

- 4) 関澤 純, 用量-反応関係の算出、環境リスクマネジメントハンドブック、朝倉書店 (印刷中)
- 5) 関澤 純「リスクアナリシス」健康・栄養食品アドバイザーテキストブック、第一出版, (印刷中)

## 2. 学会発表

- 1) 高橋美加, 関澤 純, 松田知成, AhR の内在性リガンドを考慮に入れたダイオキシンリスクの再評価、日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会要旨集 404-405 (2002.11, 広島)
- 2) 高尾雄二, 山下浩平, 高良真也, 犬童真紀子, 長江真樹、富永伸明、石橋康弘、関澤 純、宮入伸一、有菌幸司: GC/MS 分析のためのインディルビンのトリメチルシリル化、日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会要旨集 148 (2002.11, 広島)
- 3) 関澤 純, 次世代リスク評価におけるバイオアッセイの役割、第8回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性研究会合同シンポジウム (2002.9, 東京)
- 4) 関澤 純, 化学物質の人への健康影響リスク, 第22回農業環境シンポジウムおよび第2回有機化合物研究会合同シンポジウム (2002.9, つくば)
- 5) Sekizawa J & Matsuda T: Endogenous Ligands of Ah hydrocarbon Receptor and Interaction with Dioxins, 22<sup>nd</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, (2002.8, Barcelona)

## F. 知的所有権の取得状況

なし

平成14年度調査研究報告

分担研究者 井藤 悦朗 社団法人日本化学物質安全・情報センター 調査部

低用量ビスフェノール A（BPA）のヒト体内動態と、神経-甲状腺機能および行動に対する影響の生物学的蓋然性について

#### 研究要旨

ビスフェノール A（BPA）に関する論文をデータベースで経年的に検索し、また国際学会での発表を調査した。これらの情報に基づいて、ヒトに対する BPA 低用量暴露の影響を考察した。BPA は精液、羊水など、ヒトのあらゆる体液中から検出されている。しかしながら、体液中の BPA を検出する方法や検出レベルの妥当性が十分に評価されなければならない。実験動物における BPA 低用量暴露の神経影響が報告されている。これらの報告の生物学的蓋然性をさまざまな角度から検討する必要がある。発達神経毒性を評価する試験系は国際的に統一され、適切なガイドラインが策定される必要がある。化学物質のリスク管理は実際的でなければならず、その点、欧州委員会が作成しつつある BPA のリスク評価に基づくリスク削減策は利害関係者に受け入れられるものであろうと期待される。

#### A. 研究目的

BPA のヒトにおける代謝動態、および実験動物、特にげっ歯類を用いた BPA の甲状腺機能、神経系および行動に対する影響を研究した最新の報告を取り上げ、ヒトに対する神経影響について考察する。また、ヒトの男児生殖器系への影響についても言及する。

#### B. 調査研究方法

アメリカ国立衛生研究所（NIH）が構築した医学・生物学の文献データベースである Medline/PubMed からビスフェノール A (bisphenol A : BPA) を経年的に検索し、USEPA/NIEHS の Low dose panel で定義された 5mg/kg/day 以下の低用量域で実施された報告を中心に選別した。また、2002 年のアメリカ神経科学会をはじめ、国内外の学会に参加し、最新の研究を調査した。

#### C. 調査研究結果

BPA の物理化学的性質、特に水溶解性は室温で 120mg/L という事実から低用量領域での動物実験が容易である。

BPA の低用量暴露でのヒト体内動態は、ラットと異なり腸肝循環はなく、BPA は腸管で吸収されると、肝臓においてグルクロン酸抱合体となり、直ちに尿として体外へ排泄されることが報告されている。

BPA のヒト体液中濃度はどの報告も ng/mL (ppb) レベルであった。ただし、尿中の遊離 BPA 濃度は検出限界以下で、尿中では BPA のほとんどすべてがグルクロン酸抱合体であった。

男性新生児の尿道下裂の原因の一部が BPA 暴露に起因するのではないかとの懸念が表明された。

男性胎児の血漿中テストステロン濃度は妊娠期間中、第 2 trimester と出生時の 2 つの時期に 2.5ng/ml 程度のピークを示す場合と、第 2 trimester にひとつだけのピークがある場合の 2 つの研究報告が教科書に採用されている。

血中テストステロンなど、ホルモン類のイムノアッセイキットによる濃度測定結果は試薬や施設によっては大きく変動することが報告されている。

新しい試験方法を用いて、げっ歯類を対象とした BPA の神経発達・行動影響を調べた論文および学会報告が集積されつつある。これらの報告では BPA 低用量の周産期暴露によって雄動物が特に影響を受けると報告していた。その中には脳の形態学的な変化も見出していた。

生後間もないラット脳海馬切片に直接 BPA を作用させたインビトロ試験結果が示されている。シナプス形成促進、神経細胞のグルタミン酸脆弱性が増強された。

欧州委員会の BPA リスクアセスメントは最終段階にある。評価文書は全頁 280 にわたる草案として提案されている。以下、簡単に提案されている結論を示す。リスクアセスメントは大きく 2 つの分野、すなわち環境リスク、ヒトの健康リスクの観点から調査されている。ヒトの健康リスクは労働者と消費者の観点から、暴露レベルは環境からの間接暴露と、複合暴露、さらに BPA の物性に基づくリスク評価に分けてそれぞれ結論を提案している。

結論は 3 段階で、①更なる情報とあるいはまた試験が必要である。②更なる情報とあるいはまた試験あるいは既に適用されている以上のリスク削減措置は必要ない。③リスクを制限する必要がある、既に適用されているリスク削減措置が考慮されなければならない。

1) 環境リスクについては (a) BPA 製造所、エポキシレジン製造所、感熱紙製造所、PVC 製造所等を取り巻く水環境における生物への影響を考慮して、結論①を提案している。(b) 以上のような地域において排水処理施設を有する場合は、結論②である。また、(c) 再生紙工場、PVC 製造工場での BPA 添加工程ではリスク削減措置の必要性がありという結論③である。平たくいうと、これらの過程にはなるべく BPA を使用しないでくださいという提案である。2) ヒトの健康へのリスクにおいて、(a) 労働者に関しては低用量での影響が考慮されるので、結論①が提案されている。(b) BPA 製造現場、BPA を原料とする製品製造現場において、目と呼吸器過敏症を考慮して、肝臓と生殖器への影響を考慮して結論③が提案されている。すなわち、労働環境での BPA 暴露を極力低減してほしいという提案である。(c) 消費者を対象とするリスクアセスメントは、現状の暴露シナリオでは目、呼吸器、皮膚の過敏症発現リスクは低い、すなわち、結論②である。また、(d) 肝毒性、妊孕性に関しても結論②。ただし、(e) 低用量影響に関する不確実性の存在を考慮して、結論①、という提案である。3) 環境からの間接暴露については、(a) BPA の低用量影響に関する不確実性の解明を考慮して、結論①、(b) 肝毒性、妊孕性に関しては結論②、を提案している。

4) 複合暴露については、同様に (a) BPA の低用量影響に関する不確実性の解明を考慮して、結論①、(b) 肝毒性、妊孕性に関しては結論②、を提案している。

5) BPA の物理化学的性質からのリスクについては、結論②を提案している。

#### D. 考察

BPA の物理化学的特性、特に水溶解性が低用量領域での実験を容易にしている。このことがさまざまな実験的研究報告の出現を促している。

げっ歯類を対象とした BPA の神経発達・行動影響の報告は毒性影響を調べるガイドラインに則した試験方法ではなく、研究者により新たに構築された試験方法で実施されている。米国のガイドラインに則した試験方法での結果では BPA の神経毒性影響は認められないという。

母体血、臍帯血、羊水中から BPA が検出されていることから、低濃度 BPA 暴露の新生児、特に男子の発達神経および成長後の行動への影響の懸念が新たに浮上してきている。これは、実験動物、特にげっ歯類の BPA 低濃度子宮内暴露が新生仔の発達神経および成長後の行動に悪影響を示しているという結果を背景にして、BPA がエストロゲン様・抗エストロゲン様作用および甲状腺機能のかく乱作用を有するからではないかと危惧されるからであろう。したがって、これらの懸念を払拭するために、ヒトの体液中の BPA 検出方法および濃度レベルが妥当なものかどうかを検証し、さらに、男性胎児血中テストステロン濃度の変動を詳細に検証する必要がある。

甲状腺機能が脳の発達と分化に重要である。脳の高次機能の発達と分化には大きな種差が存在し、それが化学物質のヒト神経影響における生物学的蓋然性、科学的不確実性を生じさせている大きな原因であろう。したがって、げっ歯類の研究結果をどの程度ヒト影響の外挿に利用するか、さまざまな確度から検討される必要がある。

BPA のヒト体内動態はラットと大きく異なっており、BPA の暴露レベルは BPA の測定方法の妥当性が十分に評価されたうえで、推計されなければならないが、想定されるレベルよりかなり低いのではないかと考えられる。

欧州委員会の BPA リスクアセスメント提案は非常に現実的で、かつ常識的な結論を示しており、さまざまな利害関係者に対して受け入れられやすいであろう。また、科学的に不確実性が存在するならば、現状でのリスク削減措置以上の措置は必要ないとしながらも、低用量域での情報と実施可能な試験の積み重ねによって、その不確実性を低減するとともに、更なる情報を基に現状のリスク削減措置の改善を探っていこうとしているように伺われる。

#### E. 結論

BPA の生体試料中の濃度を検出する測定方法と濃度レベルの検証が必要である。

男性胎児血中テストステロン濃度の変動を詳細に検証する必要がある。

げっ歯類における発達神経・行動に影響する BPA の作用メカニズムを明らかにする必要がある。

げっ歯類の BPA 暴露による神経・行動影響研究結果をヒトに外挿する場合、BPA 影響の生物学的蓋然性があらゆる角度から検討されるべきである。

工業用化学物質の発達神経毒性を評価する適切な国際的に統一されたガイドラインの整備が必要である。

BPA のリスクアセスメントおよびリスク管理は広範囲な疫学調査や科学的にしっかりした試験と収集された情報の適切な評価を経たうえで、的確に実施されるべきである。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

#### 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

3. その他 (データベース等)

低用量estrogenic chemicalsによる前立腺重量、発育などに対する影響の研究

杉村芳樹 三重大学医学部泌尿器科学

研究要旨

生長初期の前立腺における短期間のエストロゲン暴露がおよぼす影響について形態的な検討をした。生直後の雄マウスに3日間diethylstilbestrol (DES)を投与して、60日後に前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖して形態測定と組織学的検討を行った。DES投与群では前立腺腺管分枝形態発生は著しく抑制され、一部では異常な結節状の変化を認めた。エストロゲン受容体 (ER) の免疫染色により、生後初期のマウス前立腺においても間質細胞にER- $\alpha$ が存在することから、前立腺発生初期のDES暴露は間質細胞のエストロゲン受容体を介して、長期間にわたる影響を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

前立腺にはエストロゲン受容体 (ER- $\alpha$  および ER- $\beta$ ) が存在し、エストロゲンが何らかの直接作用を持つことは明らかである。また、下垂体性ゴナドトロピンを抑制しアンドロゲンを低下させるため間接的に前立腺に影響を与える。本研究では、in vivoにおけるエストロゲンの前立腺形態発生に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

生直後の雄 Balb/C マウスに3日間diethylstilbestrol (DES) 0.5 $\mu$ gを投与して、60日後に前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖して2次元的な腺管分枝構造に注目し形態測定と組織学的検討を行った。コントロールとしてはoil投与群をおき、dihydrotestosterone (DHT)の単独あるいはDESと同時投与群の検討も加えた。生長初期前立腺におけるエストロゲン受容体 (ER- $\alpha$ および ER- $\beta$ ) の発現については免疫染色にて検討した。

(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、本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、当研究施設はそのモデル施設となっている。また、当研究申請者は、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。

C. 研究結果

要約：DES投与群では前立腺腺管分枝形態発生は著しく抑制され、異常な結節状の変化を認めた。免疫染色により、生後初期のマウス前立腺においても間質細胞にER- $\alpha$ が存在し、上皮細胞にはER- $\beta$ の発現を認めた。前立腺腺管の形態発生の指標として腺管先端数を比較すると、DES群は、コントロール群に比べ腹葉で60%、後側葉で80%以上減少した。このDESによる抑制作用はDHTの同時投与によっても回避できなかった。テストステロン値においてもDES群では約80%減少しており、形態発生の抑制と同じ動態を示した。DES群の後側葉においては90%以上において、結節状の異常腺管構造を認め、組織学的には炎症細胞浸潤と異型上皮細胞を含むものの癌組織病変は認めなかった。エストロゲン受容体 (ER- $\alpha$ ) の免疫染色では、生直後のマウス前立腺においても間質細胞に存在したが上皮には認めなかった。一方、ER- $\beta$ は生直後の前立腺の間質を上皮細胞に発現していた。生後5日目には上皮細胞にER- $\alpha$ の発現を認めた。

#### D. 考察

生長初期の前立腺におけるエストロゲン暴露の及ぼす影響には、直接作用あるいは脳下垂体系によるフィードバックによる間接的な作用機構があり複雑である。本研究では生長初期のマウス前立腺において合成エストロゲン剤である DES の短期投与により生長後に重篤な病変を来すことがあらためて示された。とくに、前立腺増殖機構において重要である腺管分枝形態発生が著しく抑制されるとともに異常腺管構造の発生を促したことから、エストロゲンに前立腺に対する催奇形作用が示唆された。Singh ら (J. Endocrinology, 1999) は同様の実験を行い DES 5  $\mu$ g の 2 日間の投与により生長後の腹葉において、約 37% の腺管分枝形態発生の抑制と異常形態の発生を報告している。我々は 1/10 量の DES を 3 日間投与したが、ほぼ同様の結果が得られたが、とくに後側葉においては上皮細胞の異型のみならず腺管の融合および異常分枝など腺管構造自体の異常を誘導した。今後さらに低容量のエストロゲン剤の作用についての検討が必要と考えられ、目下検討中である。なお、エストロゲン作用が直接的に前立腺に作用するためにはエストロゲン受容体が必要であると考えられ、免疫組織学的に検討したが、生直後においては ER- $\alpha$  は間質細胞に存在するが上皮には ER- $\beta$  のみが存在することが示され、エストロゲン作用は間質細胞を介して前立腺の異常形態発生を促す機構が考えられた。この研究システムによるエストロゲン受容体とくに ER- $\beta$  の作用については今後さらに検討が必要である。

#### E. 結論

生長初期の前立腺において、短期間のエストロゲン暴露により生長後の長期間にわたる影響が明らかとなった。とくに腺管構造の異常が認められ、間質細胞のエストロゲン受容体を介した直接作用が示唆された。今後さらにエストロゲンの前立腺に対する直接作用の分子機構についての検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hamajima N, Matsuo K, Iwata H, Shinoda M, Yamamura Y, Kato T, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Kagami Y, Ogura M, Ando M, Sugimura Y, Tajima K: NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism and the risk of eight cancers for Japanese. *Int J Clin Oncol* 7: 103-8, 2002.

Takahashi S, Suzuki S, Inaguma S, Cho YM, Ikeda Y, Hayashi N, Inoue T, Sugimura Y, Nishiyama N, Fujita T, Ushijima T, Shirai T: Down-regulation of Lsm1 is involved in human prostate cancer progression. *Br J Cancer* 86: 940-6, 2002.

Takahashi S, Suzuki S, Inaguma S, Ikeda Y, Cho YM, Nishiyama N, Fujita T, Inoue T, Hioki T, Sugimura Y, Ushijima T, Shirai T: Down-regulation of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) expression correlates with tumor progression in human prostate cancers.

*Prostate* 50: 154-61, 2002.

Iguchi K, Usui S, Inoue T, Sugimura Y, Tatematsu M, Hirano K: High-level expression of zinc transporter-2 in the rat lateral and dorsal prostate. *J Androl* 23: 819-24, 2002.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

##### 3. その他 (データベース等)

なし

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告書

低用量暴露による遺伝子発現、タンパク発現データの解析による  
ホメオスタシスの検討

分担研究者 福島 昭治 大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨： $\alpha$ -Benzene hexachloride ( $\alpha$ -BHC)のラット肝発がん作用を diethylnitrosamine (DEN)をイニシエーターとする発がん二段階法を用いて検討した。 $\alpha$ -BHC の高用量投与 (50, 500 ppm) は肝前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性細胞巢の発生を促進し、低用量投与 (0.01~1 ppm) は逆に抑制傾向をもたらした。また、酸化ストレスのマーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)の形成レベルは $\alpha$ -BHC, 500 ppm では増加し、0.1, 1, 50 ppm では減少した。CYP2B1 蛋白量は低用量で減少傾向を示した。以上、GST-P 陽性細胞巢の結果から、 $\alpha$ -BHC の発がん作用にはホルミシスの現象があることが判明した。

A. 研究目的

我々は発がん物質 Phenobarbital のホルミシス現象を明らかにした。本研究では発がん性をもつ内分泌かく乱化学物質のその作用にホルミシス現象があるかどうかを検証する。

B. 研究方法

6 週齢の雄性 F344 ラット、296 匹を用いた。DEN, 100 mg/kg 体重を週 1 回、3 週にわたって腹腔内投与した後、プロモーションの段階に $\alpha$ -BHC を 0, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 50 および 500 ppm の用量で 10 週間、混餌投与した。実験開始 13 週にてラットを屠殺し、肝を種々の方法で検索した。

(倫理面への配慮)

屠殺にあたってはエーテル麻酔下にて脱血して行った。また、医学研究科の実験動物取り扱い規程に対応し

てラットを飼育した。

C. 研究結果

$\alpha$ -BHC の高用量投与 (50, 500 ppm) は肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生を促進し、低用量投与 (0.01~1 ppm) は逆に抑制傾向をもたらした。(なお、このデータは各群 12 匹中 6 匹を集計したものである。) また、酸化ストレスのマーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine の形成レベルは $\alpha$ -BHC, 500 ppm では増加し、0.1, 1, 50 ppm では減少した。CYP2B1 蛋白量は低用量で減少傾向を示した。

D. 考察

GST-P 陽性細胞巢の結果から、 $\alpha$ -BHC の発がん作用にはホルミシスの現象があることが判明した。GST-

P 陽性細胞の発生に 8-OHdG の形成が強く関連していると考えられるが、50 ppm におけるそれらの逆相関関係については今後の検討が必要である。現在、RT-PCR および cDNA マイクロアレイを用いて CYP450 の発現を詳細に検討中である。

#### E. 結論

$\alpha$ -BHC のラット肝発がん作用を DEN をイニシエーターとするラット肝二段階法で検討した。肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生は高用量投与群では増加し、低用量群では抑制傾向を示すというホルミシス現象が認められた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nakae D, Konishi Y, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F, Wakabayashi K, Totsuka Y.

Lack of a dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline or N-nitrosodiethylamine. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1076-1082.

2) O Sukatata T, Uwagawa S, Ozaki K, Ogawa M, Nishikawa T, Iwai S, Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Funae Y, Okuno Y, Fukushima S. Detailed low-dose study of 1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane carcinogenesis suggests the possibility of a hormetic effect. *Int J Cancer* 2002; 99: 112-118.

3) Iwai S, Karim R, Kitano M, Sukata, T., Wei, M., Morimura K, Wanibuchi H, Fukushima S. Role of oxidative DNA damage caused by carbon tetrachlorede-induced liver injury - enhancement of MeIQx-induced glutathione S-transferase placental form-positive foci in rats. *Cancer Lett* 2002; 179: 15-24.

4) O Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Ogawa M, Masuda C, Morimura K, Funae Y, Fukushima S. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital; association with expression profiles of p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis* 2002; 23: 341-349.

5) O Seike N, Wanibuchi H, Morimura K, Nishikawa T, Kishida H, Nakae D, Hirata K, Fukushima S. Lack of promoting effect due to oral administration of dimethylarsinic acid on rat lung carcinogenesis initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Lett* 2002; 175: 113-119.

##### 2. 学会発表

1) 鰐淵英機、森村圭一朗、津田洋幸、白井智之、中江 大、小西陽一、立松正衛、福島昭治: MeIQx と DEN の低用量複合投与によるラット肝発がん性のリスク評価。ワークショップ、第 61 回日本癌学会総会、10 月 1-3 日、東京、2002 (日本癌学会総会記事 1081, p.49)

2) 木下アンナ、鰐淵英機、森村圭一朗、魏 民、沈 鈞、今岡 進、



船江良彦、福島昭治：Phenobarbital at low dose suppresses rat hepatocarcinogenesis by altering cell proliferation, apoptosis and inhibiting oxidative DNA damage. ワークショップ，第 61 回日本癌学会総会，10 月 1-3 日，東京，2002（日本癌学会総会記事 1556, p.54）

3) プアタナチヨックチャイ ラウイワン、加国雅和、鱒渕英機、木下アンナ、三橋 誠、箱井加津男、福島昭治: TGF- $\alpha$  トランスジェニックマウスにおける Diethylnitrosamine 誘発肝発癌に及ぼすヘフェノバルビタールの影響. 第 61 回日本癌学会総会，10 月 1-3 日，東京，2002（日本癌学会総会記事 2189, p.212）

#### 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
3. その他（データベース等）  
なし

分担研究課題：甲状腺ホルモンかく乱物質に対する感受性の動物種差の解明

分担研究者 加藤 善久 静岡県立大学 薬学部講師

研究要旨：マウス、ハムスター、ラット、モルモットに 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB)、2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl(HexaCB) 及び Kanechlor-500 (KC500)を投与する時、血清中総サイロキシン(total T<sub>4</sub>)及び総トリヨードサイロニン濃度の低下、肝 UGT1A1/6 の誘導及び各 PCB の代謝能に動物種差があることが明らかになった。マウスに HexaCB を、あるいはモルモットに KC500 を投与した時、血清中 total T<sub>4</sub>濃度の低下には、肝臓の UGT1A1/6 の誘導が関与している可能性が示唆された。一方、マウス、ハムスター、特にラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時、その低下には肝臓の UGT1A1/6 活性の関与はほとんどなく、別の作用機序が関与している可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

PCB 投与による各動物の甲状腺ホルモン濃度低下作用と、PCB の代謝ならびに UDP-glucuronosyltransferase(UDP-GT) 活性の変動の種差との関連性、さらに血清中サイロキシン(T<sub>4</sub>)濃度の低下作用メカニズムについて解析することを本研究の目的とした。

#### B. 研究方法

ddy 系マウス、Syrian 系ハムスター、Wistar 系ラット、Hartley 系モルモットあるいは Gunn ラットに、2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB)、2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl (HexaCB)及び Kanechlor-500(KC500)を腹腔内投与し、投与後 4 日に血清中甲状腺ホルモン濃度及び T<sub>4</sub> の消失クリアランスを測定するとともに、肝ミクロソームにおける抱合活性及び特異的ペプチド抗体を用いた UGT 分子種の発現量、肝臓中のメチルスルホン (MeSO<sub>2</sub>)代謝物及び水酸化(OH)体濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、*in vivo* での代謝、甲状腺ホルモン濃度及び UDP-GT 活性の変動の種差を再現しうる培養系細胞あるいはそれに代わる実験系がないため、やむを得ず実験動物を使用したが、その使用数は最小限にとどめ、実験動物に対して苦痛を与えない十分な配慮をした。

#### C. 研究結果

種々の用量の PentaCB、HexaCB 及び KC500 をマウスに投与すると、血清中総サイロキシン(total T<sub>4</sub>)濃度は投与量の増加に伴って低下した。マウスにおいて、血清中 total T<sub>4</sub>濃度を 50%低下させる投与量(ED<sub>50</sub>)は、PentaCB では 11 mg/kg、HexaCB では 19 mg/kg、KC500 では 37.5 mg/kg であった(Fig. 1)。本実験の投与量は、これらの ED<sub>50</sub>を用いた。

血清中 total T<sub>4</sub>濃度はマウス、ハムスター及びラットに PentaCB(11 mg/kg)投与後、マウスに HexaCB(19 mg/kg)を投与後、また 4 種の動物に KC500(37.5 mg/kg)投与後、有意に低下した。血清中総トリヨードサイロニン(total T<sub>3</sub>)濃度はマウスに PentaCB を投与した時、あ

るいはモルモットに KC500 を投与した時に有意に低下した。血清中甲状腺刺激ホルモン (TSH) 濃度は、4 種の動物にいずれの PCB を投与した場合にも変化しなかった。

KC500 投与後 15 分に、いずれの動物においても血清から  $^{125}\text{I-T}_4$  の消失クリアランスは用量の増加に伴って増加した (Fig. 2)。KC500 投与後 2 時間にわたって、血清中  $^{125}\text{I-T}_4$  濃度は対照群より低かった。この低下は、マウス、モルモットより、ハムスター、ラットにおいて顕著であった。

$\text{T}_4$ -UDP-GT 活性は、マウスに HexaCB 投与後、あるいはモルモットに KC500 投与後、有意に増加した。一方、ハムスター及びラットにいずれの PCB を投与した時にも、この活性は全く変化しなかった (Fig. 3)。3 種の PCB を投与した時、ラットの UGT1A の発現量が増加した。また、KC500 を投与したモルモットにおいて UGT1A の発現量が増加した。一方、マウスではいずれの PCB を投与しても UGT1A の発現量は変化しなかった。

4 種の動物に PentaCB 投与後、肝臓中総  $\text{MeSO}_2$  体濃度はマウスにおいて最も高く、続いてモルモット>ラット>ハムスターの順であった。また、HexaCB 投与後、肝臓中総  $\text{MeSO}_2$  体濃度は、モルモットにおいて最大となり、続いてマウス>ラット>ハムスターの順であった。KC500 投与後、肝臓中総  $\text{MeSO}_2$  体濃度はマウスにおいて最大となり、モルモットではその 1/2、ラットでは約 1/3、ハムスターでは約 1/6 であった。各動物に PentaCB 投与後、肝臓中 mono-OH 体及び di-OH 体濃度はいずれもラットにおいて最大となり、続いて mono-OH 体ではモルモット>マウス>ハムスターの順であり、di-OH 体ではハムスター>モルモット>マウスの順であった。また、HexaCB 投与後の肝臓中 mono-OH 体濃度は、マウス>ラット>ハムスター>モルモットの順であり、di-OH 体濃度は、ラット>ハムスター>モルモット>マウスの順であった。一方、KC500 投与後の肝臓中総 OH 体

濃度はモルモットにおいて著しく高く、ハムスターではその約 1/4、ラットでは約 1/10、マウスでは約 1/25 であった。

PentaCB (112 mg/kg) 及び KC500 (100 mg/kg) 投与により、Wistar 系ラットでは  $\text{T}_4$ -UDP-GT (UGT1A1 及び 1A6) の発現量やその活性が顕著に上昇したのに対して、Gunn ラットでは全く変化しなかった (Table 1)。一方、血清中 total  $\text{T}_4$  濃度には両ラットともに同程度の著しい低下が認められ、total  $\text{T}_3$  及び TSH 濃度には両ラットともにほとんど変化は見られなかった (Table 2)。

#### D. 考察

本実験の結果から、PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与による血清中 total  $\text{T}_4$ 、total  $\text{T}_3$  濃度の低下及び 3 種の PCB の代謝において、マウス、ハムスター、ラット、モルモット間に明白な種差があることが示された。また、KC500 投与後いずれの動物においても、 $\text{T}_4$  の血中からの消失速度は対照群より増加することが示された。

一般に、血清中  $\text{T}_4$  濃度の低下の要因として、甲状腺濾胞上皮細胞における  $\text{T}_4$  の合成系の抑制、 $\text{T}_4$  のグルクロン酸抱合をはじめとする  $\text{T}_4$  の代謝系の促進などいくつかのメカニズムのかく乱が考えられる。また、 $\text{T}_4$  の代謝を促進する主な UDP-GT 分子種は、UGT1A1 及び UGT1A6 であることが報告されている。今回、 $\text{T}_4$ -UDP-GT 活性は、マウスに HexaCB 投与後、あるいはモルモットに KC500 投与後にのみ有意に増加した。これらの結果から、マウスに HexaCB を投与した時、あるいはモルモットに KC500 を投与した時の血清中  $\text{T}_4$  濃度の低下には、肝臓の UDP-GT (UGT1A1 及び UGT1A6) の誘導による  $\text{T}_4$  の代謝促進による  $\text{T}_4$  の消失を含むことが示唆された。

PCB の OH 体は血中  $\text{T}_4$  の輸送タンパクである transthyretin (TTR) と結合すること、さらに、そのことが  $\text{T}_4$  の血中での標的器官への輸送

を阻害し、血中  $T_4$  濃度を低下させる一因となる可能性があることが報告されている。これらのことから、マウス、ハムスター、ラット及びモルモットにおいて PentaCB、HexaCB あるいは KC500 投与による血清中  $T_4$  濃度の低下の一因は、OH-PCB と TTR とが結合することによる可能性が考えられる。特に、KC500 を投与したモルモットでは PCB の OH 体の生成量が著しく多いことから、KC500 投与モルモットにおける血清中  $T_4$  濃度の低下には、肝臓の UDP-GT の誘導による  $T_4$  の代謝促進に加えて、OH-PCB と TTR との結合が  $T_4$  低下の一因となっている可能性が考えられる。

すでに、著者らは、3-及び 4-MeSO<sub>2</sub>-PentaCB、及び 3-MeSO<sub>2</sub>-HexaCB などの 7 種類の MeSO<sub>2</sub>-PCBs は、UGT1A1/6 を誘導することにより、血中  $T_4$  の代謝を亢進し、血中  $T_4$  濃度の低下を引き起こすことを報告している。そこで、3 種の動物の PCB 投与による血清中  $T_4$  濃度の低下に MeSO<sub>2</sub> 代謝物が寄与しているか否かを検討した。しかし、3 種の PCB 投与後の各動物の血清中  $T_4$  濃度の低下と肝臓中 MeSO<sub>2</sub> 代謝物濃度との間に相関が見られなかった。

Wistar 系ラット及び Gunn ラットに PentaCB 及び KC500 を投与後、血清中 total  $T_4$  濃度は両ラットとも同程度に著しく低下した。この時、Wistar 系ラットにおいて  $T_4$ -UDP-GT 活性及び UGT1A の発現量は顕著に増加した。一方、Gunn ラットでは  $T_4$ -UDP-GT 活性の変化及び UGT1A の発現は全く認められなかった。これらの結果から、UDP-GT の発現や活性上昇が見られない Gunn ラットでも  $T_4$  濃度の低下が惹起されることが明らかとなり、この低下は UDP-GT 非関与の別の作用機序によることが強く示唆された。このことから、Wistar 系ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時の血清中  $T_4$  濃度の低下においても、肝の UDP-GT 活性の増加以外に別の作用機序が関与している可能性が考えられる。

## E. 結論

マウス、ハムスター、ラット、モルモットに PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与する時、血清中 total  $T_4$ 、total  $T_3$  濃度の低下、肝 UGT1A1/6 の誘導、及び各 PCB の MeSO<sub>2</sub> 体及び OH 体への代謝能に動物種差があることが明らかになった。さらに、マウスに HexaCB を、あるいはモルモットに KC500 を投与した時、血清中  $T_4$  濃度の低下には、肝臓の UGT1A1/6 の誘導が関与している可能性が示唆された。一方、マウス、ハムスター、特にラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時、 $T_4$  濃度の低下には、肝臓の UGT1A1/6 の関与はほとんどなく、別の作用機序が関与している可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① . Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoaki Yamazaki, Yuriko Ito, Shoji Miyajima, Kiyomitsu Nemoto, Nobuyuki Koga, Ryohei Kimura and Masakuni Degawa: Effects of polychlorinated biphenyls, Kanechlor-500, on serum thyroid hormone level in rats and mice. *Toxicol, Sci.*, (2003) in press.
2. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Sinya Yumoto, Tomoaki Yamazaki, Yasuhiro Nagano, Nobuyuki Koga, Yoshito Masuda and Ryohei Kimura: Metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, 3-methylsulphonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a potent inducer of CYP2B1/2 in rat. *Xenobiotica*, **32**, 289-303 (2002)
3. Yoshihisa Kato and Ryohei Kimura: The contribution of 2,3,5-trichlorophenyl methyl sulfone, a metabolite of 1,2,4-trichlorobenzene, to the  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase induction by 1,2,4-trichlorobenzene in rat liver. *Chemosphere*, **47**, 1-7 (2002)

## プロシーディング

1. Yoshihisa Kato, Yuriko Ito, Koichi Haraguchi, Tomoaki Yamazaki, Ryohei Kimura: The induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by the methylsulfonyl metabolites of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 346 (2002)
2. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Shinichi Ikushiro, Yuriko Ito, Koichi Haraguchi, Takashi Iyanagi, Ryohei Kimura, Masakuni Degawa: Relation between the increase in hepatic UDP-GT and the decrease in serum thyroxine level in Kanechlor-500-treated rats. *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 346 (2002)
3. Yoshihisa Kato, Yuriko Ito, Kanako Yasuoka, Tomoaki Yamazaki, Masakuni Degawa, Ryohei Kimura and Koichi Haraguchi: Effects of PCBs and organochlorine pesticides extracted from cetacean products on serum biochemical parameters and hepatic drug-metabolizing enzyme activities in mice. *Environ. Sci.*, **9**, 177 (2002)
4. Mari Kato, Masaharu Akita, Koichi Haraguchi, Kanako Yasuoka, Tetsuya Endo, Yoshihisa Kato and Atsushi Yokoyama: Effects of organohalogen contaminants extracted from small cetacean products on cultured rat embryos. *Environ. Sci.*, **9**, 177 (2002)
5. Koichi Haraguchi, Tetsuya Endo, Kanako Yasuoka, Yoshiko Araki, Yoshihisa Kato and Frank Cipriano: Contamination by mercury, PCBs and organochlorine pesticides in small cetacean products purchased in Japan. *Environ. Sci.*, **9**, 228 (2002)

## 2. 学会発表

1. 原口浩一、加藤善久、安岡佳名子、古賀

信幸、出川雅邦、木村良平: Non-planar PCB の Wistar ラット及び Gunn ラット代謝: Dihydroxy 体の生成と組織、血液残留性. フォーラム 2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー (広島)、講演要旨集、p.128、2002年10月25日

2. 古賀信幸、原口浩一、金丸知代、加藤善久、木村良平: 4-Methylthio-2,2',4',5,5'-五塩素化ビフェニル(CB101)の *in vitro* 代謝の動物種差. フォーラム 2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー (広島)、講演要旨集、p.77、2002年10月25日

3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Yuriko Ito, Atsushi Shiga, Akinori Shoji and Ryohei Kimura: Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by methylsulfonyl metabolites of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl in rats. *22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)*, (Barcelona, Spain), *Organohalogen Compounds*, **56**, 5-8 2002, Aug. 15

4. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Shinichi Ikushiro, Yuriko Ito, Koichi Haraguchi, Takashi Iyanagi, Ryohei Kimura and Masakuni Degawa: Relation between the increase in hepatic UDP-glucuronosyltransferase and the decrease in serum thyroxine level in Kanechlor-500-treated rats. *22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)*, (Barcelona, Spain), *Organohalogen Compounds*, **56**, 85-87 2002, Aug. 12

5. Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Nobuyuki Koga, Masakuni Degawa, Ryohei Kimura and Yoshito Masuda: Species difference in tissue retention of PCB metabolites after *in vivo* exposure of 2,4,5,2',5'-penta- and 2,3,4,2',3',6'-hexachlo-

robiphenyls. *22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)*, (Barcelona, Spain), *Organohalogen Compounds*, **56**, 33-36 2002, Aug. 15

6. Nobuyuki Koga, Koichi Haraguchi, Tomoyo Kanamaru, Yoshihisa Kato, Ryohei Kimura: Metabolism of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) by guinea pig liver microsomes. *22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)*, (Barcelona, Spain), *Organohalogen Compounds*, **56**, 17-20 2002, Aug. 15

7. Masaharu Akita, Mari Kato, Tetsuya Endo, Yoshihisa Kato, Atsushi Yokoyama and Koichi Haraguchi: Teratogenic effects of organohalogen contaminants extracted from small cetacean products on *in vitro* rat embryos during organogenesis. *22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)*, (Barcelona, Spain), *Organohalogen Compounds*, **55**, 421-423 2002, Aug. 12

8. 宮島省治、濱地勇希、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦: Kanechlor500 投与時のマウスの肝臓および精巣におけるコレステロール/テストステロン生合成・代謝系関連酵素遺伝子の発現変動. 第 48 回日本薬学会東海支部大会(静岡)、講演要旨集、p.13、2002 年 7 月 6 日

9. 濱地勇希、宮島省治、根本清光、加藤善久、木村良平、原口浩一、出川雅邦: Non-planar PCB 投与時のマウスおよびラットの肝臓および精巣におけるコレステロール/テストステロン生合成・代謝関連酵素遺伝子の発現変動. 第 48 回日本薬学会東海支部大会(静岡)、講演要旨集、p.13、2002 年 7 月 6 日

10. 加藤善久、山崎友朗、生城真一、伊藤由里子、原口浩一、井柳 堯、木村良平、出川雅邦: Kanechlor-500 投与ラットにおける血清中サイロキシシン濃度の低下と肝 UDP-glucuronosyltransferase 活性との関連性. 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会(名古屋)、講演要旨集、p.191、2002 年 6 月 18 日

11. 加藤善久、伊藤由里子、原口浩一、山崎友朗、木村良平: 2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl (TetraBrB) のメチルスルホン代謝物のラット肝 UDP-glucuronosyltransferase の誘導. 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会(名古屋)、講演要旨集、p.192、2002 年 6 月 18 日

12. 宮島省治、濱地勇希、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦: Kanechlor500 投与時のマウスおよびラットの肝臓および精巣におけるコレステロール/テストステロン生合成・代謝系酵素遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 122 年会(千葉)、講演要旨集 3、p.174、2002 年 3 月 27 日

13. 濱地勇希、宮島省治、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦: Non-planar PCB 類投与時のラットの肝臓および精巣におけるテストステロン生合成・代謝系酵素遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 122 年会(千葉)、講演要旨集 3、p.174、2002 年 3 月 27 日

#### 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
3. その他(データベース等)  
なし

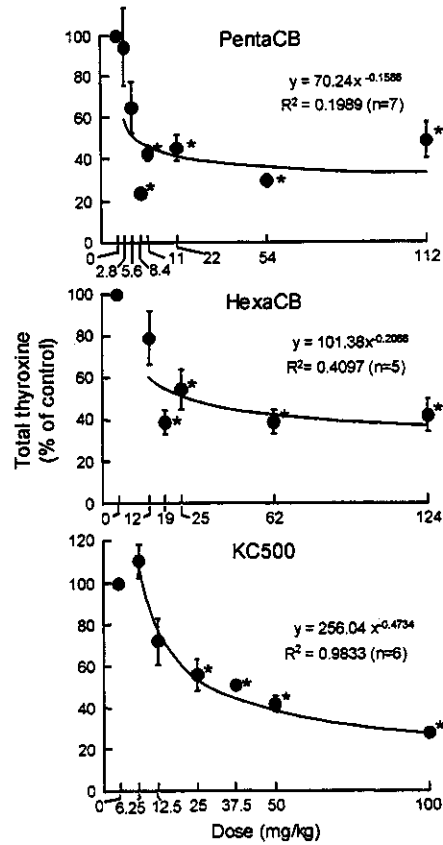


Fig. 1. Effects of graded doses of PentaCB, HexaCB and KC500 on serum total thyroxine concentration in mice

Mice were given i.p. PentaCB, HexaCB and KC500 at the various doses indicated and killed at 4 days after the administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for four to eight mice. \* $P < 0.05$ , significantly different from the control.

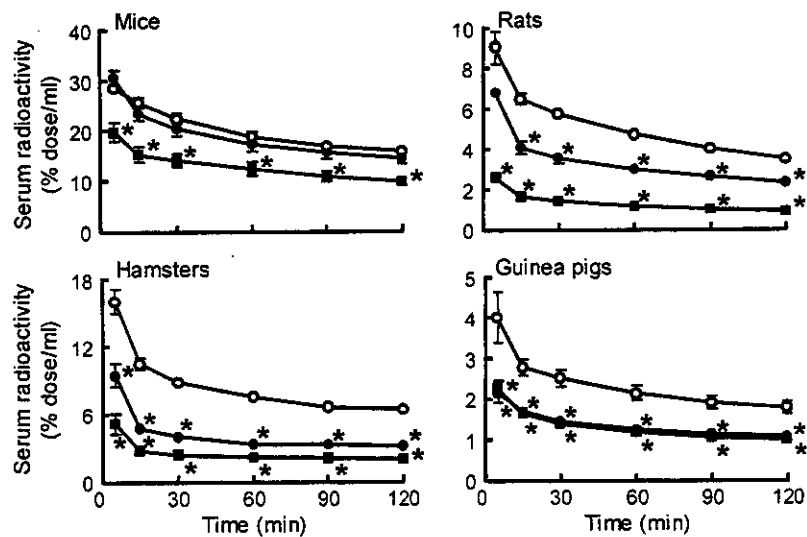


Fig. 2. Effect of KC500 on the clearance of  $T_4$  from serum in mice, hamsters, rats and guinea pigs

Animals were given KC500 (37.5 and 100 mg/kg) i.p., and the femoral artery was cannulated at 4 days after the administration. The concentration of total radioactivity was sampled from serum at the indicated time after the iv administration of  $^{125}I$ - $T_4$ . (○) control; (●) KC500 (37.5 mg/kg); (■) KC500 (100 mg/kg). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for two to nine animals. \* $P < 0.05$ , significantly different from each control.

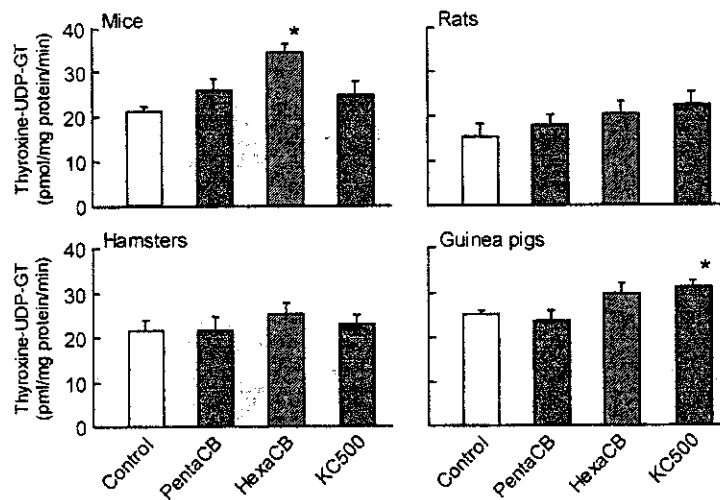


Fig. 3. Effects of PentaCB, HexaCB and KC500 on UDP-glucuronyltransferase activity toward thyroxine of liver microsomes in mice, hamsters, rats and guinea pigs

Animals were given PentaCB (11 mg/kg), HexaCB (19 mg/kg) and KC500 (37.5 mg/kg) i.p. and killed at 4 days after the administration. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for five to six animals. \* $P$ <0.05, significantly different from each control.

Table 1. Effects of PentaCB and KC500 on  $T_4$ -UDP-GT activity of liver microsomes in Wistar and Gunn rats

Treatment	Wistar		Gunn	
	Activity (pmol/mg protein/min)	Effect (%)	Activity (pmol/mg protein/min)	Effect (%)
Control	12.73 $\pm$ 1.17		9.88 $\pm$ 1.76	
PentaCB	25.71 $\pm$ 2.58*	+102	13.96 $\pm$ 1.26	+41
Control	9.12 $\pm$ 1.30		9.88 $\pm$ 1.76	
KC500	35.74 $\pm$ 2.40*	+292	10.98 $\pm$ 1.31	+11

Animals were given PentaCB (112 mg/kg) and KC500 (100 mg/kg) i.p. and killed at 4 days after the administration. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. for three to eight animals. \* $P$ <0.05, significantly different from each control.

Table 2. Effects of PentaCB and KC500 on serum total  $T_4$  level in Wistar and Gunn rats

Treatment	Wistar		Gunn	
	Level ( $\mu$ g/dl)	Effect (%)	Level ( $\mu$ g/dl)	Effect (%)
Control	2.95 $\pm$ 0.15		8.59 $\pm$ 0.21 <sup>†</sup>	
PentaCB	0.69 $\pm$ 0.08*	-77	1.44 $\pm$ 0.10*	-83
KC500	0.51 $\pm$ 0.04*	-83	1.66 $\pm$ 0.02*	-81

The experimental conditions were the same as described in the note to Table 1. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. for three to eight animals. \* $P$ <0.05, significantly different from each control. <sup>†</sup> $P$ <0.05, significantly different from control of Wistar rats.



## Ⅱ. 分担研究報告書

### Ⅱ. 基礎研究

## 雌性生殖器官への作用メカニズムの解明

分担研究者 井口泰泉 岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター

### 研究要旨

エストロゲンおよびエストロゲン活性を有する化学物質投与により発現変動する遺伝子の探索を行った。卵巣摘出成熟マウス、出生直後及び、生後5日という3種類のマウス子宮を用いて、エストロゲンおよびエストロゲン活性を有する化学物質を投与し、6時間後に発現変動する遺伝子を整理した。その結果、出生直後、生後5日、成熟卵巣摘出マウスの順に、エストロゲンで発現変動する遺伝子数が増加した。また、生後5日に発現変動する遺伝子プロファイルは成熟卵巣摘出マウスに近いこと、低濃度のエストロゲンにより発現する遺伝子と高濃度で発現する遺伝子は必ずしも重複しないことを見出した。さらに、出生直後のエストロゲン投与によってエストロゲン非依存的に増殖する膈から2種類の遺伝子をクローニングした。また、ラット胎児のミューラー管におけるステロイドホルモン受容体の発現を解析した。

### A. 研究目的

エストロゲンおよびエストロゲン活性を持つ化学物質の雌性生殖器官への影響を調べるための基礎研究として、野生型およびエストロゲン受容体 $\alpha$ ノックアウトマウス雌性生殖器官を用いてマイクロアレイ法により、エストロゲン応答遺伝子を解析すること。投与濃度依存的な遺伝子発現を確認すること。エストロゲン応答遺伝子を、出生日、生後5日、卵巣摘出した60日のマウスで、経時的に調べ、臨界期と遺伝子発現の関連の解析を試みる。ラット胎児の雌性生殖器官におけるステロイドホルモン受容体発現解析を目的とした。

### B. 研究方法

8週齢で卵巣を摘出し、その2週間後にエストラジオール0.05, 0.5, 5, 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内に投与し、その6時間後に子宮を摘出し、mRNAを調整した。約12,000遺伝子の載っているアフィメトリクス社のチップを用いて、発現変動する遺伝子を解析した。さらに、エストロゲン受容体 $\alpha$ ノックアウトマウスも用いた。出生直後および5日齢のマウスにジエチルstilbestrolを投与し、発現変動する遺伝子を解析した。発現変動する遺伝子の約50程度は、リアルタイムPCR法を用いて定量化し、発現を確認した。

出生直後に高用量のエストラジオールやジエチルstilbestrolを投与すると、膈では卵巣非依存の不可逆的細胞増殖が誘起される。この不可逆化組織からmRNAを調整し、ディファレンシャルディスプレイ法により、特異的遺伝子を解析した。

ラット胎児のミューラー管で、発達に伴うエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の発現を免疫組織化学的およびリアルタイムPCR法により解析するとともに、エストロゲンに対する反応性も解析した。

(倫理面への配慮)動物の屠殺にあたっては、頸椎脱臼法あるいは麻酔薬を用いるなど、岡崎国立共同研究機構の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した。

### C. 研究結果

卵巣摘出マウスへのエストラジオール投与により発現変動する遺伝子として、ステロイド合成に関与する遺伝子、tRNA合成、RNAプロセッシングに関与する遺伝子、細胞増殖シグナルなどを検出することができた。これらの遺伝子発現はエストラジオールの濃度依存的に発現増加あるいは発現低下した。出生直後の子宮での発現変動遺伝子数が最も少なく、5日齢、成体と発現変動遺伝子数は増加した。また、低濃度のエストロゲンにより発現する遺伝子と高濃度で発現する遺伝子は必ずしも重複しないこと、エストロゲン受容体 $\alpha$ ノックアウトマウスの子宮では発現変動が起らないことが確認された。さらに、出生直後のエストロゲン処理によって誘起された、エストロゲン非依存的に細胞増殖を示す膈から2種類の特異的遺伝子をクローニングし、エストロゲン応答性があること、角質化に関連していることなどを明らかにした。ラット胎児のミューラー管におけるエストロゲン受容体 $\alpha$ およびプロゲステロン受容体発現およびエストロゲンに対する反応性には地域差があることを見出した。

ビスフェノールAの胎盤透過性、ダイオキシンによるエストロゲン作用の抑制、高用量のビスフェノールAの出生直後の投与により卵巣非依存の膈細胞の増殖が誘起されること、低濃度のビスフェノールAの胎児曝露により、膈開口が有意に早くなるが、その後の妊娠出産には影響がないことなどに関する論文を出版した。

### D. 考察

エストロゲンによって発現変動する遺伝子では、エストロゲン投与後の時間経過によって、遺伝子発現プロファイルがどのように変化するかを知る必要がある。また、子宮と同じミューラー管に由来する膈での、エストロゲン応答性遺伝子を解析し、子宮との差を比較

することにより、組織依存的なエストロゲン応答遺伝子を解析することが可能と思われる。さらに、エストロゲン様物質の曝露およびエストロゲン受容体( $\alpha$ あるいは $\beta$ )ノックアウトマウスを用いた発現変動遺伝子の解析を行うことにより、エストロゲン受容体を介している反応であるか、別の系を介した反応かを明確にできる可能性がある。いずれにしろ、エストロゲン応答遺伝子のデータベースの構築が必要である。さらに、臨界期内外でのエストロゲン応答遺伝子の解析から、臨界期の分子生物学的な意味づけをする必要がある。

出生直後のエストロゲン投与によって誘導される、エストロゲン非依存性の不可逆化腫での遺伝子解析は、増殖因子系の遺伝子のエストロゲン非依存的な発現、それに引き続いて起る細胞周期の開始機構をも視野に入れて解析を継続している。

ラット胎児でのミューラー管では、主として子宮に分化する部分の解析を行ってきたが、輸卵管での部局的組織分化に関連したホルモン受容体発現、輸卵管特異タンパクの発現などの解析も重要である。

## E. 結論

マイクロアレイ法を用いることにより、マウス子宮におけるエストロゲンで発現変動する遺伝子を検出した。発達時期によりエストロゲンに対して発現変動する遺伝子が異なることを明らかにした。出生直後のエストロゲン投与により誘起した不可逆化で特異的に発現する遺伝子を2種類クローニングし、エストロゲンに反応して腫上皮が多層化するときに連動して発現する遺伝子であることを明らかにした。これらの遺伝子は角質化への分化との関連が高いと考えられる。ラット胎児におけるミューラー管発達過程での、エストロゲン受容体発現およびプロゲステロン受容体発現、エストロゲンに対する反応性には部域差があることを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miyagawa, S., D.L. Buchanan, T. Sato, Y. Ohta, Y. Nishina and T. Iguchi: Characterization of diethylstilbestrol-induced hypospadias in female mice. *Anat. Rec.* 266: 43-50, 2002.
2. Suzuki, A., A. Sugihara, K. Uchida, T. Sato, Y. Ohta, Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod. Toxicol.*, 16: 107-116, 2002.
3. Buchanan, D.L., S. Ohsako, C. Tohyama, P.S. Cooke and T. Iguchi: Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor- $\beta$  expression. *Toxicol. Sci.* 66: 62-68, 2002.
4. Okada, A., Y. Ohta, D.L. Buchanan, T. Sato, S. Inoue, H. Hori, M. Muramatsu and T. Iguchi: Changes in ontogenetic expression of estrogen receptor  $\alpha$  and not of estrogen receptor  $\beta$  in the female rat reproductive tract. *J. Mol. Endocrinol.*,

28: 87-97, 2002.

5. Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and T. Iguchi: Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Exp. Biol.*, 205: 711-718, 2002.
6. Honma, S., A. Suzuki, D.L. Buchanan, Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod. Toxicol.*, 16: 117-122, 2002.
7. Shimamura, M., K. Kodaira, K. Hino, Y. Ishimoto, H. Tamura and T. Iguchi: Comparison of antiandrogenic activities of vinclozolin and d,l-camphorquinone in androgen receptor gene transcription assay in vitro and mouse in utero exposure assay in vivo. *Toxicology*, 174: 97-107, 2002.
8. Watanabe, H., A. Suzuki, T. Mizutani, S. Kohno, D.B. Lubahn, H. Handa and T. Iguchi: Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by estrogen. *Genes Cells*, 7: 497-507, 2002.
9. Iguchi, T., H. Watanabe, Y. Katsu, T. Mizutani, S. Miyagawa, A. Suzuki, K. Sone and H. Kato: Developmental toxicity of estrogenic chemicals on rodents and other species. *Congen. Anorm.*, 42: 94-105, 2002.
10. Iguchi, T., M. Sumi and S. Tanabe: Endocrine disruptor issues in Japan. *Congen. Anorm.*, 42: 106-119, 2002.
11. Iguchi, T.: Endocrine disruptors and sexual differentiation. *Clin. Pediatr. Endocrinol.*, 11 (Suppl. 18): 51-58, 2002.
12. Tatarazako, N., Y. Takao, K. Kishi, N. Onikura, K. Arizono and T. Iguchi: Styrene dimmers and trimers affect reproduction of daphnia (*Ceriodaphnia dubia*). *Chemosphere*, 48: 597-601, 2002.
13. Ishibashi, H., M. Kobayashi, T. Koshiishi, T. Moriwaki, K. Tachibana, M. Tsuchimoto, K. Soyano, T. Iguchi, C. Mori and K. Arizono: Induction of plasma vitellogenin synthesis by the commercial fish diets in male goldfish (*Carassius auratus*) and dietary phytoestrogens. *J. Health Sci.*, 48: 427-434, 2002.
14. Adachi, T., M. Komiyama, Y. Ono, K.-B. Koh, K. Sakurai, T. Shibayama, M. Kato, T. Yoshikawa, N. Seki, T. Iguchi and C. Mori: Toxicogenomic effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol on mouse testicular gene expression in the long term: a study using cDNA microarray analysis. *Mol. Reprod. Devel.*, 63: 17-23, 2002.
15. Arizono, K., K. Ura, N. Tominaga, T. Kai, Y. Kohara and T. Iguchi: *C. elegans* as a tool for environmental toxicology. In *Toxicogenomics*, Inoue, T. and Pennie, W.D. (eds.), Springer, p. 129-134, 2002.
16. Watanabe, H., A. Suzuki, T. Mizutani, H. Handa and T. Iguchi: Large-scale gene expression analysis for evaluation of endocrine disruptors. In *Toxicogenomics*, Inoue, T. and Pennie, W.D. (eds.), Springer, p. 149-155, 2002.

17. Katsu, Y., E. Takasu, and T. Iguchi: Estrogen-independent expression of neuropilin, a serin protease in the vagina of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 195: 99-107, 2002.
18. Urushitani, H., A. Shimizu, Y. Katsu and T. Iguchi: Early estrogen exposure induces abnormal development of *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, 293: 693-702, 2002.
19. Okada, A., Y. Ohta, D.L. Buchanan, T. Sato and T. Iguchi: Effect of estrogens on ontogenic expression of progesterone receptor in the fetal female rat reproductive tract. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 195: 55-64, 2002.
20. Uchida, K., A. Suzuki, Y. Kobayashi, D.L. Buchanan, T. Sato, H. Watanabe, Y. Katsu, J. Suzuki, K. Asaoka, C. Mori, K. Arizono and T. Iguchi: Bisphenol-A administration during pregnancy results in fetal exposure in mice and monkeys. *J. Health Sci.*, 48: 579-582, 2002.
21. Ura, K., T. Kai, S. Sakata, T. Iguchi and K. Arizono: Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Health Sci.*, 48: 583-586, 2002.
22. Matsuno, T., K. Ura, R. Sonoda, Y. Kohara, H. Uesugi, K. Arizono, T. Iguchi and N. Tominaga: Sensing of chemical substances using gene expression patterns in *C. elegans*. *Sensors Materials*, (in press).
23. Iguchi, T. and H. Watanabe: Developmental effects of hormonally active agents on animals: from daphnia to humans. *Environ. Sci.*, 10 Suppl.: (in press), 2003.
24. Guillette, L.J. and T. Iguchi: Contaminant-induced endocrine and reproductive alterations in reptiles. *SCOPE/IPCS* (in press).
25. Adachi, T., Y. Matsuno, A. Sugimura, K. Takano, K.-B. Koh, K. Sakurai, T. Shibayama, T. Iguchi, C. Mori and M. Komiyama: ADAM7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Mol. Reprod. Devel.* (in press).

## 2. 学会発表

1. Katsu Y., Miyagawa S., Guillette L.J., Iguchi T. MOLECULAR CLONING OF STEROID HORMONE RECEPTORS OF THE AMERICAN ALLIGATOR 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)2002年11月
2. 勝 義直・井口泰泉: マウス膣に発現する新規 C-type lectin 日本動物学会第73回大会(金沢)2002年9月
3. 宮川信一、勝義直、渡邊肇、井口泰泉: 新生仔期 DES 投与マウスの膣における成長因子・受容体の発現. 日本動物学会第73回大会(金沢)2002年9月
4. Miyagawa S., Watanabe H., Suzuki A., Katsu Y., Iguchi T.: Analysis of Gene Expression in Neonatally DES-Exposed Mouse Vagina. *Toxicogenomics International Forum 2002* (岡崎)2002年10月
5. Miyagawa S., Katsu Y. Watanabe H., Iguchi

- T.: Estrogen-independent Activation of ErbB2 in Neonatally DES-Exposed Mouse Vagina. 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)2002年11月
6. 鈴木敦子、渡邊肇、半田宏、井口泰泉: 合成エストロゲンによるマウス生殖器官の相対的遺伝子発現変化. 日本動物学会第73回大会(金沢)2002年9月
7. Suzuki A., Miyagawa S., Watanabe H., Handa H., Iguchi T.: Gene expression analysis by estrogenic chemicals in mouse uteri of neonates and adults and neonatally DES-exposed mice. *Toxicogenomics International Forum 2002*(岡崎)2002年10月
8. Suzuki A., Miyagawa S., Watanabe H., Handa H., Iguchi T.: Gene expression analysis by microarray in uterus and vagina of neonatal mice exposed to diethylstilbestrol. 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)2002年11月
9. 渡邊肇: 遺伝子から探る環境ホルモンの作用メカニズム. 内分泌かく乱物質第2回領域シンポジウム2002年7月
10. 渡邊肇、井口泰泉: 内分泌かく乱化学物質の遺伝子発現に及ぼす影響 第75回日本生化学会大会(京都)2002年10月
11. Watanabe H., Suzuki A., Iguchi T.: Interpretation of uterotrophic effect by gene expression. *Toxicogenomics International Forum 2002*(岡崎)2002年10月
12. Watanabe H.: Evaluation of endocrine disruptors by DNA microarray. *Endocrine Disruptors International Symposium*(韓国)2002年12月
13. 渡邊肇、井口泰泉: 環境ホルモン問題の中での植物エストロゲン. シンポジウム植物エストロゲン12月
14. 渡邊肇、半田宏、井口泰泉: 内分泌かく乱化学物質とエストロゲンレセプター. 第25回日本分子生物学会年会(横浜)2002年12月
15. 井口泰泉: 動物の内分泌かく乱のメカニズムを探る-ミジンコからヒトまで-. 内分泌かく乱物質第2回領域シンポジウム2002年7月