

## 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対する研究

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

卵巣摘出マウスに  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) を 0.1、1.0 および  $10\mu\text{g/kg}$  単回皮下投与し、投与後、経時的に子宮重量および網羅的な遺伝子発現をみた。子宮重量は、 $1.0\mu\text{g/kg}$  以上の群で投与後 8 時間目より増加がみられたが、 $0.1\mu\text{g/kg}$  は対照群と変わらなかった。遺伝子発現においても  $0.1\mu\text{g/kg}$  は対照群と変わらなかった。

BrdU 免疫組織化学染色による細胞増殖は、1.0 および  $10\mu\text{g/kg}$  群で 12 時間目より子宮内膜上皮にみられた。

GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現の解析では、 $0.1\mu\text{g/kg}$  群、 $1.0\mu\text{g/kg}$  群、 $10\mu\text{g/kg}$  群では、148、3766、4024 遺伝子の発現がみられ、その半分が EST (Expressed Sequence Tag)であった。変動した遺伝子の発現比は、減少する遺伝子よりも増加する遺伝子の方が大半を占めた。

遺伝子発現は、 $1.0\mu\text{g/kg}$  および  $10\mu\text{g/kg}$  群では投与後 4 時間目より急激に増加したが、 $1.0\mu\text{g/kg}$  群では 12 時間ではほぼプラトーとなる遺伝子が多く存在したのに対し、 $10\mu\text{g/kg}$  群では増加し続けた。

### A. 研究目的

子宮肥大試験を「単なる子宮重量測定試験」から脱却させ、内分泌かく乱の一指標とせしめ得る可能性を想定して、その有用性を高めることを目的とし、以下の研究を行う。すなわち、 $E_2$  投与により卵巣摘出マウスの子宮で発現が誘導される代表的な遺伝子を子宮重量の増加のみられない早期からその発現・消退の経過をみることにより、子宮肥大の分子メカニズムの解析を行う。

### B. 研究方法

#### 1) 動物の処置および子宮採取

動物は 6 週齢の雌性 C57BL/6N マウス (日本チャールスリバー) 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  $E_2$  (溶媒 corn oil) を 0.1、1.0 および  $10\mu\text{g/kg}$  単回皮下投与した。投与後、1 時間、4 時間、8 時間、12 時間および 24 時間毎に各群 8 匹ずつ頸椎脱臼により屠殺し、速やかに子宮を取り出した。子宮重量 (wet) と内腔液を取り除いた (blotted) 重量を測定し、 $4^\circ\text{C}$  の RNA later 中で 1 ヶ月間保存した。尚、8 匹中 2 匹は屠殺 1 時間前に BrdU を腹腔内に投与し、BrdU 免疫組織化学染色を行った。

#### 2) 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)、Bscillus DNA (DAP, PHE, THR, TRP, LYS) の計 6 種類の遺伝子を spike RNA に用いた

#### 3) Genechip 解析

ホモジナイズ用 Buffer RLT に  $\beta$ -mercaptoethanol、子宮を入れ、ミキサーミルでホモジナイズした。ホモジナイズ液の一部を取り DNA 量を測定し、それに合わせて spike RNA を入れた。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を分離・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  $45^\circ\text{C}$  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。

#### 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

子宮重量は、 $0.1 \mu\text{g/kg}$  は対照群と変わらなかったが、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  以上の群は投与後 8 時間目より増加がみられ、24 時間後にはもっとも高い値を示し、増加率は用量に依存した。

BrdU 免疫組織化学染色の結果、 $0.1 \mu\text{g/kg}$  は対照群と変わらなかったが、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  以上の群は、投与後 12 時間目より、子宮内膜上皮に標識率が顕著に増加し、24 時間後では、更に、子宮腺および間質にも増加がみられた。12 時間目の標識率は、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  群に比し  $10 \mu\text{g/kg}$  の方が多くみられたが、24 時間後には同程度であった。

### GeneChip による解析

Chip 上に配置された遺伝子プローブの組み合わせは約 12,000 である。このうちミスハイブリの多いもの、発現量が少なすぎるもの、再現性の悪い遺伝子を除去すると、 $0.1 \mu\text{g/kg}$  群、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  群、 $10 \mu\text{g/kg}$  群では、148、3766、4024 遺伝子の発現がみられ、更にその半分が EST (Expressed Sequence Tag) であった。

遺伝子発現量は、溶媒対照群と  $0.1 \mu\text{g/kg}$  群はほとんど変わらなかったが、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  以上の群では投与後 4 時間目より用量に相関して大きく変動し、減少する遺伝子よりも増加する遺伝子が大半を占めた。更に、発現比が 2 倍以上になる遺伝子は、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  および  $10 \mu\text{g/kg}$  群で投与後 4 時間目より急激に増加した。しかし、この発現増加は、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  群では 1 2 時間でほぼプラトーとなり、 $10 \mu\text{g/kg}$  群では増加し続けた。

発現遺伝子の機能を大きく分類すると  $1.0 \mu\text{g/kg}$  群で DNA binding、DNA binding transcription factor、Cell cycle 関連の遺伝子が 12 時間でプラトーに達したが、Enzyme Ligand 関連の遺伝子は増加し続けた。 $10 \mu\text{g/kg}$  群ではこれらすべての遺伝子が 24 時間まで増加し続けた。

P53 を含めた Apoptosis に関連する遺伝子発現の

増減は、数遺伝子のみであった。

## D. 考察

$E_2$  投与による子宮重量の経時的変化は、8 時間目から増加しているが、細胞増殖の指標となる BrdU 標識率は、投与後 8 時間目までは対照群と変わらなかった。 $1.0 \mu\text{g/kg}$  群以上の群で、G1 期から S 期に発現する Cdk 関連遺伝子の中でも cdk4、cdk2、D-type G1 cyclin が増加しているが、8 時間の段階では、2 倍前後であった。

子宮重量は、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  群では、8 時間以降は緩やかな増加を示すが、 $10 \mu\text{g/kg}$  群では 24 時間まで著名な増加がみられた。Cyclin および cdk の遺伝子発現は、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  群では、12 がピークであるが、 $10 \mu\text{g/kg}$  群では 24 時間後まで顕著に増加している。一方、 $0.1 \mu\text{g/kg}$  群では、子宮重量に増加が見られず、同群の遺伝子発現で 2 倍以上に増加した遺伝子は 12、24 時間で各 1 遺伝子のみであり対照群と変わらなかった。終止子宮重量が増加しないと遺伝子の発現もないことが確認された。

$E_2$  の投与濃度  $1.0 \mu\text{g/kg}$  と  $10 \mu\text{g/kg}$  を比較すると濃度が高い方が、子宮肥大および遺伝子発現増加の効力が長い間持続することが示された。

網羅的に遺伝子発現をみた結果から、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  以上の群では種々の遺伝子が子宮肥大の観測される以前から変動し、その発現パターンは投与用量により顕著に異なることが確認された。

## E. 結論

網羅的に遺伝子発現をみた結果から、種々の遺伝子が子宮肥大の観測される以前から変動し、その発現パターンは投与用量により顕著に異なることが示唆された。

## F. 健康危険情報

無し

## 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) 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)
- 3) 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

- 1) 卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた農薬 o,p'-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)、松島裕子、井上 達、菅野 純
- 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)、松島裕子、井上 達、菅野 純

- 3) 卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン拮抗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) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上 達
- 4) 17 $\beta$ -oestradiol 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、松島裕子、井上 達、菅野 純
- 5) 内分泌かく乱物質の短期 in vivo 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、菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-II 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、松島裕子、平林容子、井上 達、菅野 純

## H. 知的所有権の取得状況

なし

## 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 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、抗アンドロゲン物質であるフルタミド(FLU)あるいは p,p'-ジクロロジフェニルエチレン(DDE)、エストロゲン様物質であるジエチルスチルベストロール(DES)を妊娠 14-17 日、あるいは 18-21 日にラットに投与し、雄出生児の包皮分離を観察した。その結果、FLU および DES 暴露では包皮分離時期が有意に遅延したが、DDE 暴露では明らかな遅延はなかった。

### 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、代表的な抗アンドロゲン物質あるいはエストロゲン様物質を投与して、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(交尾確認日を妊娠 0 日とした)、コーン油に溶解した FLU、DDE あるいは DES を妊娠 14 日から 17 日まで、あるいは妊娠 18 日から 21 日まで 4 日間投与した。FLU および DDE は強制経口投与し、DES は皮下投与した。投与量を FLU は、0.1, 0.3, 1, 10 mg/kg/day (追加試験として 30 mg/kg/day)、DDE は 10, 30, 100, 300 mg/kg/day、DES は 1, 10, 100  $\mu$ g/kg/day とし、各群 3 あるいは 4 例の妊娠ラットに投与した。溶媒対照群にはコーン油を投与した。出生日を 0 日とし、生後 6 日に出生児の肛門生殖突起間距離(AGD)を測定した後、各腹より 4 匹の雄出生児を残した。FLU 30 mg/kg 群では全

ての雄を残して観察した。体重を生後 0、6、22、35、56 日および包皮分離完了日に測定した。生後 35 日から 55 日まで包皮分離を観察した後、生後 56 日に麻酔下放血屠殺して剖検し、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢を採取し重量を測定したほか、包皮および陰茎についても固定し、一部の例を病理組織学的に観察した。

### C. 研究結果

#### (1) FLU 暴露試験 (表 1、2)

胎齢 18-21 日暴露 10 mg/kg 群の出生児 5 例が死亡した。死亡したいずれの例でも前立腺および精嚢に炎症がみられ、膀胱、尿管および腎盂に多量の尿を貯留しており、排尿障害に起因する死亡であることが疑われた。その他の例はいずれの胎齢時期の暴露でも、対照群と同様の体重増加を示した。AGD 体重補正值( $\text{mm}^3\sqrt{\text{g}}$ )は、胎齢 14-17 日暴露で 0.3 mg/kg 以上の群に有意な短縮がみられた。胎齢 18-21 日暴露では 10 mg/kg 群で有意な短縮がみられたが、1 mg/kg 以下の群では有意差は認められなかった。尿道下裂の発生がみられ、10 mg/kg 群では胎齢 14-17 および 18-21 日のいずれの暴露でも亀頭部後面の形成が不全で軽度な下裂を示し、これらの例では包皮分離の判定が不可能であった。さらに高用量の 30 mg/kg を胎齢 14-17 日に暴露した群では、包皮後

面にも下裂が認められ、程度の著しい例では陰茎が露出していた。30 mg/kg を胎齢 18-21 日に暴露した群では亀頭部の形成不全がみられたが、胎齢 14-17 日暴露のような包皮後面の下裂は認められなかった。

包皮分離観察の結果、10 mg/kg 群ではいずれの暴露時期でも亀頭部形成不全により 56 日齢の解剖時にも包皮分離が完了しない例がみられた。分離未完例の分離時期を 56 日齢として検定した結果、いずれの時期の暴露試験でも 10 mg/kg 群では有意に遅延したが、1 mg/kg 以下の群では分離完了時期の遅延はみられなかった。

胎齢 14-17 日の暴露では、片側性の異所性精巣が 10 mg/kg 群の 12 例中 2 例にみられ、これらの異所性精巣は萎縮していた。しかし、両側の精巣、精巣上体、前立腺および精囊の相対重量に有意な変化はなかった。30 mg/kg 群では異所性精巣の頻度はさらに高く、41 例中 28 例にみられた。胎齢 18-21 日暴露では異所性精巣はみられず、10 mg/kg 群の前立腺の相対重量が有意な低値を示した。病理組織学的検査では亀頭部後面の形成不全例の尿道は陰茎先端ではなく、亀頭の後面に開口していた。

#### (2) DDE 暴露試験 (表 3)

妊娠 14-17 日に 300 mg/kg を投与した妊娠雌の 4 例中 3 例が死亡し、残りの 1 例は全ての出生児が死亡した。妊娠 18-21 日投与 300 mg/kg 群でも妊娠雌の 3 例中 2 例が死亡し、残り 1 例の出生児が全例死亡した。その結果、300 mg/kg 群では出生児の観察が不可能であった。また、妊娠 18-21 日投与 100 mg/kg 群では 4 腹中 3 腹の出生児が全例死亡した。体重は 300 mg/kg 群ではいずれの時期の暴露でも投与期間中に減少した。100 mg/kg 以下の群では、投与期間中および出生児に体重増加の明らかな抑制はなかった。胎齢 14-17 および 18-21 日暴露

の 10、30 および 100 mg/kg 群のいずれも対照群との間に AGD 体重補正值( $\text{mm}^3/\sqrt{\text{g}}$ )の有意な差はなく、また、尿道下裂は認められなかった。

包皮分離時期は、胎齢 14-17 日に 100 mg/kg を暴露した群では対照群に比較してやや遅延する傾向を示したものの有意な差はなく、胎齢 18-21 日 100 mg/kg 暴露では生存した 4 腹中 1 腹 4 匹の分離時期に対照群との差はなく、他の群にも差はみられなかった。器官重量の測定では、いずれの暴露時期でも相対重量に明らかな傾向を示す変化はみられなかった。

#### (3) DES 暴露試験 (表 4)

妊娠雌に死亡はみられなかったが、胎齢 14-17 日暴露 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 3/4 腹が全児死亡し、残り 1 腹も雌 2 匹を残して雄は全例が死亡した。その結果、胎齢 14-17 日暴露試験では 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の観察は不可能で、1 および 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で検査を実施した。胎齢 18-21 日暴露 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群でも 1/4 腹の全児が死亡した。妊娠雌の体重は、いずれの時期の暴露でも DES 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群では投与期間中に減少し、出生児の体重は 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で対照群より低い値を示した。胎齢 14-17 日暴露では AGD 体重補正值( $\text{mm}^3/\sqrt{\text{g}}$ )が増加する傾向がみられ、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で有意差がみられた。一方、胎齢 18-21 日暴露では 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の全ての群で有意に短縮した。尿道下裂は認められなかった。

包皮分離の観察の結果、胎齢 14-17 日暴露では 1 および 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群に変化はみられなかった (胎齢 14-17 日暴露 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群は全児死亡)。胎齢 18-21 日暴露では 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で有意に遅延した。

#### D. 考察

FLU 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 FLU の代謝物である、hydroxy flutamide を妊娠 14-15 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完了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おり、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。その結果、胎齢 14-17 日に FLU の 30 mg/kg を暴露した群では発生した尿道下裂のために包皮分離完了時期の判定が不可能であった。一方、胎齢 18-21 日暴露では著しい尿道下裂の発生はなかったが亀頭部に形成不全があり、これは軽度な尿道下裂に相当すると思われたが、解剖時の 56 日齢においても包皮分離が完了しない例が多くみられた。FLU の 10 mg/kg では両時期の暴露で亀頭部の形成不全が多発し、包皮分離の観察は困難であった。DDE 暴露では致死性の用量付近の投与でも尿道下裂はみられなかった。DES 暴露では 100  $\mu$ g/kg の胎齢 14-17 日暴露群の全児が死亡したため尿道下裂の発生は明らかにできず、それよりやや低用量の群の設定が必要であると思われた。

AGD 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 FLU 暴露試験でも体重補正值の減少が確認された。その程度は暴露時期で異なり、胎齢 18-21 日暴露よりも胎齢 14-17 日暴露群に顕著で、胎齢 18-21 日暴露では 10 mg/kg 以上の群で有意差がみられるのに対し、胎齢 14-17 日

暴露群ではそれより低い用量の 0.3 mg/kg 以上の群で有意差を示した。FLU の包皮分離の観察では 10 mg/kg 以上で有意差がみられることに比較すると AGD ではさらに低用量から変化がみられた。

包皮分離完了時期は FLU 暴露では顕著な遅延がみられたが、これは尿道下裂に関連する形成不全による遅延であると思われた。DDE 暴露では投与した妊娠雌が死亡し、包皮分離に対する影響よりも毒性の方が強く現れた。DES では 100  $\mu$ g/kg を胎齢 18-21 日に暴露した群で有意な遅延がみられたが、DES 暴露では出生児の死亡が多く発生し、胎齢 14-17 日 100  $\mu$ g/kg 暴露群に生存例はなく、この群の包皮分離は観察できなかった。

#### E. 結論

抗アンドロゲン物質である FLU の胎生期暴露では尿道下裂が発生し、その結果包皮分離が遅延あるいは未完であった。同じ抗アンドロゲン物質の DDE では包皮分離の遅延はみられなかった。エストロゲン様物質の DES 暴露では出生児に包皮分離の遅延がみられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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)

Nagao, T., Saito, Y., Usumi, 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)

- 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)
- Nagao, T., Yoshimura, S.: Oral administration of clomiphene to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* 21:213-221 (2001)
- 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)
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H.: Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology* 15: 399-411 (2001)
- Nakagomi, M., Suzuki, E., Usumi, K., Saitoh, 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. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 21: 453-462 (2001)
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K. and Ono, H.: Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to p-octylphenol. *Reproductive Toxicology* 15: 683-692 (2001)
- Kuwagata, M., Yoshimura, S., Nagao, T.: Reproductive effects of early neonatal exposure to genistein in Wistar rats. *Congenital Anomalies* 41: 338-339 (2001)
- 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. *Reproductive Toxicology* 16: 112-121 (2002)
2. 学会発表  
齊藤義明、臼見憲司、渡辺千朗、永田伴子、大澤徳子、吉村慎介、今井 清、加藤正信：DEHP の妊娠期暴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 1 月 東京

表1 胎生期に flutamide を暴露した雄ラットの  
包皮分離完了時期(日齢)

	n	胎齢14~17日暴露	n	胎齢18~21日暴露
Control	12	42.8 ± 2.2	12	43.2 ± 2.0
1 mg/kg	12	42.4 ± 0.7	12	44.5 ± 1.4
10 mg/kg	12 <sup>a)</sup>	53.1 ± 3.8**	8 <sup>b)</sup>	53.1 ± 4.7**

Mean±S.D., \*\* p<0.01

a) 7例は未完

b) 5例は未完、5/12例は排尿障害による死亡

表2 胎生期に flutamide を暴露した雄ラットの  
包皮分離完了時期(日齢)

	n	胎齢14~17日暴露	n	胎齢18~21日暴露
Control	16	42.6 ± 0.7	12	41.0 ± 2.2
0.1 mg/kg	12	43.1 ± 1.3	12	42.9 ± 2.0
0.3 mg/kg	12	41.4 ± 1.0 *	8	40.9 ± 1.5
1 mg/kg	16	42.4 ± 1.3	12	41.7 ± 1.7

Mean±S.D., \* p<0.05



表3 胎生期にDDEを暴露した雄ラットの  
包皮分離完了時期(日齢)

	n 胎齢14~17日暴露			n 胎齢18~21日暴露		
Control	12	42.8	± 2.2	14	43.5	± 1.6
10 mg/kg	12	42.6	± 0.9	16	43.3	± 2.2
30 mg/kg	16	43.1	± 1.4	14	43.1	± 1.4
100 mg/kg	16	44.6	± 3.0	4 <sup>a)</sup>	43.5	± 1.0

Mean±S.D.

a) 3/4腹は全児死亡

表4 胎生期にDESを暴露した雄ラットの  
包皮分離完了時期(日齢)

	n 胎齢14~17日暴露			n 胎齢18~21日暴露		
Control	15	42.7	± 1.4	16	43.3	± 1.5
1 µg/kg	16	43.1	± 1.3	16	42.9	± 1.4
10 µg/kg	16	42.9	± 2.0	15	44.6	± 2.0
100 µg/kg	0 <sup>a)</sup>			11 <sup>b)</sup>	45.6	± 1.5 **

Mean±S.D. , \*\* p<0.01

a) 4/4腹は全児死亡

b) 1/4腹は全児死亡

## 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 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

雄ラットに抗アンドロゲン物質であるフルタミド(FLU) あるいは p,p'-ジクロロジフェニルエチレン(DDE)、エストロゲン様物質であるジエチルスチルベストロール(DES)を新生児期あるいは性成熟直前の 5 日間投与し、包皮分離完了時期を対照群と比較した。その結果、FLU では性成熟直前、DDE では離乳前および性成熟直前の暴露で分離時期が遅延したが、DES では生後 1-5 日および離乳前の暴露で有意な遅延がみられ、性成熟直前の暴露でも遅延する傾向がみられた。

### 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官および副生殖器官のその後の分化、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、新生児の異なる時期に、代表的な抗アンドロゲン物質あるいはエストロゲン様物質を投与して、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官・副生殖器官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て得られた雄出生児（出生日を生後 0 日とした）に、コーン油に溶解した FLU、DDE あるいは DES を生後 1 日から 5 日まであるいは 17 日から 21 日まで、また DDE については生後 35 日から 39 日まで 5 日間投与した。さらに FLU および DES については、28 日齢で購入した雄ラットに生後 35 日から 39 日(FLU)あるいは 34 日から 38 日(DES)まで 5 日間投与した。FLU および DDE は強制経口投与し、DES は皮下投与した。投与量を FLU は、0.3, 1, 10 mg/kg/day、DDE は 10, 30, 100, 300 mg/kg/day、DES は 1, 10, 100  $\mu$ g/kg/day とし、溶媒対照群にはコー

ン油を投与した。生後 1-5 日暴露試験では生後 1 日に各腹雄 6 匹を残し、生後 6 日に各腹雄 4 匹とした。生後 17-21 日および DDE の生後 35-39 日暴露試験では生後 6 日に各腹雄 4 匹を残した。各群は 3 から 5 腹で構成した。体重を投与期間中に測定したほか、生後 22、35、56 日（28 日齢で購入した動物は 34 あるいは 35、56 日）および包皮分離完了日に測定した。生後 35 日から 55 日まで包皮分離を観察した後、生後 56 あるいは 57 日に麻酔下放血屠殺して剖検後、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢を採取し重量を測定したほか、包皮および陰茎についても固定し、一部の例を病理組織学的に観察した。

### C. 研究結果

#### (1) FLU 暴露試験（表 1）

死亡例の発生はなく、いずれの時期の暴露でも、対照群と同様の体重増加を示した。生後 1-5 日暴露試験および生後 17-21 日暴露試験では、10 mg/kg 投与群においても包皮分離完了時期の有意な遅延はみられなかった。生後 35-39 日暴露試験では 10 mg/kg 投与群で有意な遅延が認められた。器官重量は、生後 17-21 日暴露 1 mg/kg 投与群の精巣上体および精嚢、10 mg/kg 投与群の精嚢の相対重量がそれぞれ有意な高値を示し

た。生後 1-5 および 35-39 日暴露では、相対重量に有意な変化はみられなかった。剖検時の肉眼的観察ではいずれの時期の暴露でも変化はなく、生後 35-39 日暴露では組織学的にも変化はみられなかった。

## (2) DDE 暴露試験 (表 2)

300 mg/kg 生後 17-21 日暴露では 3/16 例、生後 35-39 日暴露ではさらに多く 10/12 例が死亡したが、300 mg/kg 生後 1-5 日暴露では死亡例はみられなかった。体重は、生後 1-5 日暴露では投与期間中も対照群と差はみられなかった。生後 17-21 日暴露試験の 300 mg/kg 投与群では、対照群に比較して投与期間中の体重増加が抑制されたが、その後は対照群とほぼ同様に増加した。300 mg/kg 生後 35-39 日暴露では投与期間中に体重が減少したが、解剖時まで生存した 2 例は対照群と同程度まで体重が増加した。

包皮分離時期は生後 1-5 日暴露では変化がなく、生後 17-21 日暴露では 300 mg/kg 群に有意な遅延がみられた。生後 35-39 日暴露試験では 100 mg/kg 投与群は対照群に比べ有意に遅延し、300 mg/kg 群は生存が 2 例であったが、対照群より遅延した。器官相対重量では、生後 35-39 日暴露の 100 mg/kg 群で精囊に有意な低値がみられ、300 mg/kg の生存した 2 例では前立腺および精囊が低値を示した。生後 1-5 および 17-21 日暴露では用量に依存する変化はみられなかった。剖検時の肉眼的観察ではいずれの暴露時期でも変化はみられなかった。

## (3) DES 暴露試験 (表 3)

いずれの暴露時期でも死亡例はなかった。生後 1-5 日暴露では投与期間中の体重増加に群間の差はなかった。生後 17-21 日暴露では 10 および 100  $\mu$ g/kg 投与群で投与期間中の体重増加が抑制されたが、解剖時には対照群と差はなかった。生後 34-38 日暴

露では 100  $\mu$ g/kg 投与群の投与期間中の体重増加は抑制されたが、解剖時には対照群と大差なかった。包皮分離完了時期は生後 1-5 日暴露では用量依存性に遅延し、100  $\mu$ g/kg 投与群の 20 例中 2 例は 57 日齢の解剖時も分離が完了せず、この群は対照群と比較して有意差が認められた。生後 17-21 および 34-38 日暴露では 10 および 100  $\mu$ g/kg 投与群で軽度に遅延した。器官相対重量は、生後 1-5 日暴露の精巣および前立腺では 100  $\mu$ g/kg 投与群が有意な低値を示し、一方、精巣上体では 1 および 10  $\mu$ g/kg 投与群が、精囊では 1  $\mu$ g/kg 投与群が有意な高値を示した。生後 17-21 および 34-38 日暴露では有意差はみられなかった。剖検時の肉眼的観察では生後 1-5 日暴露の 100  $\mu$ g/kg 投与群の少数例に精巣の軽度な萎縮や精巣上体の水腫性変化がみられた。生後 17-21 および 34-38 日暴露では肉眼的変化はみられなかった。

## D. 考察

FLU 暴露により用量依存性に包皮分離完了時期の遅延がみられたが、その投与時期は性成熟直前の生後 35-39 日であり、出生直後の生後 1-5 日や離乳直前の生後 17-21 日では影響が認められなかった。また、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分化は再開したものと思われる。DDE の生後 1-5 日の暴露では包皮分離時期に差はみられなかったが、日齢が進むとともに低い用量でも遅延する傾向を示した。死亡例の発生を指標にした DDE の毒性の発現も同様で、生後 1-5 日暴露では死亡例の発生がなかった用量でも性成熟直前の暴露で強い毒性を示した。一方、DES では出生直後の暴露でも包皮分離に対する影響が明らかで、

57 日齢の解剖時でも分離の完了しない例が認められた。このように化学物質の種類により、暴露時期とその影響の強弱に違いが生じた。

#### E. 結論

抗アンドロゲン物質である FLU の新生児期暴露では変化はみられなかったが、性成熟直前の暴露では包皮分離時期が遅延した。同じ抗アンドロゲン物質の DDE でも暴露時の日齢が進むとともに遅延が明らかとなった。一方、エストロゲン物質である DES では出生直後の暴露でも性成熟直前の暴露と同様に包皮分離時期が遅延した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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)

Nagao, T., Saito, Y., Usumi, 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)

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)

Nagao, T., Yoshimura, S.: Oral administration of clomiphene to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Teratogenesis*

*Carcinogenesis and Mutagenesis* 21:213-221 (2001)

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)

Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H.: Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology* 15: 399-411 (2001)

Nakagomi, M., Suzuki, E., Usumi, K., Saitoh, 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. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 21: 453-462 (2001)

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

Kuwagata, M., Yoshimura, S., Nagao, T.: Reproductive effects of early neonatal exposure to genistein in Wistar rats. *Congenital Anomalies* 41: 338-339 (2001)

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. *Reproductive Toxicology* 16: 112-121 (2002)

## 2. 学会発表

斎藤義明、白見憲司、渡辺千朗、永山伴子、  
大澤徳子、吉村慎介、今井 清、加藤正儒：  
DEHP の妊娠期暴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  
性病理解学会 2002 年 1 月 東京

表1 新生児期にflutamideを経口投与した雄ラットの  
包皮分離完了時期(日齢)

	n	生後 1-5日暴露	n	生後 17-21日暴露	n	生後 35-39日暴露
Control	20	43.2 ± 1.3	15	43.3 ± 1.0	10	42.9 ± 2.2
0.3 mg/kg	20	42.8 ± 1.6	16	44.0 ± 2.0	--	----
1 mg/kg	20	42.7 ± 1.6	16	44.0 ± 1.7	10	43.8 ± 0.8
10 mg/kg	24	43.9 ± 2.1	16	43.2 ± 1.8	10	45.5 ± 1.6**

Mean±S.D., \*\* p<0.01

表2 新生児期にDDEを経口投与した雄ラットの  
包皮分離完了時期(日齢)

	n	生後 1-5日暴露	n	生後 17-21日暴露	n	生後 35-39日暴露
Control	12	42.3 ± 1.7	12	43.6 ± 0.8	12	42.1 ± 1.3
10 mg/kg	12	42.0 ± 1.3	12	43.8 ± 1.4	12	43.1 ± 1.3
30 mg/kg	11	40.9 ± 1.7	11	43.9 ± 1.6	12	43.4 ± 2.5
100 mg/kg	12	42.1 ± 1.2	12	44.5 ± 1.3	12	46.4 ± 3.3**
300 mg/kg	12	42.2 ± 0.9	13 <sup>a)</sup>	45.5 ± 1.4**	2 <sup>b)</sup>	49.0 ± 1.4*

Mean±S.D., \* p<0.05, \*\* p<0.01

a) 3/16例死亡, b) 10/12例死亡

表3 新生児期にDESを皮下投与した雄ラットの  
包皮分離完了時期(日齢)

	n	生後 1-5日暴露	n	生後 17-21日暴露	n	生後 34-38日暴露
Control	16	42.9 ± 2.7	16	41.4 ± 1.1	10	44.8 ± 2.1
1 µg/kg	20	42.9 ± 1.9	16	41.9 ± 2.4	10	44.2 ± 0.9
10 µg/kg	20	44.5 ± 2.8	16	43.1 ± 2.9	10	45.9 ± 1.3
100 µg/kg	20 <sup>a)</sup>	47.1 ± 4.4**	15	43.1 ± 1.4*	10	47.4 ± 2.8

Mean ± S.D., \*p<0.05, \*\* p<0.01

a) 2例は未完

## 8. 28日間試験の改良 - $\alpha_{2u}$ グロブリン評価の利用について-

研究者 武吉正博 財団法人 化学物質評価研究機構 課長

### 研究要旨

$\alpha_{2u}$ グロブリン (AUG) mRNAの発現はDiethylstilbestrol (DES)を10 $\mu$ 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7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投与の影響による個体レベルでの遺伝子変動と血清AUG変動との関連をアジレント社製DNA microarrayを用いて検討した。Cluster解析の結果、AUGの変動との関連性が示唆される遺伝子群としてラット老化マーカー蛋白とAUG発現との関連が注目された。今後、更に詳細な遺伝子発現解析が必要とされる。また、最近市販されたAUG測定キットと当機構で開発した測定法との相関を検討した結果、 $R^2=0.9289$ であり、市販キットを用いた場合もこれまでの研究と同様の結果がえられるものと考えられる。

### 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  $\alpha_{2u}$  グロブリンの測定意義を明白にする。

### B 研究方法

①DESを0.01-1 mg/kgの用量で7日間反復経口投与し、肝臓における遺伝子発現をDNA microarrayで検討すると共にELISA法にて血清AUGの変動を同時に検討した。②これまで血清AUGの測定に使用してきたELISA法と最近市販された測定キットの相関性を検討し、その利用性を検討した。

### C 研究結果

0.1g/kg x 7 day 以上のDiethylstilbestrol (DES)投与によって、投与1日後の血清AUGレベルの上昇と3日後から7日後にかけての血清AUGレベルの減少が観察された。血清AUGの変動は0.1mg/kgよりも1mg/kgで顕著であり、1mg/kg投

与群の7日後の血清AUGレベルは全例検出限界以下となった。0.1mg/kg投与群の一部の動物において著しい血清AUGの減少が観察されたが、0.01mg/kg投与群では血清AUGの明らかな変動は観察されなかった。本実験に使用した動物から得られた肝total RNAをTemplateとして蛍光標識cDNA (Cy3, Cy5) を作製しAgilent社製glass cDNA microarrayを用いて網羅的に遺伝子の変動を観察した結果、DESの投与の用量及び血清AUGと連動した一連の遺伝子群が抽出され、"Rat ribosomal protein L21 mRNA, complete cds."、"Rat senescence marker protein 2A gene, exons 1 and 2."、Rat mRNA for Ulip and dihydropyrimidinase-like protein、"Mouse TSC22-related inducible leucine zipper 2 (Tilz2) mRNA, complete cds."、"Rat aldose-reductase-like protein MVDP/AKR1-B7 mRNA, complete cds."、"Mouse cell surface antigen AA4 (AA4) mRNA, complete cds."、"Mouse tetraspanin Tspan-5 (Tspan5) mRNA,



complete cds."、"Mouse protein phosphatase 2A subunit B<sup>β</sup>-beta mRNA, partial cds."、"Mouse mitochondrial inner membrane translocase component Tim17b mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds."、"Rat vacuolar protein sorting homolog r-vps33a mRNA, complete cds."、Mouse MHC class I region.、mitochondrial methionyl-tRNA transformylase 等が血清 AUG の変動との関連性を有することが示唆された(表1及び2)。また、市販キットを用いた場合の測定値と in house ELISA 法の測定値の間の相関係数は R<sup>2</sup>=0.9289 であった(図1)。

#### D 考察

雄動物に DES を投与した場合に肝における AUG の蛋白レベル及びメッセージレベルの変動は 0.1 mg/kg x 7 day 以上の用量で認められ、1mg/kg の7日間投与では肝における AUG mRNA の発現、血清 AUG レベルは共に検出限界以下となる。本実験では DES 投与に伴う肝における遺伝子発現の変動を用量依存性及び経時的变化を中心に検討した。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)。変動した遺伝子群の中で Rat senescence marker protein 2A gene (SMP-2) と血清 AUG の変動との関連性が注目された。SMP-2 は Androgen repressible な蛋白であり、肝細胞が Androgen に対して感受性を有する時期に発現が抑制され、AUG が誘導される期間は SMP-2 の発現が抑制されることが報告されている。また、肝が Androgen に感受性を持たない幼齢期及び老齢期に発現が誘導され、AUG 産生に関し、肝が

Androgen 感受性を持たない雌ラットでは全 life stage で constitutive に発現していることが既に報告されている。これらの報告及び今回の実験結果から AUG の発現と SMP-2 は密接に関連していることが示唆される。今後はこの蛋白と AUG の関連性を更に詳細に検討する必要がある。

#### E 結論

本研究結果から AUG の発現と SMP-2 は密接に関連していることが示唆される。今後はこの蛋白と AUG の関連性を更に詳細に検討する必要がある。

#### F 健康危険情報

特になし

#### G 研究発表

Takeyoshi M, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Yamasaki K.

Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats.

Reprod Toxicol. 2002 Jul-Aug;16(4):367-9.

Yamasaki K, Takeyoshi M, Noda S, Takatsuki M.

Changes of serum alpha 2u-globulin in the subacute oral toxicity study of ethynyl estradiol and bisphenol A based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline No. 407'.

Toxicology. 2002 Jul 1;176(1-2):101-12.

Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K.

Hepatic alpha(2u)-globulin mRNA levels and diethylstilbestrol-associated

testicular atrophy in rats.

Reprod Toxicol. 2000 Jul-Aug;14(4):355-7.

Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K.

Changes in serum alpha<sub>2</sub>-globulin levels in male rats given diethylstilbestrol

and applicability to a screening test for endocrine-disrupting chemicals.

Arch Toxicol. 2000 Mar;74(1):48-53.

H 知的財産所有権の出願、登録状況  
特になし。

表 1 AUG と同様の変動を示す遺伝子群

Systemat Name	GeneName	0.01 mg/kg/day			0.1 mg/kg/day			1 mg/kg/day		
		Day 1	Day 3	Day 7	Day 1	Day 3	Day 7	Day 1	Day 3	Day 7
0	Incyte EST	0.45	0.70	0.94	0.54	0.78	0.50	0.38	0.33	0.18
U94700	"Mouse sarcosine oxidase (Pso) mRNA, complete cds."	0.62	0.80	1.26	0.70	0.63	0.67	0.49	0.48	0.30
Y07711	Mouse mRNA for zyxin.	0.78	0.86	0.64	0.61	0.76	0.55	0.52	0.46	0.31
M57719	"Rat cytochrome P450 IVA2 (CYP4A2) gene, complete cds."	0.85	1.32	0.43	0.82	1.15	0.36	0.63	0.98	0.20
L25785	"Rat (TSC-22) mRNA, complete cds."	0.52	0.68	0.75	0.54	0.45	0.63	0.39	0.39	0.23
AJ001713	Rat mRNA for myosin-RhoGAP protein Myr 7.	1.02	0.82	1.20	1.05	0.59	0.24	1.05	0.46	0.09
J00732	Rat liver fatty acid binding protein (FABP) mRNA.	0.75	0.83	0.64	0.60	0.73	0.48	0.48	0.44	0.31
X96721	Rat mRNA for P450I1A23 protein.	1.23	0.79	1.04	0.73	0.92	0.22	0.92	0.45	0.12
X70533	Mouse mRNA for corticosteroid-binding globulin.	0.48	0.90	0.64	0.56	0.81	0.69	0.44	0.37	0.33
0	Incyte EST	0.73	0.81	0.65	0.61	0.66	0.57	0.62	0.49	0.29
X81825	Rat mRNA for pI esterase (ES-4).	0.76	0.82	0.83	0.58	0.63	0.71	0.64	0.54	0.33
M17083	"Rat major alpha-globin mRNA, complete cds."	0.81	0.72	0.69	0.63	0.52	0.32	0.77	0.72	0.24
0	Incyte EST	0.79	1.02	0.88	0.72	0.83	0.56	0.45	0.52	0.33
AAC23790	similar to protein U28928 (PID:g861306)	0.41	0.56	0.70	0.41	0.67	0.59	0.44	0.51	0.33
J00738	"Rat submaxillary gland alpha-2u globulin mRNA, complete cds."	1.07	0.69	1.11	0.91	0.53	0.18	1.04	0.39	0.02
M11842	"Rat ornithine aminotransferase mRNA, complete cds."	0.48	0.68	0.65	0.54	0.65	0.82	0.74	0.33	0.32
Y14196	Mouse mRNA for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H.	1.03	0.77	1.13	0.97	0.52	0.15	0.94	0.36	0.02
X51974	Rat mRNA for pI 6.1 esterase (ES-10).	0.90	0.81	0.82	0.56	0.55	0.45	0.55	0.46	0.18
M37828	"Rat cytochrome P450 mRNA, complete cds."	0.89	0.85	0.78	0.58	0.96	0.85	0.73	0.94	0.31
0	Incyte EST	1.05	0.70	1.10	0.93	0.53	0.19	1.01	0.38	0.03
AB037934	"Rat mRNA for regucalcin, complete cds."	0.80	0.83	0.92	0.80	0.64	0.51	0.68	0.35	0.24
AF042180	"Mouse testis-specific Y-encoded-like protein (Tspyl1) mRNA, complete cds."	0.57	0.75	0.67	0.57	0.71	0.77	0.71	0.56	0.33
U32372	"Rat tyrosine-ester sulfotransferase mRNA, complete cds."	1.31	0.98	0.91	0.88	0.82	0.62	0.91	0.40	0.30
X79991	Rat CYP3 mRNA.	1.30	0.93	1.19	0.73	0.93	0.26	0.81	0.38	0.13
AB015801	"Mouse mRNA for LKB1, complete cds."	0.98	0.58	1.00	0.78	0.56	0.32	0.79	0.23	0.18
M86758	"Rat estrogen sulfotransferase mRNA, complete cds."	1.00	1.07	0.84	0.77	0.69	0.07	0.64	0.19	0.04
M33936	"Rat Cyp4a locus, encoding cytochrome P450 (IVA3) mRNA, complete cds."	0.93	1.38	0.42	0.82	1.14	0.37	0.66	1.02	0.24
X07259	Rat mRNA for cytochrome P452.	1.10	1.02	0.55	0.71	0.97	0.72	0.78	0.89	0.29
CAB07547	predicted using Genefinder~cDNA EST yk345d5.3 comes from this gene~cDNA EST yk345d5.5 comes from this gene	0.84	0.82	0.92	0.70	0.77	0.75	0.74	0.58	0.30

表2 AUG と逆の動きをする遺伝子群

Systematic Name	GeneName	0.01 mg/kg/day			0.1 mg/kg/day			1 mg/kg/day		
		Day 1	Day 3	Day 7	Day 1	Day 3	Day 7	Day 1	Day 3	Day 7
M27905	"Rat ribosomal protein L21 mRNA, complete cds."	0.54	0.74	3.16	0.74	1.02	2.60	0.73	0.48	3.56
M29301	"Rat senescence marker protein 2A gene, exons 1 and 2."	1.15	1.24	0.94	1.43	1.37	3.27	1.29	1.36	2.21
AAD34769	unknown	0.21	0.64	9.01	0.89	0.87	7.58	0.84	0.94	11.90
AF081789	"Mouse cell surface antigen AA4 (AA4) mRNA, complete cds."	0.96	1.24	0.95	1.37	1.32	3.15	1.29	1.32	2.20
AF121344	"Mouse tetraspanin Tspan-5 (Tspan5) mRNA, complete cds."	0.40	0.64	7.87	0.91	0.87	6.62	0.92	1.02	10.42
U49728	"Mouse protein phosphatase 2A subunit B'-beta mRNA, partial cds."	0.49	0.70	6.90	1.00	0.93	6.21	1.03	1.11	8.77
AF106621	"Mouse mitochondrial inner membrane translocase component Tim17b mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds."	0.80	1.02	7.14	0.95	1.40	4.88	0.95	0.59	8.93
AF111102	Mouse MHC class I region.	0.95	1.19	3.97	1.01	1.39	3.17	1.05	0.94	4.03

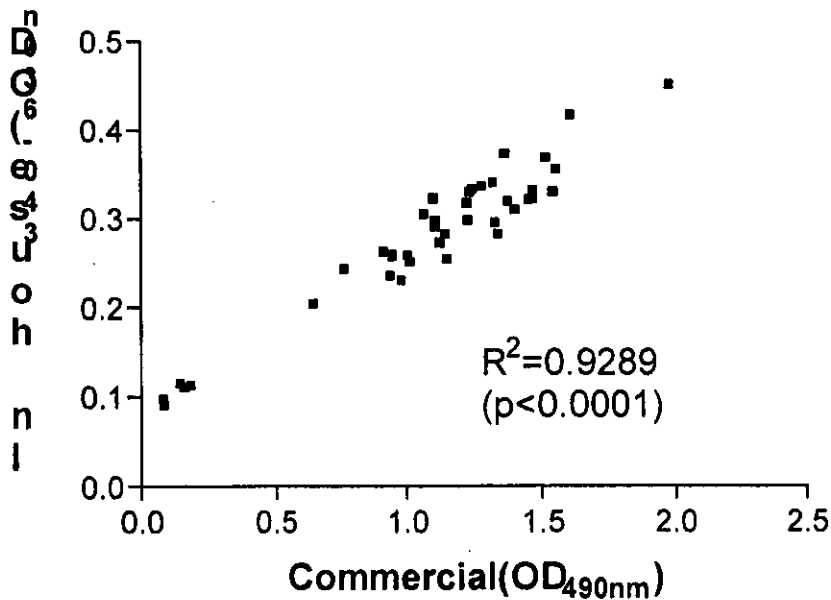


図1 市販キットと従来法 (In house) の比較