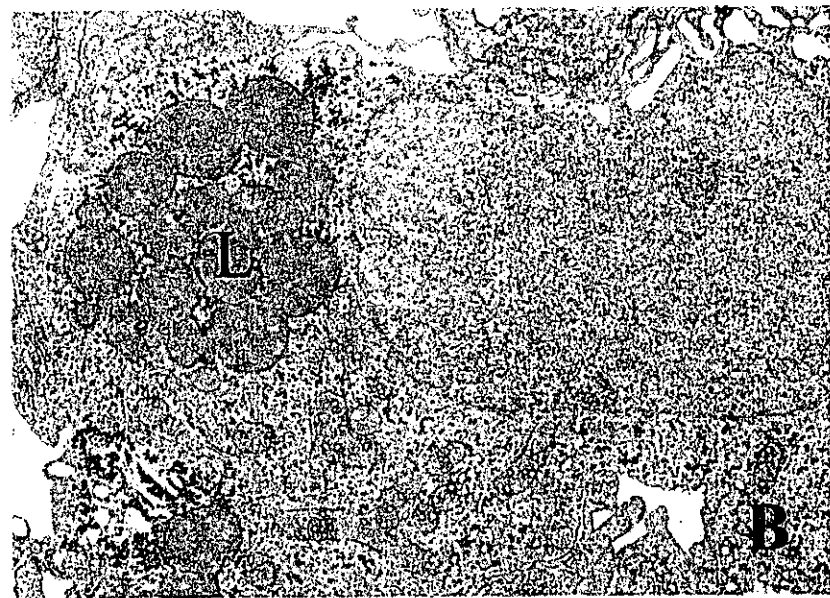
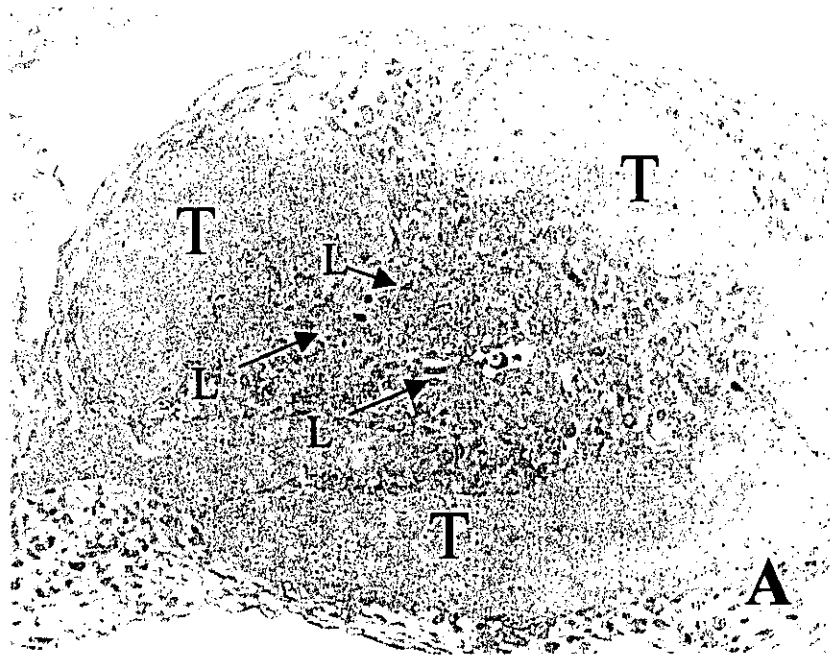


Fig. 1 DESを暴露した胎生14日マウス胎児の生殖巣
 T, 生殖索 L, 脂肪滴 G, グリコーゲン