

2. マイクロアレイ法の基盤技術調査

研究者 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

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によるものから、より絶対的なスケールで実施することを可能とするために、スパイク RNA を用いた測定系の開発を行い、利用の用途をつけた。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脳と肝臓の 2 臓器を選び、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うることを確認した。この検量線とスパイク RNA を用いた測定系を組み合わせることにより、GeneChip の version up 等、プローブ配列の変更にも対応することができると考えられる。

A. 研究目的

DNA マイクロアレイ技術は一回のハイブリダイゼーションで数万の遺伝子の発現を測定できる革命的な技術であり、内分泌かく乱化学物質研究に大きく貢献するものと期待されている。しかし、DNA マイクロアレイ技術は発展途上の技術であり、多数のプラットフォームが混在するなど課題も多い。本研究では、DNA マイクロアレイ技術を本班に導入し、有効利用するためデータ測定システムの開発も含めた基盤技術調査研究を実施する。

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°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、1µg 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 Glassarray1.0 : 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 DNA 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 pBluescriptIII 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・定量的ための定量 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 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、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イクス社の 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。溶媒対象にはコーン油を用いた。

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、各研究所の実

験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、特に国立衛研はそのモデル施設となっている。本研究を構成する分担研究者には、米国において AAALAC の GLP 承認国立研究機関における研究歴を有する経験者を複数名含んでおり、実験における倫理面での配慮に明るい。

C. 研究結果

DNA 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ことも問題である。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 を組織中の細胞数に対応する

量に応じて添加し、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。細胞数に対応する量としては、組織重量および DNA 量を選び検討した。この目的のためには DNA 量を RNA 抽出前の組織破碎液を用いて正確に測定することが必要となる。いくつかの測定法を検討した結果、再現性良く DNA 量を測定できる方法を開発し、利用の目途をつけた。

次に、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。

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について、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 17β -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が、GeneChip の測定データの信頼性は他の研究機関から報告されており、クロンテック社のガラスアレイデータに問題がある可能性がある。今回ガラスアレイデータを得るために、TSA 法を用いたシグナル増幅を行った。その結果、シグナルは増幅されたもののデータの正確性を欠いた可能性がある。また、クロンテック社のハイブリバッファーにもデータの正確性を欠く原因があるとの情報(東大先端研・油谷教授より)もあり、今回の比較結果が cDNA マイクロアレイプラットフォームの全てを否定するものではないと考えている。

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 中対象遺伝子における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) の検討において低い濃度で加えた

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

ルについて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。

本研究における検討により、網羅的遺伝子発現パターンが異なる臓器由来の RNA を混合して用いることで、多数の遺伝子に関する検量線を作成できることがわかった。この事実を応用すると、遺伝子プローブの配列変更等を伴うチップの version up が行われても検量線同士を比較することでデータの変換が可能になると考えられる。スパイク RNA を併用し、得られるデータの信頼性を確保することも重要であり、今後の検討が必要である。

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なった。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。

E. 結論

本年度までの検討により、DNA マイクロアレイ、特に Affymetrix 社の GeneChip システムを用いた遺伝子発現絶対量の網羅的測定を可能とするスパイク RNA システムの利用に目途がついた。今後は、このスパイク RNA システムと多数遺伝子に関する検量線を組み合わせ、遺伝子プローブ配列の変更を伴う version up への対応および異なるプラットフォーム間のデータ互換の確保を行っていく必要がある。これにより、DNA マイクロアレイ技術の発展にも対応可能なデ

ータ取得システムを確保できると考えられる。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercaptomethylbenzimidazoles, by repeated oral administration to rats. Food and Chemical Toxicology, 37. (1999), M.Saitoh, T Umemura, Y Kawasaki, J Momma, Y Matsushima, K Sakemi, K Isama, S Kitajima, Y Ogawa, R Hasegawa, T Suzuki, M Hayashi, T Inoue, Y Ohno, T Sofuni, Y Kurokawa and M Tsuda.
- 2) 内分泌攪乱化学物質の研究、ファルマシア (日本薬学会)、Vol.35、1999 年、松島裕子
- 3) 子宮肥大試験-卵巣摘出法、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 (株)、2000 年 9 月 19 日、松島裕子
- 4) Toxicity Study of a Rubber Antioxidant, 2-Mercaptobenzimidazole, by Repeated Oral Administration to Rat, The Journal of Toxicological Sciences, 23, 1998, Yasushi Kawasaki, Takashi Umemura, Minoru Saito, Junko Momma, Yuko Matsushima, Hiromi Sekiguchi, Mami Matsumoto, Kazue Sakemi, Kazuo Isama, Tohru Inoue, Yuji Kurokawa and Misuhiro Tsuda

- | | |
|--|-------------------|
| 2. 学会発表 | 特になし |
| 1) 卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた
農薬 <i>o,p'</i> -DDT と Methoxychlor エストロ
ゲン様作用の検討、環境ホルモン学会第
5 回研究発表会、平成 14 年 11 月 25, 26
日 (2002)、 <u>松島裕子</u> 、井上 達、菅野 純 | 2. 実用新案登録
特になし |
| 2) 子宮肥大の特性について、第 28 回日本
トキシコロジー学会学術年会、平成 13
年 6 月 10~12 日 (2001)、 <u>松島裕子</u> 、井
上 達、菅野 純 | 3. その他
特になし |
| 3) 卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯
竭期間と子宮肥大反応の関係について、
日本内分泌攪乱化学物質学会、第 2 回、
平成 11 年 12 月 9, 10 日 (1999) <u>松島裕
子</u> 、菅野 純、宮城恵理、井上 達 | |
| 4) 17 β -estradiol 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-、日本内分泌攪乱化学物質学
会 (環境ホルモン学会)、横浜、第 3 回、
2000 年、 <u>松島裕子</u> 、井上 達、菅野 純 | |
| 5) 内分泌かく乱物質の短期 <i>in vivo</i> 試験系
について、日本内分泌攪乱化学物質学会
研究会、第一回、
<u>菅野 純</u> 、山本雅也、 <u>松島裕子</u> 、西岡暢
彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon | |
| 6) 内分泌攪乱化学物質の高感度検出系とし
ての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応
性の経時的変化、日本疾患モデル学会総
会、1998 年 11 月 27, 28 日、宮城恵理、
<u>松島裕子</u> 、平林容子、井上 達、菅野 純 | |

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

1. 特許取得

(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

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

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、Affymetrix 社の Gene Chip を用いて DES により影響を受ける遺伝子の検索を行った。また、エストロゲン様物質による作用を形態学的に検出可能な ES 細胞の培養条件の検討を行った。

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、内分泌かく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阻害や膈上皮の扁平上皮化・嚢腫等の種々

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、EB における遺伝子発現に対する DES 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 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 EB 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。具体的には、1nM の DES 添加 4 日後の浮遊培養により形成された EB および、4 日培養 EB に 1nM の DES を添加し、24 時間後における遺伝子レベルの変化を約 12000 遺伝子を調べることが可能な Affymetrix 社の Gene Chip を用いて検索を行った。また、エストロゲン様物質による EB に対する作用を形態学的に検出することを目指し、ES 細胞の培養条件について種々の検討を行った。

C. 研究結果

DES 添加 4 日培養で、Affymetrix 社の GeneChip を用いての解析結果 (N=1) から DES 添加 4 日後で 2 倍以上の増加が見られたのは 10 遺伝子、0.5 倍以下に減少したのは 19 遺伝子、DES 添加 24 時間後で 2 倍以上増加したのは 37 遺伝子、0.5 倍以下に減少したのは 12 遺伝子という結果で、最高に増加したのも約 3 倍であった。さらに、4 日培養 EB に DES を添加し、24 時間後における遺伝子レベルの変化を解析した結果 (N=3)、複数の遺伝子の変化が観察されたが、3 回の解析で同様の遺伝子変化を示すものをみ出すことが出来なかった。一方、エストロゲン様物質による EB に対する作用を形態学的に検出することを目指し、種々の培養条件を検討した結果、抗エストロゲン薬の ICI182,780 を 4 日培養 EB に 1 μ M の濃度で添加し、5 日間培養したところ、対照に比較して大きさの減少傾向が認められた。

D. 考察

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、本研究では主として遺伝子発現の観点から解析を行った。今回、約 12000 遺伝子を検出出来る Affymetrix 社の Gene Chip を用いて検索を行った結果、DES 添加 4 日後で 2 倍以上の増加が見られたのは 10 遺伝子、0.5 倍以下に減少したのは 19 遺伝子であった。また、4 日培養 EB に DES を添加し、24 時間後における遺伝子レベルの変化を解析した結果 (N=3)、複数の遺伝子の変化が観察されたが、3 回の解析で同様の遺伝子変化を示すものをみ出すことが出来なかった。前年のマイクロアレイ及び定量 PCR の解析結果より、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、Ets-2 に関しては 24 時間添加の 1 例で約 1.5 倍程度の増加が見られたが、他の回及び、4 日培養では変化は見られなかった。そこで、エストロゲン様物質で EB の形態学的変化をもたらす実験条件を樹立後、その条件下で細胞を培養、遺伝子解析を進めるというストラテジーを新たに採用し、培養条件の種々の検討を行った。その結果、抗エストロゲン薬の ICI182,780 の添加により 5 日間培養したところ、対照に比較して大きさの減少傾向が認められた。この作用が、抗エストロゲン作用によるものかは、現時点では明らかで無いが、この培養条件が EB の形態形成に対するエストロゲン作用の影響解析に適していることが考察された。

E. 結論

EB4日培養群並びに、4日間培養EBにDES添加24時間培養群を用いてマイクロアレイ解析を行ったが、明確な変動を示すと思われる遺伝子を明らかにすることは出来なかった。一方、抗エストロゲン物質の一つがEBのサイズの増大を阻害する可能性が示唆された。

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., 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細胞の遺伝子発現に及ぼすTCDDの影響。高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、金子豊蔵、井上達、第29回日本トキシコロジー学会学術年会、東京2002年6月
2. Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls (PCTs) on the development of cleft palate in mouse embryos. Atsuya Takagi, Toyozo Kaneko, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 22nd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Spain, 2002年8月
3. Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. TAKAGI, A., MATSUDA, N., KANEKO, T., KANNO, J. and INOUE T., USA, 2002年6月

II. 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 試験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

研究要旨

エストロゲン様物質が遺伝子発現に及ぼす影響を *in vivo* で評価するための指標として、内因性のエストロゲン応答遺伝子に着目した。幼若雌性ラットに代表的なエストロゲンレセプターアゴニストであるエチニルエストラジオールを単回強制経口投与し、投与後のエストロゲン応答遺伝子 (complement C3, estrogen-responsive finger protein (efp), cyclin D1) の経時的変化を real-time RT-PCR 法で比較し、その応答性を評価した。

A. 研究目的

子宮肥大試験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様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

19 日齢の雌性 Crj:CD (SD) IGS ラットにエチニルエストラジオール (EE: 0.003 mg/kg) あるいは溶媒 (1%エタノール含有コーン油) を単回強制経口投与した。投与後 1, 3, 6, 12, 24 および 48 時間に CO₂ 麻酔下で子宮、膈および卵巣を摘出し、各器官重量および子宮内液重量を測定後、RNAlater 中で保存した。また、19 日齢の無処置動物 (投与後 0 時間) から CO₂ 麻酔下で子宮、膈および卵巣を摘出し、重量測定後、RNAlater 中で保存した。動物数は、各群 5 匹とした。

子宮は自動サンプル調製装置 (Twist Crusher HMX-2000, TOYOBO) を用いてホモジナイズし、自動核酸抽出システム

(MagExtractor System MFX-2000, TOYOBO) で total RNA を抽出した後、DNase I 処理を行った。

子宮におけるエストロゲン応答遺伝子 (complement C3, estrogen-responsive finger protein (efp), cyclin D1) の発現量は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いた real-time RT-PCR 法により評価した。GAPDH 遺伝子を内在性コントロールとし、標的遺伝子の相対的発現量を測定した。標的遺伝子の PCR Primer および TaqMan probe の配列は、Primer Express ソフトウェアを用いて検索した。

各エンドポイントについて、同時間帯の溶媒群に対する統計学的有意性を安全性試験システム (MiTOX, 三井造船システム技研 (株)) を用いて解析した。F 検定を行い、等分散性が認められた場合は Student の *t* 検定、等分散性が認められなかった場合は Aspin-Welch の *t* 検定を行った。いずれの場合も、有意水準は両側 5% とした。計量データの集計値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

(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

1. 子宮重量

EE 0.003 mg/kg 群の子宮重量 (内液なし) では、投与後 6~48 時間の間で統計学的に有意な増加が認められた。子宮重量の増加

のピークにあたる投与後24時間のEE 0.003 mg/kg 群の子宮重量は、溶媒群の1.9倍であった。

2. 子宮内液重量

EE 0.003 mg/kg 群の子宮内液重量では、投与後48時間で統計学的に有意な増加が認められた。溶媒群に対する割合は、1.5倍であった。

3. 膈重量

EE 0.003 mg/kg 群の膈重量では、投与後12～48時間の間で統計学的に有意な増加が認められた。膈重量の増加は、投与後24時間以降はほぼプラトーに達し、膈重量の増加のピークにあたる投与後48時間のEE 0.003 mg/kg 群の膈重量は、溶媒群の1.7倍であった。

4. 卵巣重量

EE 0.003 mg/kg 群の卵巣重量では、いずれの時間帯でも統計学的に有意な影響は認められなかった。

5. 子宮における complement C3 mRNA 発現量

EE 0.003 mg/kg 群の子宮における complement C3 mRNA 発現量では、投与後24～48時間の間で統計学的に有意な増加が認められた。complement C3 mRNA 発現量は、投与後24時間には溶媒群の20倍になり、投与後48時間には溶媒群の55倍に増加した。

6. 子宮における efp mRNA 発現量

EE 0.003 mg/kg 群の子宮における efp mRNA 発現量では、投与後6～24時間の間で統計学的に有意な抑制が認められた。しかし、投与後48時間には溶媒群のレベルまで回復した。溶媒群に対する割合は、投与後6時間で0.26倍、投与後12時間で0.11倍および投与後24時間で0.38倍であった。

7. 子宮における cyclin D1 mRNA 発現量

EE 0.003 mg/kg 群の子宮における cyclin D1 mRNA 発現量では、投与後6～48時間の間で統計学的に有意な抑制が認められた。溶媒群に対する割合は、投与後6時間で0.39倍、投与後12時間で0.17倍、投与後24時間

で0.19倍および投与後48時間で0.66倍であった。

D. 考察

前年度の実験において、幼若雌性ラットにEEを0.003 mg/kgの用量で19日齢から21日齢まで3日間反復で強制経口投与し、22日齢時に摘出した子宮について重量および complement C3 mRNA 量を測定した。その結果、溶媒群に対して、子宮重量は3倍、complement C3 mRNA 量は85倍に増加した。

本年度は、19日齢の幼若雌性ラットにEEを0.003 mg/kgの用量で単回強制経口投与した。溶媒群の子宮、膈および卵巣重量は、いずれの時間帯でもほぼ一定の値を示した。EE 0.003 mg/kg 群では、子宮重量（投与後6～48時間）および膈重量（投与後12～48時間）で有意な増加が認められた。卵巣では、重量に対する影響は認められなかった。子宮における complement C3 mRNA 発現量は、溶媒群ではいずれの時間帯でもほぼ一定の値を示した。しかし、EE 群では、投与後24時間から complement C3 mRNA 発現量の著しい増加がみられ、投与後48時間まで増加し続けた。efp mRNA の発現は、投与後6～24時間で抑制されたが、投与後48時間には溶媒群のレベルまで回復した。cyclin D1 mRNA の発現は、投与後6～48時間の間で抑制されたままであった。

本実験において評価したエストロゲン応答遺伝子は、いずれも誘導遺伝子のカテゴリーに入るものである。しかし、EEを単回経口投与された幼若雌性ラットでは、子宮重量の増加のピークにあたる投与後24時間において、complement C3 mRNA の発現は誘導されるが、efp mRNA および cyclin D1 mRNA の発現は逆に抑制されることが明らかとなった。

E. 結論

幼若雌性ラットの子宮におけるエストロ

ジェン応答遺伝子は、単回投与でも誘導または抑制されることが明らかとなった。本実験条件下において、EEを単回強制経口投与後、有用な情報が最も多く得られた時間帯は、投与後24時間であった。次年度は、本年度の実験条件をもとに、単独投与では子宮が肥大しない用量での複合効果について、エストロゲン応答遺伝子を指標とした検討を実施する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 去勢成熟ラットの前立腺腹葉におけるアポトーシスを指標とした *in vivo* 抗アン

ドロジェン活性評価系の検討

片山誠一，成見香瑞範，岡村隆之，永井賢司

第 27 回日本トキシコロジー学会学術年会
(2000 年)

2) Linuron 投与によるラット前立腺腹葉におけるアポトーシスの誘導

片山誠一，成見香瑞範，岡村隆之，永井賢司

第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会
(2001 年)

3) 幼若雌性ラットを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化

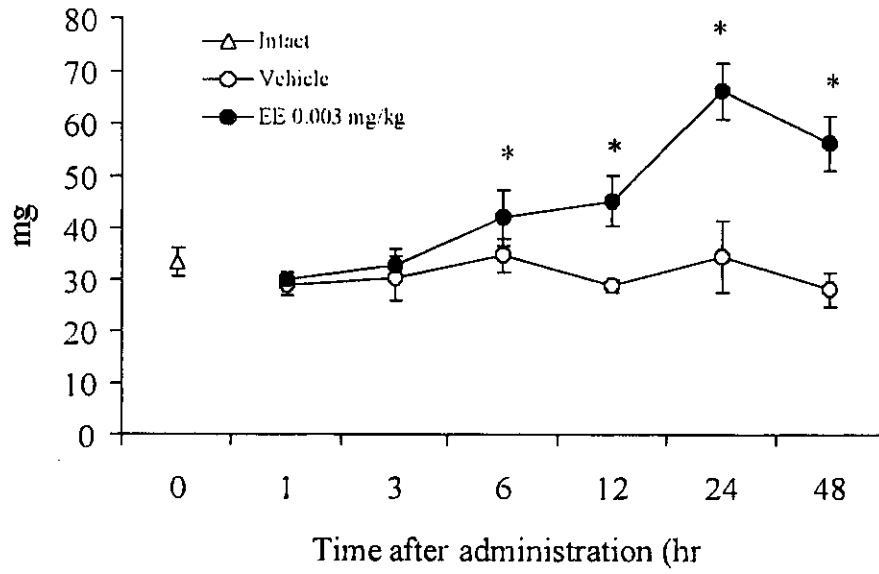
片山誠一，岡村隆之，永井賢司

第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会
(2002 年)

H. 知的財産所有権の出願，登録状況

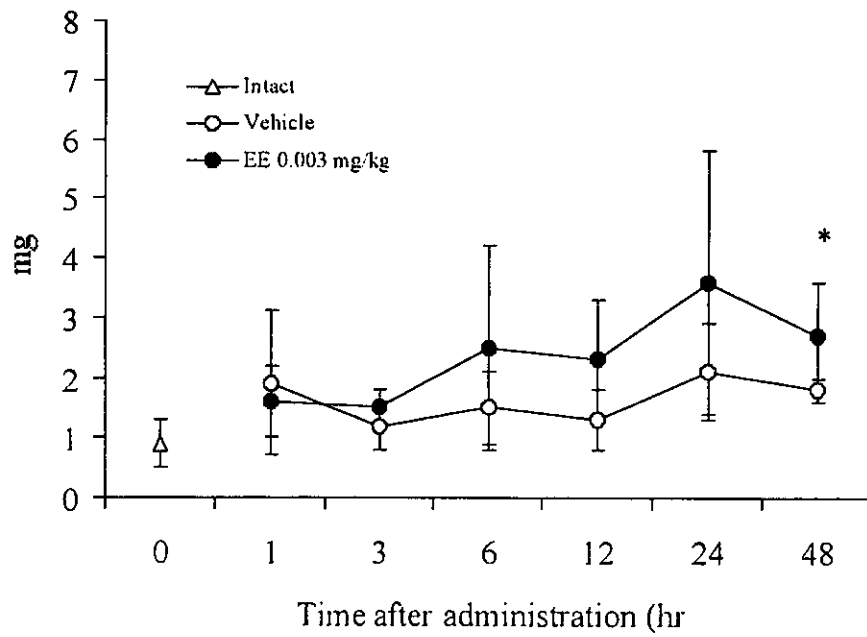
なし。

Uterine weight (botted)



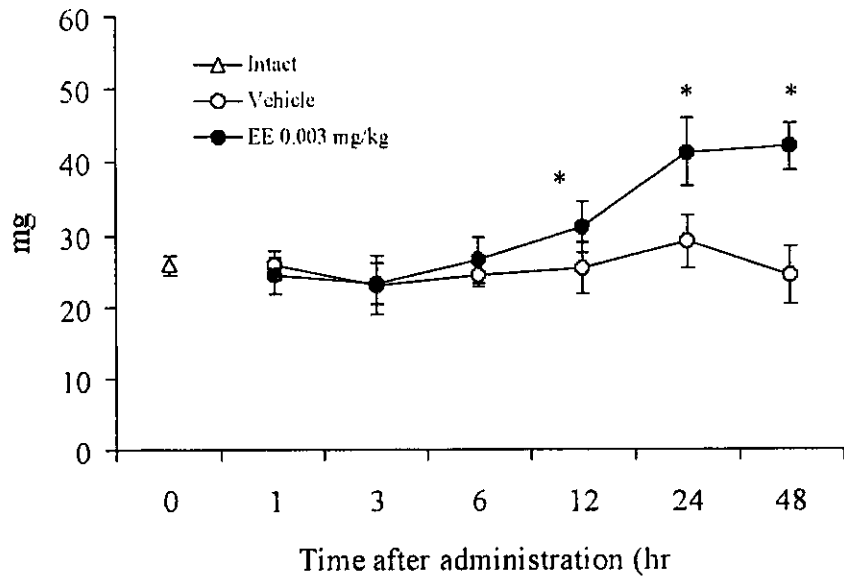
Mean \pm S.D., n = 5, *: p < 0.05

Uterine fluid weight



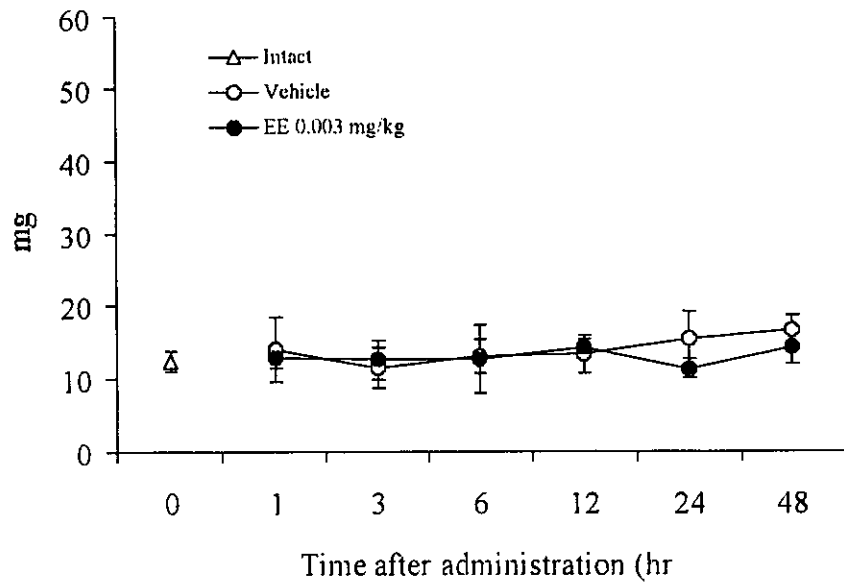
Mean \pm S.D., n = 5, *: p < 0.05

Vaginal weight



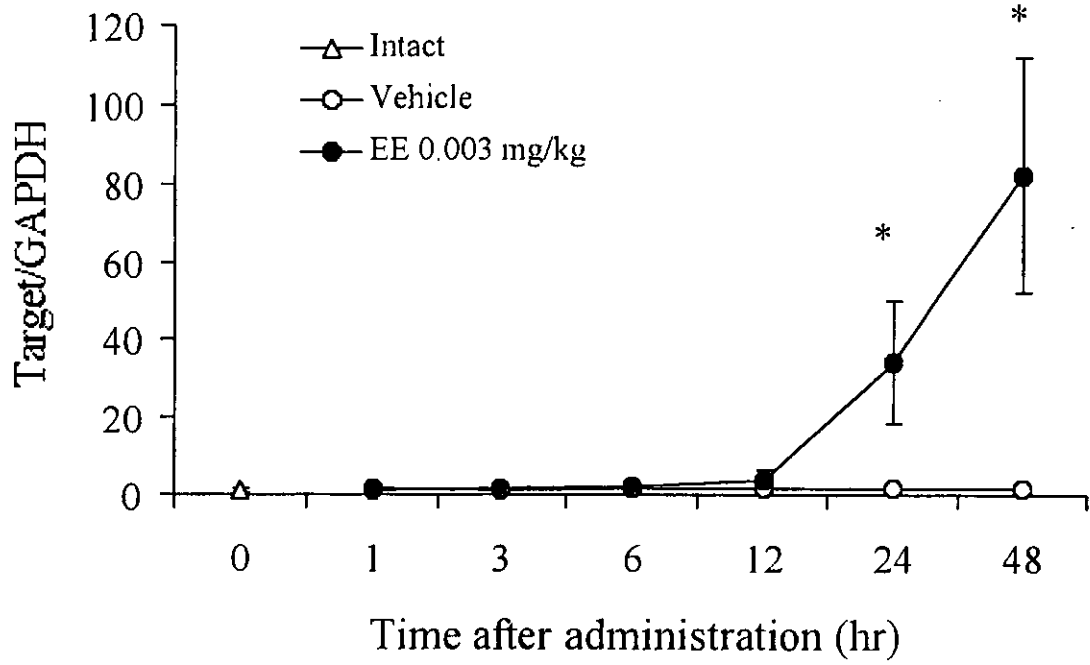
Mean \pm S.D., n = 5, *: p < 0.05

Ovaries weight

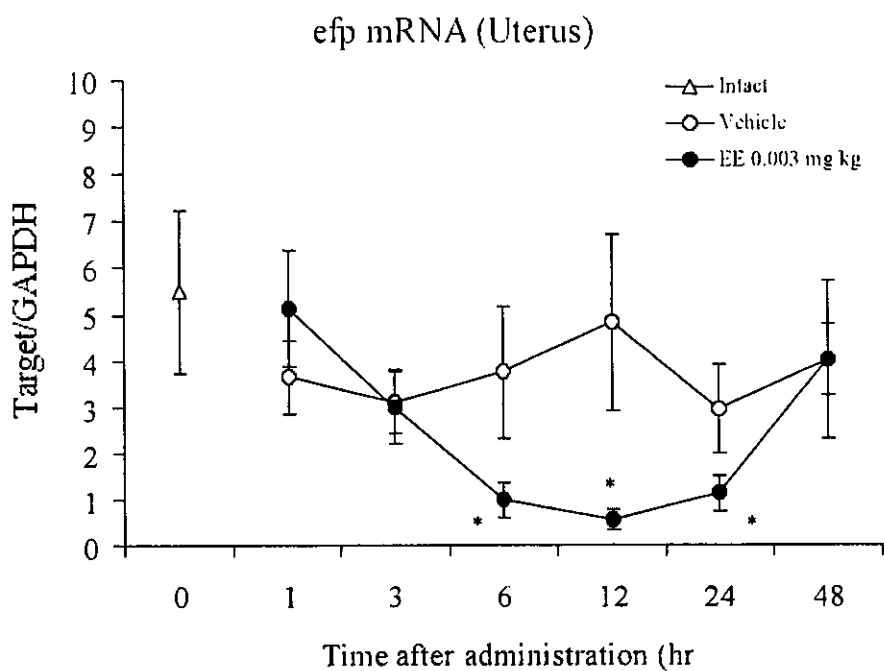


Mean \pm S.D., n = 5, *: p < 0.05

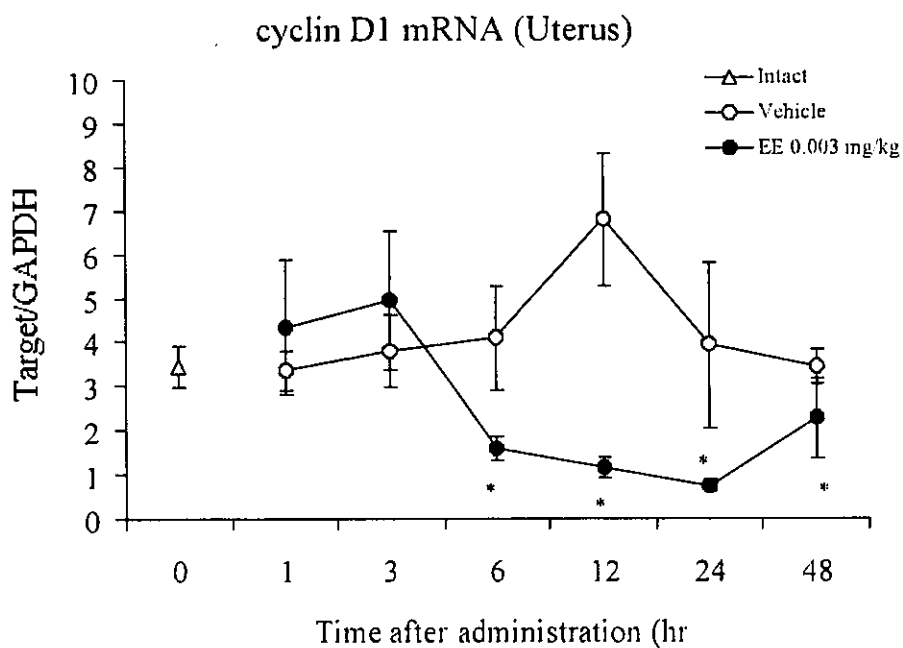
complement C3 mRNA (Uterus)



Mean \pm S.D., n = 5, *: p < 0.05



Mean \pm S.D., n = 5, *: p < 0.05



Mean \pm S.D., n = 5, *: p < 0.05

幼若雌性ラットの子宮におけるエストロゲン応答遺伝子の発現
に及ぼすエチニルエストラジオールの影響

投与後 時間 (hr)	子宮 重量	子宮内液 重量	膈 重量	卵巣 重量	C3 mRNA	efp mRNA	cyclin D1 mRNA
1	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
6	▲	-	-	-	-	▽	▽
12	▲	-	▲	-	-	▽	▽
24	▲	-	▲	-	▲	▽	▽
48	▲	▲	▲	-	▲	-	▽

▲ : 有意に増加 ($p < 0.05$) , ▽ : 有意に減少 ($p < 0.05$)

C3 : complement C3, efp : estrogen-responsive finger protein

4. 国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握および解決策の検討 研究者 永井 賢司 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

研究要旨

子宮肥大試験に関するデータを OECD Validation phase 1,2 の結果を中心に整理し、問題点の抽出ならびに解決策を検討した。

A. 研究目的

子宮肥大試験には未成熟動物を用いる方法と卵巣摘出成熟動物を用いる方法とがある。1930年代より実施されて以来膨大な報告があるが、これらを整理することにより、本試験法の問題点を抽出し、その解決策を検討する。

B. 研究方法

子宮肥大試験については、これまで膨大な報告がなされているが、試験に用いる動物種、週齢、投与経路等、試験条件が様々である。OECD Validation Study で用いられた protocol は、内分泌かく乱物質試験法および評価委員会 (EDTA)、Validation Management Group (VMG) において、過去の文献等を詳細に検討して作成したものである。また、リードカントリーである日本においても、OECD 対応等試験法実験者レベル会合 (厚生労働省、経済産業省のジョイントミーティング) において各省庁、試験機関で実施してきたデータをもとに protocol 案が検討され、この知見が OECD Validation Study の protocol に反映されている。従って、過去に実施された試験データは OECD Validation Study の protocol に十分反映されていると考えられ、本 protocol を検証した phase 1,2 の validation の結果を整理することにより、本試験法の問題点を抽出し、その解決策を検討することとした。なお、本 Validation Study では、使用動物としてラットを用いており、マウスを用いた試験については、OECD Validation Study 以降に実施された試験データを収集し、評価することとした。

C. 研究結果, 考察

OECD Validation phase 1 および phase 2 は国内外の約 20 の機関が参加して実施された。phase 1 では、強力なエストロゲン様作用を有する ethynyl estradiol (EE) および抗エストロゲン様物質である ZM189.154 を用いて、4 種類の protocol (①幼若ラット, 3 日間経口投与, ②幼若ラット, 3 日間皮下投与, ③卵巣摘出成熟ラット, 3 日間皮下投与, ④卵巣摘出成熟ラット, 7 日間皮下投与) の信頼性の検証, 検出感度, 試験機関間の再現性の確認が行われた。その結果、いずれの protocol においても、全ての試験機関で EE の子宮重量増加作用を確認でき、対照群と比較して有意に子宮重量が増加する EE の用量についても、試験機関の間に大きな差は認められなかった。EE の検出感度は投与経路が皮下の方が経口よりも約 3 倍高い結果であった。また、ZM189.154 の抗エストロゲン様活性も確認できた。試験に用いるラットの系統, 餌, 飼育条件等は各試験機関に任されたが、少なくとも、本 Validation Study に参加した機関が用いている範囲では、試験結果に影響を与えなかった。なお、本 Validation Study で用いられているラットの系統は限定されたものであり、今後、反応性の低い系統を文献調査によって明らかにする必要があると考えられた。なお、本使用動物の条件については、特に、幼若ラットについて、投与開始時の日齢が限定されること、動物にストレスをかけないために個別飼いは避ける、投与開始時の体重範囲は平均体重±20%と幅を持たせても良い等が明らかになった。

phase 2 では、弱いエストロゲン様作用を有するとされる methoxychlor, bisphenol A, genistein, o,p'-DDT, nonylphenol および negative control として di-n-butyl phthalate, 陽性対照として EE を用いて実施された。protocol には一部 phase 1 の成果が盛り込まれた。その結果、陽性対照の EE については phase 1 の結果が再現された。対照群と比較して有意に子宮重量が増加する用量については、試験機関の間に差が認められるケースもあったが、各物質の弱いエストロゲン様作用をいずれの protocol でも確認することができた。しかしながら、いずれの物質にも高い検出力を持つ protocol はなく、試験物質によって最も検出力の高い protocol は異なることが明らかになった。

OECD Validation Study 以降に実施されたマウスを用いた試験については、EE の試験成績から判断すると、ラットと比較して若干感度が低いようである。これが、反応性の差なのかマウスの子宮が小さいことなどによる技術的な要因が大きいのかを今後確認する必要があると考えられた。

E. 結論

子宮肥大試験に関するデータ、問題点を OECD Validation phase 1.2 の結果を中心に整理した。Validation Study で用いられたいずれの protocol も弱いエストロゲン様作用を検出することができ、その再現性、検出感度、試験機関間での再現性等、満足できる試験法であることが明らかになった。マウスを用いた試験については、さらに試験データを収集し、問題点の把握および解決策を検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 子宮肥大試験-幼若ラット法、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(株)、2000年9月19日、永井賢司