

## 9. 国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理と その問題点の把握及び解決策の検討

研究者 山崎 寛治 (財) 化学物質評価技術機構 部長

### 研究要旨

OECD Validation phase2 試験の一環として国内の 7 試験機関において Hershberger 試験を実施し、そのデータを整理し、それを基に本試験の問題点を明らかにした。本試験の方向性としては今後のすべての phase 2 試験が終了した後、問題点が抽出され、それに対する解決策が検討され、OECD 試験計画書の作成に進むものと考えられる。従って、世界的に phase 2 の試験を実施するに当たり、日本で明らかにした問題は非常に有用と考えられた。

#### A. 研究目的

国内で実施された試験をもとに、本試験法の問題点の抽出し、その解決法を考慮し、さらに本試験法に関連する情報を収集する。

#### B. 研究方法

OECD Validation phase2 試験の一環として国内の 7 試験機関において Hershberger 試験を実施し、それを基に本試験の問題点を明らかにした。また、本試験に関する文献を検索し、問題点を抽出した。

なお、国内の 7 試験機関において実施した Hershberger 試験については添付資料として 2 ページ以降に報告する。

#### C,D. 研究結果及び考察

実施した Validation phase2 試験を実施した結果、問題点とし

て以下のことがあげられた。

①各試験機関、各測定器官でのばらつきについて：androgen agonist である methyltestosterone では軽度であったが、antagonist である vinclozolin、*p,p'*-DDE、特に *p,p'*-DDE で顕著であった。このことは③で記載している設定用量に関与していると考えられた。各機関、各器官でのばらつきについては世界的に実施される phase2 試験が終了後、今回のデータを含め議論されると考えられる。

②androgen の作用について：methyltestosterone、vinclozolin、*p,p'*-DDE のいずれの物質においても、さらにはいずれの器官においても高用量群で作用が検出できた。このことはスクリーニング試験としての本試験の有用性を示唆するものである。

これについても phase2 試験が終了後、議論されると考えられる。

③ 今回の設定用量に関して：methyltestosterone、vinclozolinの結果については各試験機関、各測定器官でのばらつきは少なく、用量設定は概ね良好と判断された。しかし、*p,p'*-DDE については再考の余地があった。

世界的に実施される phase 2 試験では vinclozolin の用量は日本と同じに設定されたが、*p,p'*-DDE については用量を上げて実施している。

一方、文献検索から以下のことが考えられ、OECD 事務局に提案した。

・文献的に antagonist 作用を検出する場合、肝臓で testosterone propionate の作用が増強される場合がみられていることから、肝臓の器官重量測定は必要と考えられる。

世界的に実施される phase 2 試験では肝臓の重量を測定するように指示されている。

## E. 結論

OECD Validation phase2 試験の一環として国内の 7 試験機関において Hershberger 試験を実施し、そのデータを整理し、それを基に本試験の問題点を明らかにした。また、得られた問題点については OECD に報告し、世界的に実施される phase 2 の試験の試験計画書に反映されている。本試験の方向性としては今後のすべての phase 2 試験が終了した後、問題点が抽出され、それに対する解決策が検討され、OECD 試験計画書の作成に進むものと考えられる。従って、世界的に phase 2 の試験を実施するに当たり、日本で明らかにした問題は非常に有用と考えられた。

## 添付資料

### 国内の7試験機関における Hershberger 試験の結果

#### 1. 要約

日本の7試験機関において methyltestosterone、vinclozolin、*p,p'*-DDE を使用した Hershberger 試験を実施した。試験は OECD 試験計画書 (OECD 2000) に準じて実施した。methyltestosterone の用量は 0、0.05、0.5、5、50mg/kg/day とし、4 機関で実施した。vinclozolin と *p,p'*-DDE の用量は 0、3、10、30、100mg/kg/day とし、前者は 4 機関、後者は 5 機関で実施した。動物は去勢ラットを用い、試験物質を 10 日間経口投与した。また、vinclozolin と *p,p'*-DDE については試験物質と同時に陽性となる 0.2 mg/kg/day の testosterone propionate を皮下投与した。器官重量は腹葉前立腺、精囊、肛門挙筋+球海綿体筋、陰茎亀頭、尿道球腺の5器官について測定した。

いずれの機関においても、methyltestosterone では今回計測したすべての器官で用量相関性に重量増加がみられた。一方、vinclozolin、*p,p'*-DDE では高用量群において testosterone propionate を投与した陽性対照群に比較し、各器官の重量減少が観察された。これらのことから、スクリーニング試験としての Hershberger 試験の有用性が確認された。しかし、vinclozolin、*p,p'*-DDE では低用量群、中用量群においては各試験機関間、さらには各器官間でばらつきがみられた。

#### 2. 材料と方法

##### 2.1. 試験期間

試験は以下の7機関で実施した。

化学物質評価研究機構(CERI)、食品薬品安全センター、残留農薬研究所、バイオリザーチセンター、三菱化学安全科学研究所、パナファームラボラトリーズ、住友化学工業株式会社

##### 2.2. 試験物質

試験物質は methyltestosterone (MT, CAS No. 58-18-4, 99.8% pure, Fluka Production GmbH)、vinclozolin (VCZ, CAS No. 50471-44-8, 99% pure, Kanto Chemical Co.)、1,1-Bis-(chlorphenel)-2,2-dichlorethylen (*p,p'*-DDE, CAS No. 72-55-9, 99.5% pure, Sigma-Aldrich Com, UAS)である。また、MT、*p,p'*-DDE、さらに antagonist 検出で使用する testosterone propionate (TP, CAS No. 57-85-2, 97% pure, Fluka Production GmbH)については TNO(Zeist, the Netherlands) から供給された。VCZ については CERI が購入し、各機関に配布した。

##### 2.3. 動物

5 機関は Crj:CD (SD) rats を、2 機関は Brl Han: WIST Jcl (GALAS) rats を使用した。いずれの機関も飼料は MF (Oriental Yeast Co.)を使用した。

##### 2.4. 試験方法

試験は OECD 試験計画書(OECD, 2001)に準じた試験計画書を CERI が作成し、各機関に配布した。その後各機関からのコメントに対応したものを CERI が考慮し最終試験計画書とし、この試験計画書をもとに各機関は試験を実施した。

MTは0、0.05、0.5、5、50mg/kg/dayとし、試験は4機関で実施した。VCZと*p,p'*-DDEは0、3、10、30、100mg/kg/dayとし、前者は4機関、後者は5機関で実施した。動物は去勢ラットを用い、試験物質を10日間経口投与した。また、VCZと*p,p'*-DDEについては試験物質と同時に陽性となる0.2mg/kg/dayのTPを皮下投与した。動物は最終投与約24時間後に放血殺し、腹葉前立腺、精囊、肛門挙筋+球海綿体筋、陰莖亀頭、尿道球腺の5器官を測定した。また、1機関においては摘出した期間を10%ホルマリン液に固定し24時間後に測定した。

## 2.5. 有意差検定

体重、器官重量の結果について対照群と各試験物質投与群間でBartlett法による等分散検定を行い、5%有意差水準で等分散がみられた場合、一元配置分散分析を行った。分散分析において有意差が認められた場合は、Dunnett法による検定を行った。等分散が認められない場合、Kruskal-Wallisの検定を行い、有意差がみられた場合はノンパラメトリックのDunnett法による検定を行った。また、coefficient of variance (CV)、R-square (R<sup>2</sup>)値について算出した。

## 3. 成績及び考察

器官重量の変化、CV、R<sup>2</sup>値についてTables 1-3に示した。

### 3.1. MT

体重、一般状態

異常はみられなかった。

器官重量

腹葉前立腺：各機関においては5-50mg/kg群で有意な増加がみられた。各機関の平均のCVは21-33で、全体の平均は25であった。R<sup>2</sup>は89%-95%で、R-square value for effects of treatments (TRT)は90%、R-square value for effects between laboratories (LAB)は1%であり、TRTは計測した器官のなかで最も高値を示していた。

精囊：各機関においては5-50mg/kg群で有意な増加がみられた。各機関の平均のCVは13-24で、全体の平均は20であった。R<sup>2</sup>は82%-98%で、TRTは81%、LABは4%であった。

肛門挙筋+球海綿体筋：各機関においては5-50mg/kg群で有意な増加がみられた。各機関の平均のCVは11-14で、全体の平均は12であった。R<sup>2</sup>は88%-95%で、TRTは83%、LABは6%であった。

陰莖亀頭：各機関においては5-50mg/kg群で有意な増加がみられた。各機関の平均のCVは4-9で、全体の平均は7であった。R<sup>2</sup>は77%-97%で、TRTは78%、LABは19%であった。全体のCVの平均は各器官内で最も低い値であったが、TRTは最も低値を示し、LABは高値を示していた。

尿道球腺：各機関においては5-50mg/kg群で有意な増加がみられた。各機関の平均のCVは16-29で、全体の平均は22であった。R<sup>2</sup>は71%-93%で、TRTは81%、LABは0%であった。

今回測定したいずれの器官においても、MTのandrogen agonistic作用は検出可能であった。また、各器官内では腹葉前立腺においてCVは高いもののTBTは最も高く、またLABも低いことから、感度はよいと考えられた。OECD phase1でのTPによるHershberger試験では、陰莖亀頭の感度が良好で、腹葉前立腺は良くないと報告されたが(OECD 2002)、今回の試験

では異なっていた。

### 3.2. VCZ

体重、一般状態

異常はみられなかった。

器官重量

腹葉前立腺：各機関においては 30-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 13-26 で、全体の平均は 19 であった。R2 は 62%-91% で、TRT は 60%、LAB は 16% であった。TRT は精囊、陰茎亀頭とほぼ同じであり、肛門挙筋+球海綿体筋、尿道球腺より高値を示し、LAB は精囊とほぼ同じ値を示し、他の器官より低値であった。

精囊：各機関においては 10-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 17-21 で、全体の平均は 19 であった。R2 は 79%-92% で、TRT は 64%、LAB は 19% であった。

肛門挙筋+球海綿体筋：各機関においては 10-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 10-14 で、全体の平均は 12 であった。R2 は 69%-89% で、TRT は 50%、LAB は 34% であった。

陰茎亀頭：各機関においては 10-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 5-9 で、全体の平均は 7 であった。R2 は 62%-85% で、TRT は 67%、LAB は 29% であった。

尿道球腺：各機関においては 10-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 18-21 で、全体の平均は 19 であった。R2 は 71%-75% で、TRT は 51%、LAB は 26% であった。

今回測定したいずれの器官においても、高用量で VCZ の androgen antagonistic 作用が検出可能であった。また、各器官内では精囊における CV は高いものの、TBT が高く、また LAB も低く、さらには TP のみ投与した陽性対照群に比較した場合の高用量群における低下率が高いことから、精囊の感度はよいと考えられた。

### 3.3 *p,p'*-DDE

体重、一般状態

有意な体重減少が 1 機関でみられたが、他の機関で有意な変化は観察されなかった。また、一般状態には異常はみられなかった。

器官重量

腹葉前立腺：各機関においては 30-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 14-25 で、全体の平均は 20 であった。R2 は 55%-74% で、TRT は 36%、LAB は 32% であった。LAB は精囊、尿道球腺とほぼ同じ値を示し、他の器官より低値であった。

精囊：各機関においては 30-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 16-22 で、全体の平均は 19 であった。R2 は 62%-84% で、TRT は 45%、LAB は 31% であった。TRT は測定した器官の中で最も高値を示していた。

肛門挙筋+球海綿体筋：各機関においては 30-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 8-11 で、全体の平均は 10 であった。R2 は 49%-89% で、TRT は 37%、LAB は 42% であった。

陰茎亀頭：各機関においてはいずれも 100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 4-12 で、全体の平均は 7 であった。R2 は 38%-72%

で、TRT は 30%、LAB は 37%であった。CV の全体の平均値は測定した器官内でも最小であったが、TRT も最小であった。

尿道球腺：各機関においては 30-100mg/kg 群で有意な増加がみられた。各機関の平均の CV は 14-23 で、全体の平均は 19 であった。R2 は 37%-76% で、TRT は 33%、LAB は 29%であった。

今回測定したいずれの器官においても、高用量における *p,p'*-DDE の androgen antagonistic 作用は検出可能であった。また、各器官内では精囊における CV は高いものの、TBT が高く、また LAB も低く、さらには陽性対照群に比較した場合、高用量群の低下率が高いことから感度はよいと考えられた。ただ、VCZ に比較し *p,p'*-DDE では各機関の TBT は低く、LAB は高かった。この原因には今回の *p,p'*-DDE における低用量、中用量の用量設定が関与しているのかもしれない。

また、VCZ、*p,p'*-DDE においては、固定後器官重量を測定した機関、あるいは未固定のまま測定した機関がみられたが、両者間での変動に差はみられなかった。さらに、動物系統間においても変動の差は認められなかった。

Table 1. Mean organ weights and coefficient of variance in rats given methyltestosterone (MT)

Organ	Group	Mean (MT mg) CV (%)										Overall	R-Square (%)		
		0	0.05	0.5	5	50									
<b>Ventral prostate</b>															
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV			
1	21	23	20	15	19	17	41	36	135	14	47	21		95	
2	13	44	14	36	21	36	45	19	128	28	44	33		89	
3	19	10	22	31	26	16	51	26	158	22	55	21		92	
4	19	19	21	24	20	19	32	32	151	26	49	24		91	
Overall	18 (n=24)		19 (n=24)		21 (n=24)		42 (n=24)		143 (n=24)				25 TRT	<b>90</b>	
														LAB	<b>1</b>
<b>Seminal vesicle</b>															
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV			
1	45	13	44	12	43	11	66	27	248	25	89	18		90	
2	52	24	50	14	48	27	71	30	279	24	100	24		90	
3	44	8	53	45	66	11	108	22	313	35	117	24		82	
4	40	12	37	14	35	16	41	16	184	8	67	13		98	
Overall	45 (n=24)		46 (n=24)		48 (n=24)		71 (n=24)		256 (n=24)				20 TRT	<b>81</b>	
														LAB	<b>4</b>
<b>BC/LA</b>															
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV			
1	192	15	198	10	198	8	253	14	461	11	260	12		92	
2	236	17	219	18	229	9	287	7	534	12	301	12		92	
3	202	12	204	14	213	14	254	13	482	16	271	14		88	
4	206	10	200	16	204	14	244	11	487	5	268	11		95	
Overall	209 (n=24)		205 (n=24)		211 (n=24)		260 (n=24)		491 (n=24)				12 TRT	<b>83</b>	
														LAB	<b>6</b>
<b>Glans penis</b>															
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV			
1	51	6	56	8	53	9	65	9	83	8	62	8		87	
2	49	12	51	6	50	8	55	8	73	7	56	8		82	
3	63	7	61	6	62	8	74	14	95	12	71	9		77	
4	53	5	53	5	54	3	57	5	83	4	62	4		97	
Overall	54 (n=22)		55 (n=23)		55 (n=22)		63 (n=22)		84 (n=24)				7 TRT	<b>78</b>	
														LAB	<b>19</b>
<b>Cowper's glands</b>															
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV			
1	6	24	8	22	8	24	11	33	25	4	12	22		93	
2	7	38	7	22	8	24	11	22	27	42	12	29		71	
3	8	17	8	30	9	19	12	26	22	12	12	21		86	
4	7	10	7	11	6	16	8	21	26	20	11	16		92	
Overall	7 (n=24)		7 (n=24)		8 (n=24)		10 (n=24)		25 (n=24)				22 TRT	<b>81</b>	
														LAB	<b>0</b>

TRT, R-Square values for effects of treatments.

LAB, R-Square values for effects among laboratories.

**Table 2.** Mean organ weights and coefficient of variance in rats given vinclozolin (VCZ)

Organ	Group	Mean (VCZ mg) CV (%)										Overall	R-Square (%)	
		0	3	10	30	100								
<b>Ventral prostate</b>														
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
1	137	25	119	11	91	25	61	14	36	27	89	20		80
2	97	44	112	16	105	18	79	19	34	32	85	26		62
5	184	12	150	11	137	11	98	11	51	20	124	13		77
6	106	13	99	21	84	16	75	2	39	34	81	17		91
Overall	131 (n=24)		120 (n=24)		104 (n=24)		78 (n=24)		40 (n=24)				19 TRT	60
													LAB	16
<b>Seminal vesicle</b>														
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
1	394	13	359	13	249	18	175	18	61	21	247	17		92
2	362	21	336	16	321	11	211	27	72	23	260	20		84
5	421	22	459	22	344	14	248	28	96	17	314	21		79
6	217	18	222	8	168	25	116	18	47	32	154	20		86
Overall	348 (n=24)		344 (n=24)		271 (n=24)		187 (n=24)		69 (n=24)				19 TRT	64
													LAB	19
<b>BC/LA</b>														
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
1	534	5	511	5	442	8	382	13	258	20	425	10		89
2	538	17	501	16	485	14	416	13	275	9	443	14		69
5	590	9	609	16	529	10	431	8	309	10	494	10		82
6	361	13	321	13	324	6	268	9	182	19	291	12		79
Overall	506 (n=24)		485 (n=24)		445 (n=24)		374 (n=24)		256 (n=24)				12 TRT	50
													LAB	34
<b>Glans penis</b>														
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
1	91	6	89	5	80	6	77	6	64	5	80	5		85
2	82	11	76	8	74	8	70	10	59	9	72	9		62
5	76	10	78	14	78	6	70	8	53	5	71	9		69
6	70	6	70	3	67	6	65	7	51	13	65	7		74
Overall	80 (n=24)		78 (n=24)		75 (n=23)		70 (n=24)		57 (n=24)				7 TRT	67
													LAB	29
<b>Cowper's glands</b>														
Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
1	33	18	33	16	24	27	20	15	12	20	24	19		75
2	28	22	27	11	21	27	20	12	11	17	21	18		71
5	39	11	36	21	33	16	26	22	16	35	30	21		71
6	21	6	21	25	19	18	15	19	7	24	17	18		75
Overall	30 (n=24)		29 (n=24)		24 (n=24)		20 (n=24)		12 (n=24)				19 TRT	51
													LAB	26

TRT, R-Square values for effects of treatments  
 LAB, R-Square values for effects among laboratories



Table 3. Mean organ weights and coefficient of variance in rats given p,p'-DDE

Organ	Group	Mean (p,p'-DDE mg) CV (%)										Overall	R-Square (%)	
		0	3	10	30	100	0	3	10	30	100			
<b>Ventral prostate</b>														
	Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	
	2	138	25	126	21	129	17	94	28	51	32	107	25	65
	4	115	16	101	27	103	16	75	24	49	25	89	22	65
	5	153	13	158	26	166	26	142	12	78	36	139	22	55
	6	106	12	90	7	100	18	72	19	52	16	84	14	74
	7	91	18	79	10	88	17	90	14	57	12	81	14	57
	Overall	121 (n=30)		111 (n=30)		117 (n=30)		94 (n=30)		57 (n=30)				20 TRT LAB
<b>Seminal vesicle</b>														
	Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	
	2	387	16	272	8	377	13	256	27	88	48	276	22	84
	4	237	11	219	19	251	19	157	21	83	28	190	20	78
	5	371	15	433	11	412	15	326	25	148	32	338	20	77
	6	226	22	219	13	202	7	164	22	75	16	177	16	79
	7	283	12	246	20	240	11	232	17	152	21	231	16	62
	Overall	301 (n=30)		278 (n=30)		297 (n=30)		227 (n=30)		109 (n=30)				19 TRT LAB
<b>BC/LA</b>														
	Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	
	2	550	7	522	12	519	11	459	13	300	10	470	11	79
	4	496	16	497	6	451	11	395	8	302	14	428	11	72
	5	519	2	574	7	547	7	491	11	291	11	484	8	89
	6	300	10	306	7	290	12	309	19	210	8	283	11	56
	7	436	17	430	12	407	4	408	14	312	9	399	11	49
	Overall	460 (n=30)		466 (n=30)		443 (n=30)		412 (n=30)		283 (n=30)				10 TRT LAB
<b>Glans penis</b>														
	Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	
	2	73	4	77	5	74	4	74	5	63	5	72	4	72
	4	81	8	80	4	78	6	76	7	67	10	76	7	51
	5	77	5	76	6	76	7	74	6	61	3	73	6	71
	6	67	7	62	8	66	5	65	8	57	13	63	8	38
	7	66	13	65	6	64	9	67	10	52	21	63	12	38
	Overall	73 (n=30)		72 (n=30)		72 (n=30)		71 (n=30)		60 (n=30)				7 TRT LAB
<b>Cowper's gland</b>														
	Labs	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	
	2	27	26	22	20	28	17	24	30	17	23	24	23	37
	4	30	15	28	18	25	17	24	25	12	26	24	20	67
	5	34	19	34	16	33	13	33	28	20	29	31	21	45
	6	21	11	21	15	20	6	15	19	11	20	18	14	76
	7	26	15	27	18	25	11	26	13	17	13	24	14	55
	Overall	28 (n=30)		26 (n=30)		26 (n=30)		24 (n=30)		16 (n=30)				19 TRT LAB

TRT, R-Square values for effects of treatments  
LAB, R-Square values for effects among laboratories

## 10. 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。標準物質として17- $\beta$ -Estradiol ( $E_2$ )を選び、 $E_2$ 投与後初期に発現が誘導される遺伝子群を同定するため、卵巣摘出マウスに $E_2$ 投与後4時間の各臓器の遺伝子発現パターンを解析し、臓器特異的に発現変動する遺伝子群を選別した。さらに、発現変動パターンの $E_2$ 濃度による違いおよび経時変化の検討を開始し、海馬について経時変化を、腎臓、視床下部に関して濃度による違いの結果を得た。

### A. 研究目的

極低用量の内分泌かく乱化学物質の生体影響は、明確な症状として捉えにくいと予想される。一方で、内分泌かく乱化学物質は核内レセプターを介した遺伝子発現変動を引き起こすことから、遺伝子発現変動を測定し、内分泌かく乱化学物質の生体影響を把握する試験系の開発が可能である。内分泌かく乱化学物質の影響は全身に渡る可能性があることを考慮すると、そのような試験系は、様々な臓器への影響を予測可能であることが理想的である。そのためには各臓器における性ホルモンによ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、肝臓、腎臓、視床下部、海馬等において、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、各臓器におけ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。それらの情報を元に、化合物の内分泌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の構築を目指す。

### B. 研究方法

#### 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 $\mu$ gを皮下投与した。4時間後に各臓器を採取した。溶媒対照群としてコー

ンオイル投与群を置いた。経時変化の解析に際しては、0.1 $\mu$ g, 1 $\mu$ g, 10 $\mu$ g を投与し、1, 2, 4, 8, 12, 24 時間後に各臓器を採取した。

#### マウス組織からの RNA の分離精製

マウス組織を分離後速やかに 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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ g を電気泳動し分解の有無を検討した。

#### GeneChip 解析

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5  $\mu$ 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。

#### 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

##### 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

17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) 投与後ごく初期の遺伝子発現変動を特定するために、投与後 4 時間における遺伝子発現変動を検討した。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 $\mu$ g/kg の 17- $\beta$ -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。溶媒対照群における遺伝子発現を 1 とした場合の  $E_2$  投与に伴う変動比を計算後、K-means クラスター解析 (10 グループ) し、各グループの平均変動パターンを得た。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。また、

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。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、肝臓で発現が低下する遺伝子群、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。

#### 海馬における E<sub>2</sub> 投与後の経時的遺伝子発現変動解析

子宮における E<sub>2</sub> 投与後の遺伝子発現変動は、投与後数時間と 24 時間後では大きく異なるとの情報がある (Kenneth Korach (NIEHS), unpublished data)。子宮では E<sub>2</sub> 投与後初期は主に water imbibition が起こり、10 時間後に DNA 合成が、24 時間後に細胞分裂が起こることが知られており、E<sub>2</sub> 投与に伴う遺伝子発現変化の全容を把握するためには、経時変化を把握することが重要であると考えられる。他の臓器でも E<sub>2</sub> 投与後の遺伝子発現変動は経時的なパターンを有すると考えられる。そこでまず海馬について E<sub>2</sub> 0.1, 1, 10 μg/kg 投与後 1, 4, 8, 12, 24 時間後の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、投与後初期に変動する遺伝子群、濃度依存的に変動する遺伝子群等、特徴的な遺伝子群が同定された。

#### 視床下部および腎臓における E<sub>2</sub> 濃度による遺伝子発現変化の違い

次に、E<sub>2</sub> 濃度の違いにより各臓器における遺伝子発現変化にどのような違いが生じるか調べるため、視床下部および腎臓について E<sub>2</sub> 濃度 0.1, 1, 10 μg/kg 投与後 4 時間の網羅的遺伝子発現変化の検討を実施し

た。その結果、視床下部、腎臓ともに E<sub>2</sub> 濃度依存的に発現変動する遺伝子群が捉えられた。また、それらの遺伝子群は各臓器で異なるものが多く、E<sub>2</sub> の各臓器に対する作用を担う遺伝子である可能性が考えられた。

#### D. 考察

これまでに網羅的遺伝子発現変動解析技術の導入を終了し、E<sub>2</sub> による遺伝子発現変動の解析を開始した。スライドガラス型のマイクロアレイ解析技術の導入も図り、すでに実施可能となっているが、得られるデータの信頼性が高いことから今後は主に GeneChip システムを用い、データを取得することとした。

第一段階として、臓器 5 種類、E<sub>2</sub> 1 μg/kg、投与後 4 時間の条件に絞り検討した結果、各臓器に特徴的な変動を示す遺伝子群が選別されることがわかった。次に海馬について E<sub>2</sub> 投与後の遺伝子発現変動を経時的に解析し、投与後初期に変動する遺伝子群、濃度依存的に変動する遺伝子群等を同定した。さらに E<sub>2</sub> 濃度による発現変動の違いを検討するため、E<sub>2</sub> 0.1, 1, 10 μg/kg 投与後 4 時間の視床下部、腎臓の遺伝子発現変動を解析し、濃度依存的かつ臓器特異的に変動する遺伝子群等を捉えた。

E<sub>2</sub> によって発現変動を示す遺伝子群のデータは、主に二通りの方向で利用可能である。第一にエストロゲン様作用を持つ化合物への暴露の有無を判定するのに用いる方向である。すなわち、他の内分泌かく乱化学物質による遺伝子発現変動と基礎データである E<sub>2</sub> による変動を比較し、発現パク

の類似度からエストロゲン様作用の有無を推定することができる。第二に、発現変動パターンから暴露臓器の状態を推測することも今後可能となると考えられる。すなわち、変動を示した個々の遺伝子の機能情報、既知の遺伝子発現変動パスウェイとの照らし合わせ等により、発現変動パターンの示す意味を探ることが可能となる。本テーマでは主に第一の利用法を確立することを目指しており、各臓器における E<sub>2</sub> 発現変動遺伝子群の正確な同定が第一目標となるが、第二の利用を見据え、特に注目すべき遺伝子群については機能解析を実施し意味づけを行っていく必要がある。

#### E. 結論

今年度までの検討により、アフィメトリクス社 GeneChip システムを主に用いて網羅的遺伝子発現変動解析を実施することが可能な環境を整えることができた。本システムを用い、まず、E<sub>2</sub> による遺伝子発現変動を正確に同定することを目標とし、E<sub>2</sub> 投与後初期に各臓器で発現変動を示す遺伝子群を捉えることに成功した。この結果を踏まえ、E<sub>2</sub> 投与に伴う遺伝子発現変動の経時変化、濃度依存的変化の検討にも着手し、各々の結果が得られた。以上の結果から、網羅的遺伝子発現変動解析では特に、被検物質の濃度、投与後時間の条件を揃えることが重要であることが確認された。今後はこれらを踏まえ、本研究で目標とする臓器特異的ハイスループット検出系開発のための基礎データとなる、E<sub>2</sub> による各臓器の遺伝子発現変化解析を完成させることを最優先さ

せる。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 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、シュブ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、五十嵐勝秀、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 22<sup>nd</sup> 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

H. 知的財産所有権の出願、登録状況  
特になし

## 11. 子宮肥大および Hershberger 試験に関する研究

研究者 小野 宏 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 所長

研究要旨：OECD バリデーションプロトコルに従い、卵巣摘出マウスおよび幼若マウスを用いて、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確認したほか、エストロゲン作用の疑われる既存化学物質について、マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。また、p,p'-DDE、ビンクロゾリンおよびメチルテストステロンの精巣摘出ラットを用いるハーシュバーガー試験を実施し、OECD が提唱したプロトコル案を検証した。

### A. 研究目的

A.1. 子宮肥大試験についての国際的なバリデーションは、ラットを用いて実施されてきた。そこで、マウスを用いる子宮肥大試験の検証を目的として、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、幼若マウスおよび卵巣摘出マウスを用いて実施し、ラットを用いた試験結果と比較検討した。

A.2. 弱い抗アンドロゲン作用物質および弱いアンドロゲン作用物質を用いて、OECD が提唱したハーシュバーガー試験法に関するプロトコル案を検証した。

A.3. 生体内でエストロゲン作用を示す可能性のある既存の化学物質について、卵巣摘出マウスを用いる子宮肥大試験を行い、化学物質の生体内におけるエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用の有無を検討した。

### B. 研究方法

B.1. 試験は、幼若マウスを用いた 3 日間経口投与と、幼若マウスを用いた 3 日間皮下投与、卵巣摘出マウスを用いた 7 日間経口投与および卵巣摘出マウスを用いた 7 日間皮下投与の 4 種

類を実施した。動物は、ICR 系雌マウスを使用し、その他の方法はラットのバリデーションプロトコルに準拠して実施した。EE の投与量は、幼若マウスでは経口が 0.3~150 µg/kg/day、皮下が 0.1~50 µg/kg/day、卵巣摘出マウスでは経口が 0.3~100 µg/kg/day、皮下が 0.03~10 µg/kg/day とした。対照群には、媒体のコーン油を投与した。最終投与 24 時間後に頸椎脱臼により放血・致死させ、子宮重量(wet weight と blotted weight)を測定した。

B.2. 試験は、弱い抗アンドロゲン作用を示す 1,1-bis(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethylene (p,p'-DDE)およびビンクロゾリンと弱いアンドロゲン作用を示すメチルテストステロンを用いて、実施した。動物は、精巣摘出した SD 系ラットを使用した。p,p'-DDE およびビンクロゾリンについては、3~100 mg/kg/day の用量で経口投与し、同時にアンドロゲン受容体のアゴニストであるテストステロンプロピオネイト (TP) を 0.2 mg/kg/day の用量で皮下投与した。メチルテストステロンについては、0.05~50 mg/kg/day の用量で経口投与した。投与期間は OECD のプロトコル案に準じて 10 日間とした。最終投与の 24 時間後にペントバルビタール

ナトリウム麻酔下で放血・致死させ、前立腺・精囊（凝固腺を含む）、肛門挙筋・球海綿体筋、龟头および尿道球腺の重量を測定した。

B.3. 卵巣摘出した C57BL/6J 系マウスに、被験物質として 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (THBP) または n-heptyl 4-hydroxybenzoate (HHB) を皮下投与して、エストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用を示すか否かを検査した。エストロゲン作用を調べる目的で、30~1000 mg/kg/day の被験物質を単独投与した群、陽性対照として 0.2 µg/kg/day の EE を皮下投与した群、さらには抗エストロゲン作用を調べる目的で 0.6 µg/kg/day の EE を皮下投与し、同時に 30~1000 mg/kg/day の被験物質を併用投与した群を設けた。被験物質および EE の投与期間は 7 日間とし、最終投与の最終投与 24 時間後に頸椎脱臼により放血・致死させ、子宮重量 (wet weight と blotted weight) を測定した。

## C. 研究結果

C.1. 幼若マウスを用いた子宮肥大試験では、EE 投与群の子宮重量 (blotted weight) は、経口投与で 30 µg/kg/day 以上、皮下投与で 1 µg/kg/day 以上の投与群において有意に増加した (Fig. 1)。一方、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験では、経口投与で 10 µg/kg/day 以上、皮下投与で 0.3 µg/kg/day 以上の投与群において有意に増加した (Fig. 2)。なお、幼若マウスでは膣の開口が、経口投与では 30 µg/kg/day 以上で、皮下投与では 1 µg/kg/day 以上の動物で観察された。

C.2. p,p'-DDE のハーシュバーガー試験では、いずれの器官とも用量に依存して低下し、p,p'-DDE の抗アンドロゲン作用が確認された。各器

官における p,p'-DDE のアンタゴニストとしての最小有効量は、前立腺、精囊ならびに肛門挙筋・球海綿体筋では 30 mg/kg/day、龟头および尿道球腺では 100 mg/kg/day であった (Fig.3)。ピンクロゾリンのハーシュバーガー試験においても、すべて器官が用量に依存して低下し、抗アンドロゲン作用が確認された。ピンクロゾリンのアンタゴニストとしての最小有効量は尿道球腺が 100 mg/kg/day、精囊、肛門挙筋・球海綿体筋および龟头が 30 mg/kg/day、前立腺が 100 mg/kg/day であった (Fig. 4)。メチルテストステロンのハーシュバーガー試験においては、すべて器官重量が用量に依存して増加し、アンドロゲン作用が確認された。各器官重量におけるメチルテストステロンのアゴニストとしての最小有効量は前立腺が 5 mg/kg/day、精囊、肛門挙筋・球海綿体筋、龟头および尿道球腺が 50 mg/kg/day であった (Fig. 5)。

C.3. THBP のマウス子宮肥大試験では、THBP を単独投与した群の子宮重量 (blotted weight) は、用量に依存して増加し、被験物質のエストロゲン作用が認められた (Fig. 6)。また、THBP と EE を併用投与した群の子宮重量は、100 および 300 mg/kg/day 投与群において有意に低下し、抗エストロゲン作用も認められた (Fig. 7)。子宮肥大試験における THBP のエストロゲンアゴニストおよびエストロゲンアンタゴニストとしての最小有効用量は、それぞれ 300 および 100 mg/kg/day であった。HHB のマウス子宮肥大試験では、HHB を単独投与した群の子宮重量 (Fig. 8) および HHB と EE を併用投与した群の子宮重量 (Fig. 9) に、被験物質投与の影響は認められなかった。

## D. E. 考察・結論



子宮肥大試験についての国際的なバリデーションは、ラットを用いて実施されてきた。そこで、これに対するブリッジング試験としてのマウスを用いる子宮肥大試験の検証を目的として、幼若マウスおよび卵巣摘出マウスを用い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実施し、ラットを用いた試験結果と比較検討した。

子宮肥大試験の結果をマウスとラット間で比較したところ、EE に対する感度はほぼ同じであった。また、今回実施した4種類の試験プロトコルのうち、最も感度の高かった試験は、卵巣摘出マウスを用いた7日間皮下投与方法であった。マウス子宮肥大試験の問題点としては、子宮重量が著しく軽量なため、重量を測定する前の脂肪除去や腔切断などに若干の注意が必要であると考えられた。しかし、過去に実施されたマウス子宮肥大試験の文献を見ても明らかのように、特殊な才能を必要とするほどの微細な処置を要求されるものではなく、ラットを取り扱える技術であれば短期のトレーニングにより、問題なく実施できるものである。子宮重量のばらつきの程度は、ラットの場合とほぼ同等であり、通常 CV 値は 10%~15%程度に収まる。加えて、投与検体の必要量がラットの約 1/10 量であることや、遺伝子発現変化に関する解析などを考慮すると、ラットよりも遺伝子情報が豊富なマウスは、子宮肥大試験に使用される可能性は高いと考えられる。実際に、H13~H14 年度にかけて実施した C57BL/6 を用いた子宮肥大試験は十分な感度と、再現性、安定性を持って終了しており、その際陽性比較対照として追加実施したビスフェノール A に対する試験の結果はラットに於ける反応とほぼ同等であることも再度確認された。

一方、OECD が提唱した「Hershberger 試験」のプロトコールでは、5 器官（前立腺、精囊、肛門拳筋、龟头、尿道球腺）の重量測定を推奨している。今回のバリデーション試験では、アンドロゲン作用のあるメチルテストステロン投与により、5 器官の重量が用量に相関して増

加し、抗アンドロゲン作用のある *p,p'*-DDE、ビクロゾリン投与により、5 器官の重量が用量に相関して減少し、抗アンドロゲン作用の検出が可能であることが確認された。

THBP のマウス子宮肥大試験の結果から、THBP は生体内でエストロゲン作用および抗エストロゲン作用を示すと考えられた。しかし、本試験のみではホルモン作用と内分泌攪乱作用との見極めは難しいと考えられ、遺伝子発現等の解析が重要になると思われる。なお、HHP については、今回のマウス子宮肥大試験の結果から、生体内においてエストロゲン作用または抗エストロゲン作用を示さないものと判断された。

#### F. 健康危険情報

無し

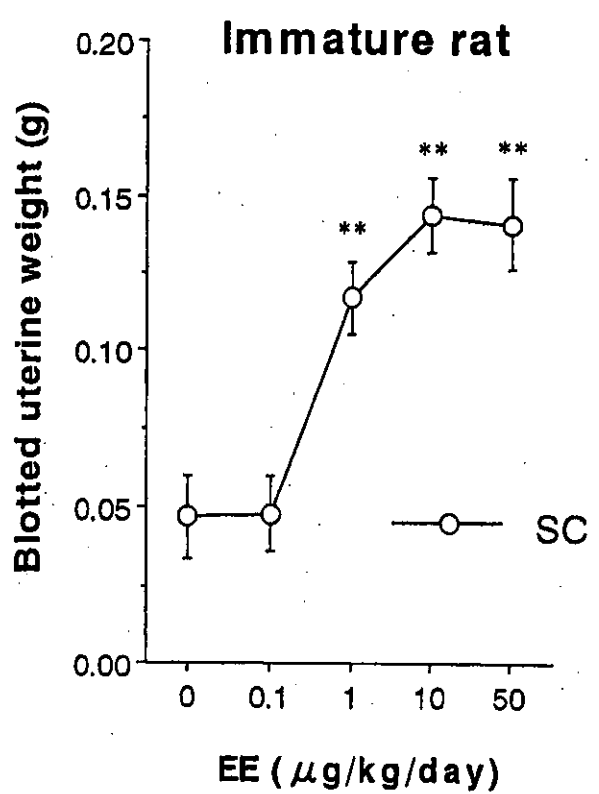
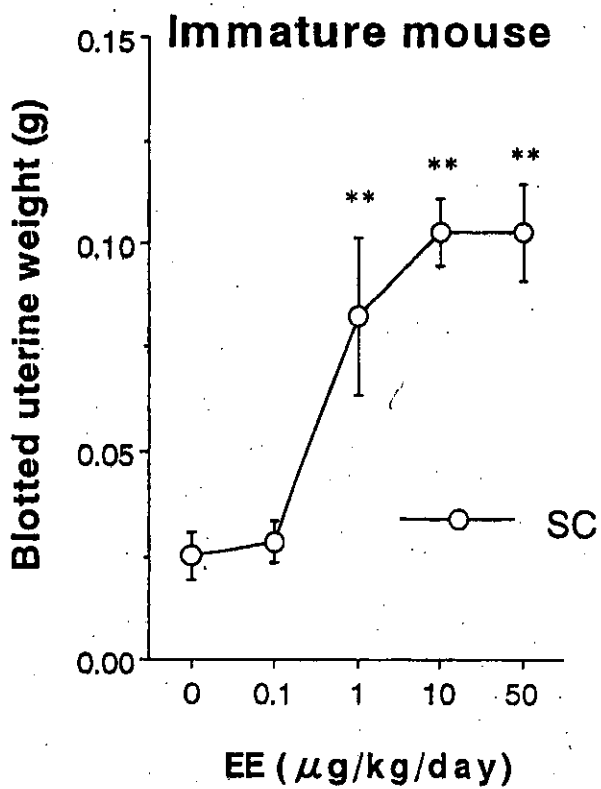
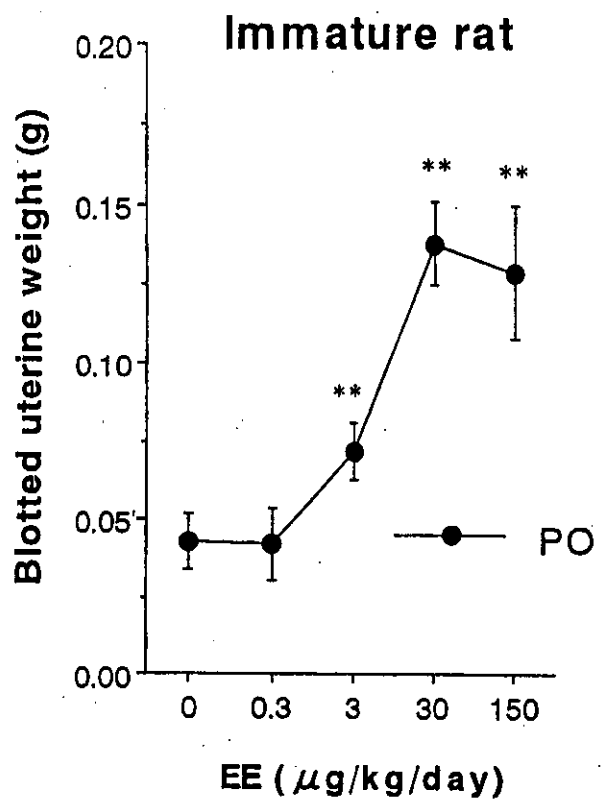
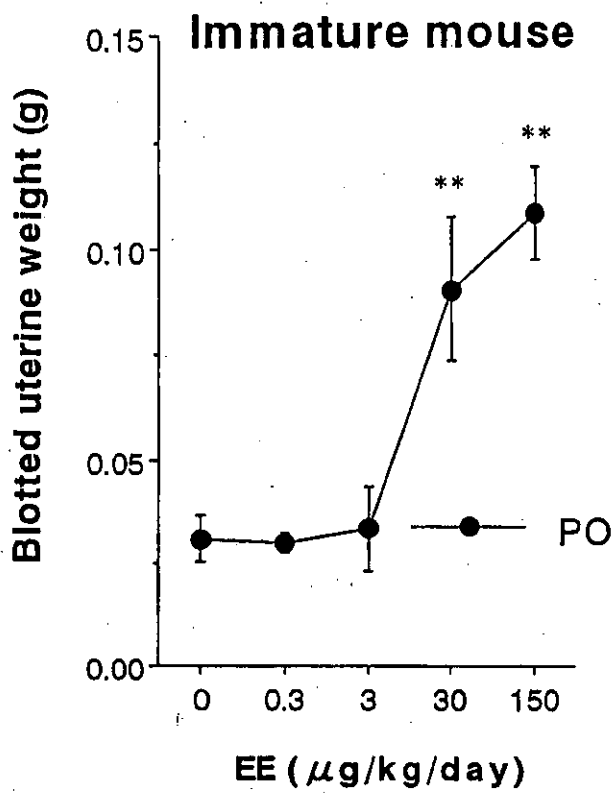


Fig. 1

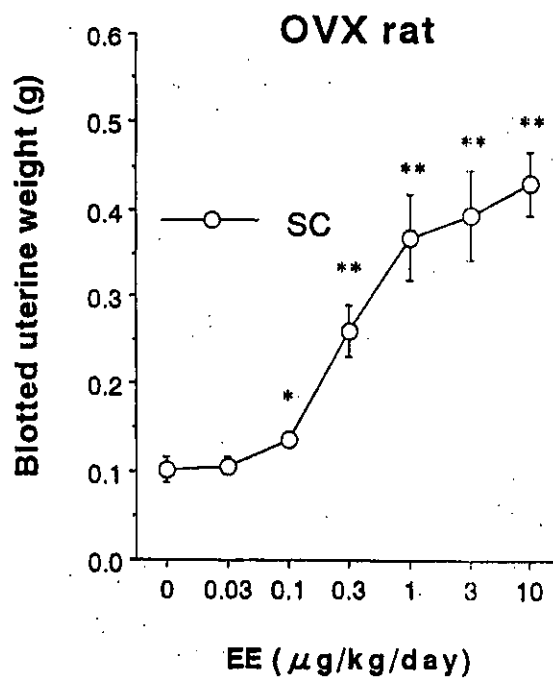
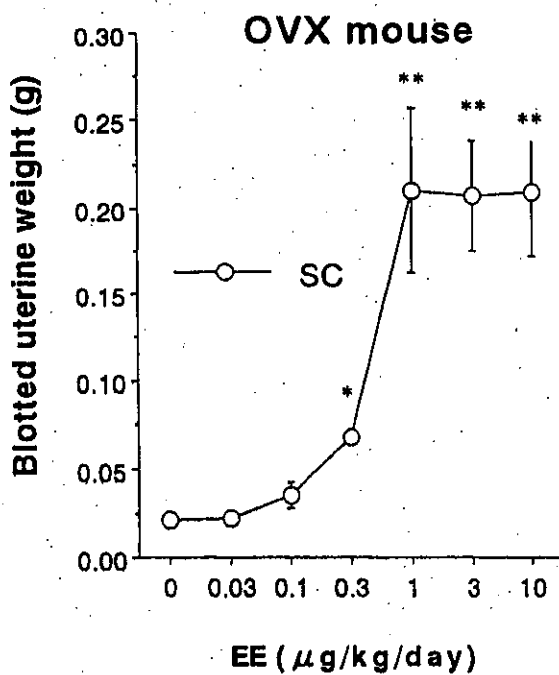
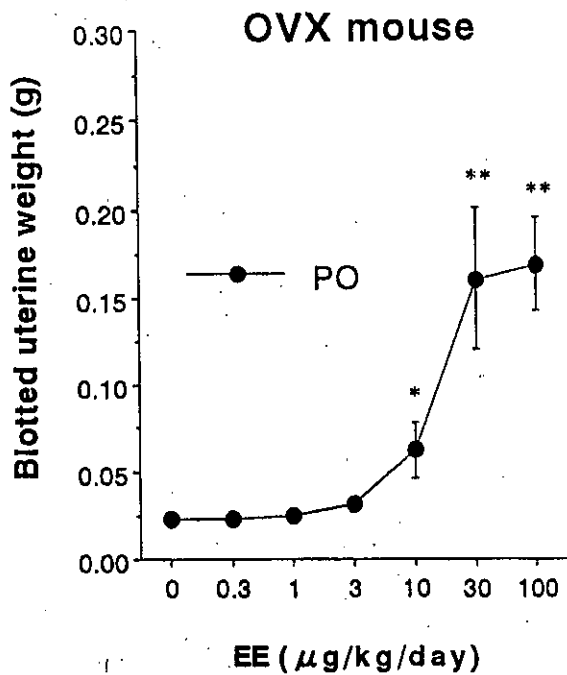


Fig. 2

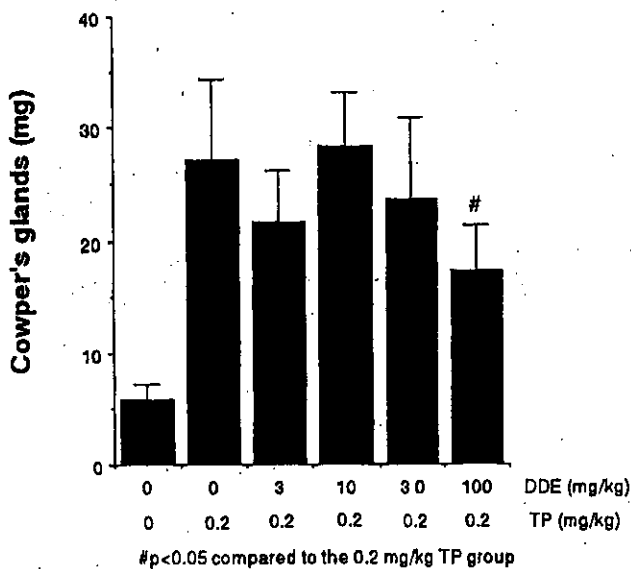
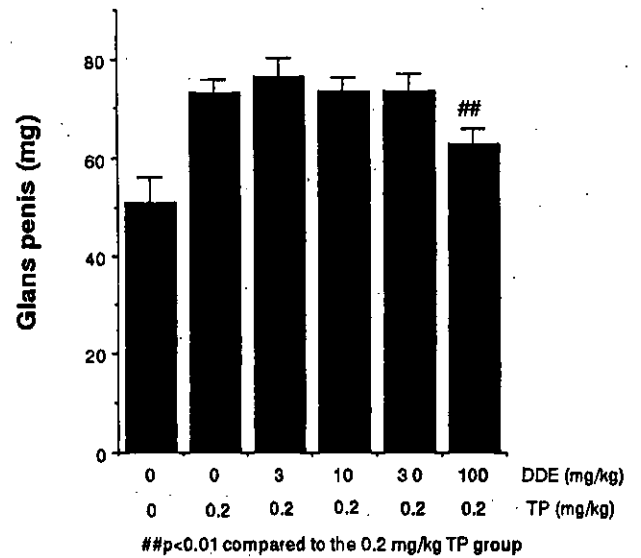
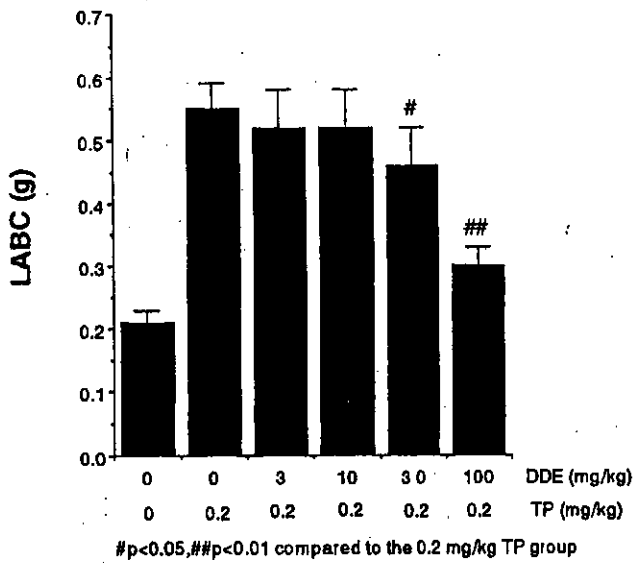
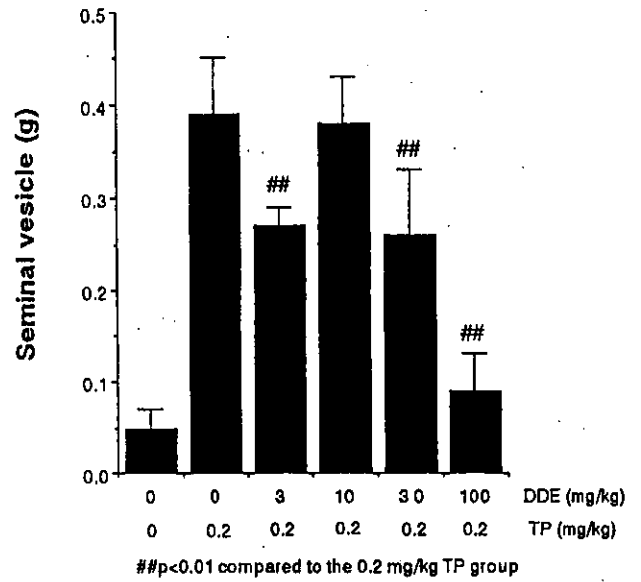
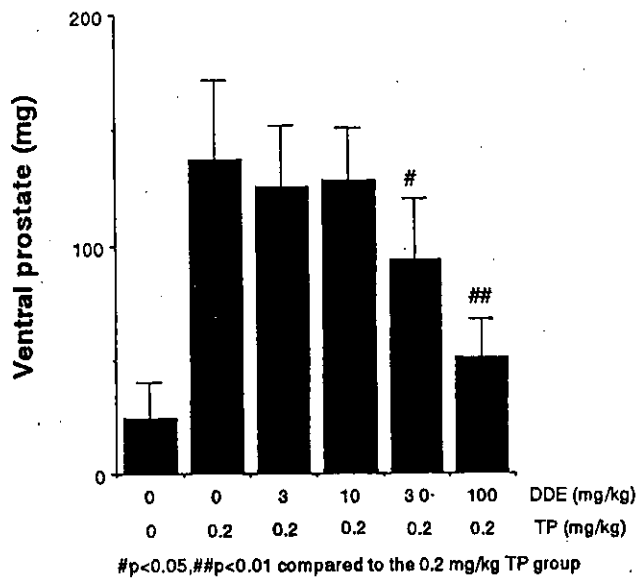


Fig. 3