

20031302

厚生労働科学研究費補助金研究報告書
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の内分泌かく乱性を確認する
試験法の確立に関する研究

（H13-生活-012）

2003（平成15年度）

主任研究者 今井 清
（財）食品薬品安全センター秦野研究所

平成16年（2004）4月

別添 2

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 清

平成 16 (2004) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・	1
今井 清	

II. 分担研究報告書

1. 総括補佐及びOECDバリデーション関連総括・確定試験開発関連調査研究・・・・・・・・	31
菅野 純	
(1) <プレスクリーニング系追加開発>	
2. 酵母Two-Hybrid試験の改良とバリデーション - 特に複合効果の検討 -	53
西原 力	
3. マイクロアレイ法の基盤技術調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	61
松島 裕子	
(2) <スクリーニング試験系確立研究>	
4. ES細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響・・・・・・・・・・・・・・・・	67
高木 篤也	
5. 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.....	71
永井 賢司	
6. 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.....	83
永井 賢司	
7. 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関する研究.....	87
松島 裕子	
8. 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.....	91
吉村 慎介	
9. 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.....	99
吉村 慎介	
10. 28日間試験の改良 - α_{2I} グロブリン評価の利用について -	105
武吉 正博	
11. 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.....	111
山崎 寛治	

(3) <OECD対応等試験開発部門>

12. 臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析	123
高木 篤也	
13. 子宮肥大およびHershberger 試験に関する研究	129
小野 宏	
14. OECDガイドライン407 : 28日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究	135
広瀬 雅雄	
15. 内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究	155
菅野 純	
16. OECD/WHO 関連総括	157
井上 達	

(4) <確定試験等開発研究>

17. 内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究 - 経世代試験の改良 -	165
長尾 哲二	
18. 内分泌かく乱化学物質の神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究	173
長尾 哲二	
19. トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱化学物質の検討	181
白井 智之	
20. 内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究	189
広瀬 雅雄	
21. 内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんに及ぼす影響の検討	195
長村 義之	
22. 内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究	201
吉田 緑	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	212
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	223
-----------------	-----

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

I. 総括研究報告書

化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究

主任研究者 今井 清 （財）食品薬品安全センター秦野研究所 特別参事

研究要旨 ホルモン様作用を示す化学物質及びその作用の延長線上で生体障害性を発揮する可能性のある化学物質(内分泌かく乱化学物質：EDCs)のそれぞれをプレスクリーニング試験ならびにスクリーニング試験を経て、最終的には内分泌かく乱問題の受容体原性毒性としての性格を考慮し、DEsの有害性確認を検出する感度の高い方法を開発することを目的として、1) 個体レベルスクリーニング系の確立課題として、子宮肥大試験、Hershberger試験、包皮分離試験の実用化へ向けての問題点の解決、2) 確定試験としての胎生期、新生児期の高感受性期に焦点を当てた新たな試験法の開発、3) 経世代試験の改良、4) 複合効果の検討、5) 各種臓器、特に内分泌関連臓器に対する発がん修飾作用の検討を主な研究課題として研究を遂行した。その結果個体レベルでのスクリーニング系の確立に関してはほぼ問題点が解決され、子宮肥大試験に関してはOECD試験法ガイドライン(案)としてわが国より提案されるに至った。複合効果に関しては、*in vitro*、*in vivo*による研究成績から、少なくとも相加的な作用が認められることが明らかにされたが、その作用機序については今後検討されるべき問題であろう。内分泌関連臓器に対する発がん修飾作用に関しては複数の臓器において特に高用量において明らかな影響が認められることが確認され、これらの問題点を考慮しながら胎生期、新生児期の高感受性期に焦点を当てた試験法案を提案できる段階に達しており、今後の研究が期待される。なお、*in vitro*、*in vivo*の系で内分泌かく乱が疑われている物質を用いて標的臓器の初期の遺伝子発現の変化を検討した結果、共通して変化する遺伝子が幾つか確認されており、今後遺伝子解析が内分泌かく乱作用を判断するための新たなツールになる可能性が示唆された。

分担研究者氏名・所属機関名および所属機関における職名

全性生物試験研究センター 毒性部 主任研究官

菅野 純・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 部長

永井 賢司・(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 部長

西原 力・大阪大学大学院薬学研究科環境生化学 教授

吉村 慎介・(財)食品薬品安全センター秦野研究所 病理学研究室 室長

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

武吉 正博・(財)化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 課長

高木 篤也・国立医薬品食品衛生研究所 安

山崎 寛治・(財)化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 所長

小野 宏・(財)食品薬品安全センター秦野
研究所 常務理事・所長

広瀬 雅雄・国立医薬品食品衛生研究所 安
全性生物試験研究センター 病理部 部長

井上 達・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 センター長

長尾 哲二・近畿大学工学部生命科学科
教授

白井 智之・名古屋市立大学大学院医学研究
科 教授

長村 義之・東海大医学総合診療学系病理
診断学部門 副医学部長、教授

吉田 緑・(財)佐々木研究所病理部 研究員

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の生体影響研究は、
当申請者らのこれまで第1期3年間の研究に
よって、種々のスクリーニング試験法の開発
を基本的に終了し、今期は確度の高い、各国
間協調の可能な「少数の個体レベルスクリー
ニング系の確立」を目指す最終段階を迎える
ことになる。併せて、スクリーニング系で内
分泌ホルモン様作用の認められる物質が明ら
かになった後、「かく乱作用」の如何が明ら
かにされないままそれらの物質が“店晒し状
態”となりつつあるので、こうした状態を早
期に解消するために、「内分泌かく乱性を確
定するための試験法の考案」、あるいはその基
礎となる個々の問題点を解明することが急務
となっている。

本研究は、以上に対応する試験系開発の第
2期の研究を推進するものであり、その概要
は、1)個体レベルスクリーニング系の確立課題
として、子宮肥大試験、Hershberger 試験を
実用段階とする上で最終的に残されている問
題点の解決をはかり、さらに経済開発協力機
構(OECD)などで新たに取り上げる機運にある

包皮分離試験等の最終スクリーニング系を試
験法として確立すること、及び2)確定試験の
開発として、a)胎生期、新生児期の鋭敏期(い
わゆるウィンドウ期)に焦点を当てた可能な
限り短期の新しい試験系の考案を試み、同時
に、b)経世代試験の改良に関する諸課題を実施
する。このために実験情報の不足しているc)
複合効果、d)各種臓器、特に内分泌関連臓器
の発がん修飾作用に関連した諸課題によって
構成されており、内分泌かく乱化学物質関連
試験法の総合整備研究プロジェクトとし、平
成15年度はその3年目となるものである。特
に第2期の最終年度にあたる今年度は、分担
研究者の課題として、これまでの開発された
主として *in vivo* スクリーニング系の実用化に
向けて最終的な問題点の洗い直しとその対策
に研究の重点をおくとともに、本研究を通し
てその必要性が指摘された“一生涯試験”の
試験法(案)の構築に必要な問題点の解決に重
点を置いた。なお、追加のプレスクリーニング
探索の一環として、OECDでも検討されつつ
あるマイクロアレイ法の試験法への応用につ
いてその方途を明らかにすると共に、これま
でに引き続いてOECDを中心として推進する
バリデーション試験への協力も行い、今後の
OECD、EPA、NIEHSなどと協調研究の受け
皿となるよう国内体制を整えることも本研究
の目的の1つである。以下に各班員の研究結
果の概要を記載する。

菅野 純；総括補佐及びOECDバリデ ーション関連総括・確定試験開発関連調 査研究

内分泌かく乱性を検討する必要がある数万種
の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を
置いたスクリーニング手法の開発と確立を進め、
もって、詳細試験に資する優先順位リストの作
成及び詳細試験の開発を平行して行うことを目
的とした。

(1) 〈プレスクリーニング系追加試験〉

西原 力；酵母 Two-Hybrid 試験の改
良とバリデーション - 特に複合効果の検

討 -

本来、体内には 17β -Estradiol(E_2)が存在することから、内分泌攪乱 (ED) 物質のスクリーニングも E_2 共存下に行う必要がある。すなわち、 E_2 作用促進物質や抑制物質である。そこで、前年度、私たちが開発した酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) で E_2 作用抑制物質を検索し、hexachlorophene (HCP)、menadione (K3) および pentachlorophenol (PCP) の 3 物質を報告した。今年度は E_2 促進物質を検索した。

ヒトゲノム解析によりヒトでは 48 種類の核内レセプターが存在することが明らかにされている。ある種の化学物質は ER だけではなく、PXR と結合して作用を顕すことを前年度明らかにした。そこで、酵母 Two-Hybrid 試験で性ホルモンレセプターの系に加えてリガンド既知の他のレセプターの系を作成し、各種化学物質についてアゴニスト活性を測定した。

松島裕子；マイクロアレイ法の基盤技術調査

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種類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、有効利用するためのデータ測定システムの開発も含めた基盤調査研究を実施する。

(2) 〈スクリーニング試験系確立研究〉

高木篤也；ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響

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。そこで、内分泌かく乱化学物質の初期発生過程への影響を検索するモデル系として ES 細胞培養系の有用性を検討した。

永井賢司；子宮肥大試験及び Hershberger 試験における遺伝子発現変化に関する研究

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。

永井賢司；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及び解決策の検討

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。

松島裕子；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関する研究

合成内分泌かく乱化学物質である Bisphenol A (BPA) と植物性エストロゲンである Genistein (GEN) の複合および相互作用を *in vivo* 高感度エストロゲン作用検出系である子宮肥大試験を用い、子宮重量の変化と網羅的遺伝子解析の面から、その実態を総合的に把握することを目的とした。

吉村慎介；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

本研究は雄動物を対象に、内分泌かく乱化学物質の投与時期、投与期間の違いが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、発達にどのような影響を与えるかにつき明らかにするとともに、これらの影響を検出するためのスクリーニング試験法を確立することを目的としている。そのため、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作用物質を投与して、包皮分離時期をマーカーとして検索し、さらに病理形態学的ならびに組織学的に雄性生殖器・副生殖器関連組織に示される変化についても観察する。

吉村慎介；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

本研究は雄動物を対象に、内分泌かく乱化学物質の投与時期、投与期間の違いが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、発達にどのような影響を与えるかにつき明らかにするとともに、これらの影響を検出するためのスクリーニング試験法を確立することを目的としている。そのため、新生児期およびその後の異なる時期に、代表的な抗アンドロゲン物質あるいはエストロゲン様作用物質を投与して、包皮分離時期をマーカーとして検索し、さらに病理形態学的ならびに組織学的に雄性生殖器・副生殖器関連組織に示される変化についても観察する。

武吉正博；28日間試験の改良 - α_{2U} グロブリン評価の利用について -

内分泌かく乱作用を検出するために、改良28日間反復投与毒性試験における α_{2U} グロブリンの測定意義を明白にすることを目的とした。

山崎寛治；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

国内で実施された試験をもとに、本試験法の問題点を抽出し、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した。

(3) 〈OECD 対応等試験開発部門〉

高木篤也；臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析

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の予測が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。

小野 宏；子宮肥大及び Hershberger 試験

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。昨年度は、マウスを用いる子宮肥大試験の検証を目的として、Ethinylesradiol (以下、EE と略記) 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。その結果、EE に対する感度の差は殆ど認められなかった。そこで、今年度は、OECD バリデーションプロトコールに沿って、エストロゲン作用の疑われる既存化学物質について、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。

広瀬雅雄；OECD ガイドライン 407：28日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

“OECD テストガイドライン 407、enhanced” において、内分泌かく乱作用を高感度に検出する新規パラメータの導入を目的として、一期目の本研究担当課題で、代表的化合物投与例でラット雄特異的に発現する α_{2U} -globulin の肝・腎における発現量を検索し、いずれもホルモン作用に起因した用量依存性の変動を示さないが、いくつかの物質で低用量投与による肝 mRNA 発現の個体間のバラツキを見い出した。

Microarray 法の技術の確立に伴い、一度に多数の遺伝子の RNA 発現挙動を検出する網羅的解析手法の導入により、遺伝子指標の探索と同時にその用量依存性の検討が可能となってき

た。内分泌かく乱化学物質(EDCs)の投与に起因した用量依存性の反応を高感度に検出する系として、この遺伝子発現の網羅的解析手法が注目を浴びてきており、この手法を利用してEDCs 特異的な発現クラスターを見出すことは、本研究課題の最終目標である。一方、mRNA 発現の場合、用量に依存せずに、かつ蛋白質発現に反映されないような転写産物の発現変動を認める可能性がある。その生物学的な意義を検討することは重要な課題であるが、その前段階としてEDCs の投与に起因して変動を示す遺伝子クラスターを解析・整理する必要がある。本研究では、成熟動物に対してEDCs を一定期間投与した時の生体影響を検出する目的で、肝臓を標的として投与動物で発現の変動する遺伝子を genome wide にスクリーニングする。

菅野 純；内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究

内分泌かく乱化学物質の検索に用いる検査方法をビデオ撮影し、その映像を国内・海外にも配信することにより、測定法の統一化および検査法の普及に努めることを目的とし、本年度は性的二型核の測定法、脳の環流固定法、凍結切片作製法、染色法、神経核の解析法及び幼若ラットへの経口投与法のビデオ取りを実施した。

井上 達；OECD/WHO 関連総括

国内外の当該会議及び学会へ出席し、それらの専門家と意見交換、情報収集を行い、得られた成果を研究発表、雑誌を通して最新の情報を紹介する。更に関係指導所轄省庁へ報告の報告、当班をはじめとする研究プロジェクトを円滑に進める要となることを目的とする。

(4) 〈確定試験等開発研究〉

長尾哲二；内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究 -経世代試験の改良-

胎児期初期あるいは新生児期早期の内分泌かく乱化学物質暴露による成熟後の生殖影響を、生殖器官発生・発達期に検出し得る可能性を探ることは重要であると思われる。

そこで、本研究では、内分泌かく乱化学物質のマウス胎児期暴露による生殖巣原基における傷害と、生後の生殖器官の発達障害ならびに成熟後の生殖機能の障害との関連について検討し、性腺構築過程における組織変化および過剰アポトーシス誘発が、内分泌かく乱化学物質の次世代生殖影響を早期かつ短期に検出するエンドポイントになり得るかを結論した。

長尾哲二；内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究

内分泌かく乱化学物質のラット胎児期あるいは新生児期暴露後における性的二型核や前腹側脳室周囲核をはじめとする神経核および青斑核の形成に及ぼす影響を、細胞生物学的あるいは神経化学的に検討する。更に、神経核の構造変化が成熟後の生殖影響と如何に関連しているかを考察する。更に、視床下部における過剰アポトーシス誘発あるいは脳内モノアミンの変動などが、視床下部神経核の形態変化の観察(体積変化)に替わり、視床下部神経核構築に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響を検出するエンドポイントになり得るかを結論する。

白井智之；トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱化学物質の検討

短期間で高率にアンドロゲン依存性前立腺癌を発生するTgラットを用いて、抗アンドロゲン作用の可能性が指摘されているTriazine系除草剤・Atrazineを混餌投与し、その前立腺癌発生への影響を検討する。

広瀬雅雄；内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究

内分泌かく乱化学物質(EDCs)の甲状腺、乳腺など主要臓器に対する発がん促進作用を検出するモデルについて、これまで成体動物を用いて種々の検討が行われてきた。一方、EDCsの乳幼児期投与による発がん修飾作用については不明な点が多い。

ヨード欠乏状態において、ラットの乳腺組織は異型性を呈し、腫瘍が誘発され、更に発癌物質に対する感受性が高くなることが報告されて

いる (Eskin B.A., 1977)。また、エストロゲンに対するラット乳腺組織の反応性がヨード欠乏により高くなり、腺房細胞の増殖を促進する (Strum J.M. et al., 1979)。一方、乳腺腫瘍の増殖はヨードを含む食品で抑制され、ヨードは乳腺腫瘍発生に対し何らかの影響を与えていると考えられる (Funahashi H. et al., 2001)。今年度の実験においては、乳幼児期における生体内環境変化の発がん感受性に及ぼす影響を明らかにする基礎検討の一つとして、低ヨード食を与えたラットの発癌物質に対する感受性の変化を、特に乳腺及び甲状腺を中心に検索する。

長村義之；内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんに及ぼす影響の検討

内分泌かく乱物質の多くはエストロゲン作用を有することが広く知られている。我々はエストロゲンの乳腺腫瘍への発育増進に対する関与を精査する目的で、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)ラット乳腺発がんモデルに各種用量のエストロゲン処置を施し腫瘍発生への影響について検討した。また、この検索を通し内分泌かく乱物質の腫瘍化のメカニズムについても考察した。

吉田 緑；内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

前年度までの研究によってエストロゲン様内分泌かく乱化学物質のラット新生児期大量暴露は、視床下部・下垂体・性腺制御系を速やかに障害し性成熟前より雌性生殖器の発育・分化に対して重篤且つ不可逆的な障害を与えるが、投与期間の短縮すると性成熟前には明らかな異常を示さず性成熟後に生殖器系に異常が発現する遅延型の影響が認められ、いずれの暴露においても子宮発癌修飾作用が認められた。これらの大量暴露によって得られた観察項目を用いて bisphenol A(BPA)のラット経胎盤・授乳暴露による雌性生殖器への影響を検討した結果、投与による影響は認められなかった。

本年度はさらにヒト暴露量に近い低用量から高用量までの影響を確認する目的で、BPAと同様エストロゲン様作用を示す内分泌かく乱化学物質である nonylphenol(NP)を用いて

胎生期・授乳期暴露による雌性生殖器への影響を BPA と同様の方法で検討した。

また、昨年度実施した卵巣への影響検索で実施した卵巣の形態学的検査結果を分子生物学的解析により補足する目的で、卵胞における増殖に関連する遺伝子の発現について追加検索した。

B.研究方法

菅野 純；総括補佐及び OECD バリデーション関連総括・確定試験開発関連調査研究

これまでの研究により、内分泌かく乱化学物質による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、低用量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、内分泌かく乱化学物質の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。この様な背景からは、従来の多世代試験に代表される生殖毒性試験の改良を進める立場を発展的に解消し、さらに拡大して、上記の生物個体の一生涯を対象とした毒性試験という立場から内分泌かく乱化学物質の毒性評価を進めることを提案するに至った。

(1) 〈プレスクリーニング系追加試験〉

西原 力；酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーション - 特に複合効果の検討 -

環境省がリストアップしている内分泌かく乱作用が疑われる物質および関連物質のうち、アンタゴニスト活性を示さなかった物質 50 種類について、酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) と培養細胞 (MGF-7) レポーター遺伝子試験で E₂ 共存下にエストロゲン様活性を測定することにより、E₂ 作用促進物質を検索した。また、リガンドが明らかにされているヒト核内レセプター 17 種類について、ER-TIF2 系に準じて試験系を作成し、ED 容疑物質 23 種についてアゴニスト活性を測定した。

松島裕子；マイクロアレイ法の基盤技術調査

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)に浸漬した。TRIzol を用いてRNAの粗抽出を行い、さらにRNeasy キットを用いて全RNAを精製した。

マイクロアレイプラットフォーム間の比較解析

CodeLink (アマシャムバイオサイエンス社) 用にRNAサンプルを調製し、同社にマイクロアレイ解析を依頼した。数値データを比較解析に用いた。

Spike RNA

Spike RNAとして、マウス遺伝子と相同性の無いλ phage DNA およびBacillus DNAの計6種類の遺伝子を予定した混合比で混ぜたSpike RNA cocktailを大量調整した。

GeneChip 解析

全RNA 5 μgからスタートし、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、GeneChipからデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社のGenespring等を用いて解析した。

極微量サンプルからのマイクロアレイ解析

マウス肝臓全RNAを5μg、1μg、100ng、50ng、20ng、10ngからスタートし、2回増幅法による極微量サンプルからのマイクロアレイ解析が可能か否かを検討した。

(2) 〈スクリーニング試験系確立研究〉

高木篤也；ES細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響

マウスES E14TG2a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、4日間浮遊培養した。その間にエストロゲン様物質であるDES(1, 0.1, 0.01nM)、BPA(10, 1, 0.1μM)、E2(1, 0.1, 0.01nM)、GEN(1, 0.1, 0.01μM)、4-NP(10, 1, 0.1μM)、DEHP(100, 10, 1μM)を添加し、さらに、エストロゲン受容体α(ERα)のアンタゴニストのICI-182,780(1μM)をそれぞれ添加した。4日後に胚様体(EB)を採取し、実体顕微鏡下で形態を観察した。

永井賢司；子宮肥大試験及びHershberger試験における遺伝子発現変化に関する研究

〈実験1：EE単回経口投与後の子宮重量お

よび子宮の遺伝子発現量の経時変化〉

19日齢の雌性Crj:CD(SD)IGSラットにEE(3μg/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。動物数は、各群5匹とした。投与後1, 3, 6, 12, 24および48時間にCO₂麻酔下で子宮を摘出した。子宮は、内液不含重量を測定後、対体重比を算出した(以下、子宮重量と表記)。摘出した子宮は、RNAlater中で保存した。

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。子宮における性ステロイドホルモンレセプター遺伝子[progesterone receptor (PR)、estrogen receptor α (ERα)、androgen receptor (AR)]、エストロゲン応答遺伝子[complement C3 (C3)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) およびcyclin D1] およびWntファミリー遺伝子(Wnt4、Wnt5a、Wnt7a)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。18S rRNA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。

〈実験2：EE単回経口投与後の子宮重量の用量反応性〉

19日齢の雌性Crj:CD(SD)IGSラットにEEを0.3, 1および3μg/kgの用量で単回強制経口投与した。ER antagonistに対する反応性を検討するために、EEを3μg/kgの用量で単回強制経口投与した直後にICIを1mg/kgの用量で単回強制経口投与する群を設定した。溶媒群には、1%エタノール含有コーン油を単回強制経口投与した。動物数は、各群5匹とした。投与後24時間にCO₂麻酔下で子宮を摘出し、内液不含重量を測定後、対体重比

を算出した（以下、子宮重量と表記）。

<実験3：GEN およびMXC 単回経口投与後の子宮重量の用量反応性>

19日齢の雌性Crj:CD (SD) IGS ラットにGEN (10、100 mg/kg) およびMXC (30、300mg/kg) を単回強制経口投与した。溶媒群には、1%エタノール含有コーン油を単回強制経口投与した。動物数は、各群5匹とした。投与後24時間にCO₂麻酔下で子宮を摘出し、内液不含重量を測定後、対体重比を算出した（以下、子宮重量と表記）。

<実験4：EE、GEN、MXC およびICI の複合影響>

EE、GEN、MXC およびICI の単独投与液または混合投与液を調製し、19日齢の雌性Crj:CD (SD) IGS ラットに単回強制経口投与した。群構成は、以下に示すとおりである〔1群：溶媒（1%エタノール含有コーン油）、2群：EE 0.3 μg/kg、3群：GEN 10 mg/kg、4群：MXC 30mg/kg、5群：EE 0.3 μg/kg + GEN 10mg/kg、6群：EE 0.3 μg/kg + MXC 30mg/kg、7群：GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg、8群：EE 0.3 μg/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg、9群：EE 0.3 μg/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg + ICI 10mg/kg〕。動物数は、各群5匹とした。投与後24時間にCO₂麻酔下で子宮を摘出した。子宮は、内液不含重量を測定後、対体重比を算出した（以下、子宮重量と表記）。摘出した子宮は、RNAlater 中で保存した。

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。

子宮における遺伝子発現量は、実験1について最も顕著な変化を示した complement C3 (C3) およびWnt7a 遺伝子について検討した。遺伝子発現量は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（Applied Biosystems）

を用いた real-time RT-PCR 法により評価した。18S rRNA 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。

<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。

永井賢司；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及び解決策の検討

本年度は OECD Validation phase 2 の結果のうち、昨年度の報告以降に報告された解析結果を中心に、ガイドライン化する上での問題となると考えられる1) 飼料中の植物性エストロゲンの影響、2) 動物種および系統、3) false positive および false negative、4) その他のガイドライン化する上での留意点に着目して結果をまとめ、解決策を検討した。

松島裕子；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関する研究

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（日本テールスリバー）を購入し、1週間の馴化期間後、卵巣摘出手術を行った。E₂、BPA、GEN の各化学物質は、DMSO で溶解し、コーンオイルで希釈した。術後2週間目にE₂ 0.3 μg/kg、BPA 70mg/kg、GEN 25mg/kg、BPA (35mg/kg) と GEN(12.5mg/kg) は同時に、単回皮下投与した。溶媒対照群としてコーンオイル投与群、10%DMSO 含有コーンオイル群を置いた。投与後、2時間および24時間目に各群5匹ずつ頸椎脱臼により屠殺し、速やかに子宮を採取した。子宮重量 (wet) と内腔液を取り除いた (blotted) 重量を測定し、RNAlater に浸漬した。

動物の飼育には、入荷時より植物性エストロゲンを除去した飼料 (PLD 飼料) を用いた。

馴化期間中および屠殺時まで飼料および水は自由に摂取させた。試験は、温度 24±1℃、湿

度 $55\pm 5\%$ 、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、照明12時間に設定されたバリア方式の動物室で実施した。動物は床敷をひいたプラスチックケージで5匹ずつ飼育した。

2) マウス組織からのRNAの分離精製

RNAlater(Ambion社)にてRNaseを不活化した子宮は、RNA抽出操作まで -80°C にて保存した。RNAlaterを除いた後、RNeasykit(キアゲン社)添付のRLT bufferを用いて組織破碎液を調製し、DNA定量用蛍光試薬であるPicogreenを用いて、破碎液中のDNA量を測定した。DNA量に応じて、SpikeRNA cocktail(Bacillus RNA 5種類のmix)を添加し、TRIzolを用いて粗抽出した液をRNeasy kitを用いて全RNA精製した。得た全RNAの $0.5\mu\text{g}$ を電気泳動し品質を確認した。

3) GeneChip解析

Affymetrix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を調製した。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(Affymetrix社)を用い、ビオチン化CTP、UTPを共存させつつcRNAを合成した。二本鎖DNAおよびcRNA精製にはAffymetrix社のGeneChip sample cleanup moduleキットを用いた。得られたcRNAを $300\sim 500\text{bp}$ となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加しGeneChipターゲット液とした。GeneChipはMOE430Aを用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて $16\sim 18$ 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、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNAのシグナル値を元に、各遺伝子のシグナル値をDNA当たりの値に変換し絶対量化した値を用い、Gene Springにて解析を行った。

吉村慎介；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

11週齢で購入した雌雄ラット(系統:Cri:CD(SD)IGS)を交配し、交尾確認日を妊娠0日として、コーン油に溶解したVZ、EEあるいはTAMを妊娠14日から17日(GD 14-17)まで、あるいは妊娠18日から21日まで(GD 18~21)4日間投与した。投与前の体重をもとに平均値が均等になるよう群分けを行い、投与経路は強制経口投与とした。投与量をVZは10、30、 $100\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、EEは10、 $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、TAMは30、 $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とし、各群3から5例の妊娠ラットに投与した。対照群には溶媒であるコーン油を投与した。出生日を0日齢とし、6日齢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。体重を0、6、22、35、56日齢および包皮分離完了日に測定した。35から56日齢まで包皮分離を肉眼的に観察した後、56日齢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、ホルマリン固定後に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。解剖時および分離完了時体重、包皮分離完了日、AGDおよびAGD測定時の体重、器官重量については多重比較を行った。

吉村慎介；内分泌かく乱化学物質の新生児期による包皮分離試験に関する研究

11週齢で購入した雌雄ラット(系統:Cri:CD(SD)IGS)を交配し、分娩させて得た雄ラットを用いた。出生日を0日齢(PND 0)とした。PND 1~5の暴露のためにはPND 1に雄5あるいは6匹を残し、コーン油に溶解したFLU、VZ、DES、EEあるいはTAMをPND 1から5まで5日間投与した。また、新生児暴露との比較のために、離乳直前のPND 17~21、性成熟直前のPND 35~39に投与する試験を実施した。投与経路は強制経口投与とし、PND 1~5投与には栄養カテーテルを用い、その他の暴露時期には胃ゾンデを用いた。投与量をFLUは、1、10、 $30\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、VZは10、30、 $100\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、DESは10、100、 $300\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、EEは10、 $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、TAMは0.3、1、 $3\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ とし、各群3

あるいは4腹（一部2腹）よりの雄出生児に投与した。溶媒対照群にはコーン油を投与した。いずれの暴露時期の群も PND 6 に各腹より4匹の雄を残した。体重を投与日のほか PND 0、6、22、35、56 および包皮分離完了日に測定した。PND 35 から PND 56 まで包皮分離を観察した後、PND 56 に麻酔下放血屠殺して剖検し、精巣、精巣上部、前立腺および精嚢を採取してホルマリン固定後に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。包皮分離完了時の日齢および体重、解剖時体重、器官重量については多重比較を行った。ただし、包皮分離が PND 56 の解剖時にも完了しない例は完了日を 56 日として集計し、検定した。

武吉正博；28日間試験の改良 - α_{2U} グロブリン評価の利用について-

E_2 10^{-10} M、 10^{-11} M もしくは Clofibrate 10^{-6} M、 10^{-7} M で3次元培養ラット肝細胞 (TESTLIVER™ -Rat-, Toyobo) を24時間培養し、遺伝子発現を DNA microarray で検討すると共に ELISA 法にて培養上清中の AUG 変動を同時に検討した。

山崎寛治；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

OECD Validation phase 2 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、2003年のOECD、学会（ユーロトックス）に日本のデータとして報告、発表した。また、Environmental Health Perspective に掲載した。また、本試験に関する文献の検索、OECD の動向を調査した。

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

高木篤也；臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析 化学物質 in vivo 暴露

17β -estradiol (E_2) 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 $0.3\mu\text{g}$ を皮下投与した。BPA、GEN は DMSO とコーンオイルの混液に溶解し、同様に各々体重 1kg 当たり 70mg、25mg を皮下

投与した。2、24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、DMSO とコーンオイル混液群を置いた。

また、動物の飼育には、植物性エストロゲンを除去した飼料 (PLD 飼料) を用いた。

マウス組織からの RNA の分離精製

組織を分離後すみやかに RNeasy (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化した。4°C、一晚静置した後、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存した。RNeasy を除いた後、RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破砕液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破砕液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の $0.5\mu\text{g}$ を電気泳動し品質を確認した。

GeneChip 解析

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA $5\mu\text{g}$ 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 を調製した。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) を用い、ピオチン化 CTP、UTP を共存させつつ cRNA を合成した。二本鎖 DNA および cRNA 精製にはアフィメトリクス社の GeneChip sample cleanup module キットを用いた。得られた cRNA を 300-500bp となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し GeneChip ターゲット液とした。GeneChip は MOE430A を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16-18 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、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNA のシグナル値を元に、各遺伝子のシグナル値を DNA 当たりの値に変換し絶対値化した値を用いた解析を行った。

小野 宏；子宮肥大及び Hershberger

試験

1. 被験物質の投与量は、毒性予備試験の結果から設定した。すなわち、C57BL/6J 系雌マウスを用いて 100、300 および 1000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、3 日間反復投与し、死亡が認められなかった最高用量を子宮肥大試験の最高用量とした。100 mg/kg/day でも死亡が認められた場合は、さらに低い用量を設定して、死亡が認められない用量を求めた。子宮肥大試験は、卵巣摘出した C57BL/6J 系マウスを用いた。エストロゲン作用を調べる目的で 5 用量の被験物質投与群（溶媒対照群を含む）、陽性対照群、さらには抗エストロゲン作用を調べる目的で EE を投与し、同時に 5 用量の被験物質を投与した群（溶媒対照群を含む）を設定した。投与量の公比は約 3 とした。投与経路は、経口と皮下の 2 種類を実施した。被験物質の投与は、1 日 1 回、7 日間にわたり反復して行い、最終投与の約 24 時間後に屠殺し、子宮の重量を測定した。

2. 卵巣摘出した C57BL/6J 系マウスに、bisphenol A 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討した。エストロゲン作用を調べる目的で、10~300 mg/kg/day を単独投与した群、陽性対照として 0.2 μ g/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 μ g/kg/day の EE を皮下投与し、同時に 10~300 mg/kg/day の bisphenol A を併用投与した群を設けた。投与期間は 7 日間とし、最終投与の 24 時間後に致死させ、子宮重量を測定した。

3. 1. のマウス子宮肥大試験では、子宮重量を変化させる最小有効用量が求まらなかった 2-[bis(4-hydroxyphenyl)methyl]benzyl alcohol(以下、BHPMBA)について、さらに用量を下げて、子宮肥大試験の追加実験を行った。エストロゲン作用を調べる目的で、1~30 mg/kg/day を単独投与した群、陽性対照として 0.2 μ g/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 μ g/kg/day の EE を皮下投与し、同時に 1~30 mg/kg/day の BHPMBA を併用投与した群を設けた。投与期間は 7 日間とし、最終投与の 24 時間後に致死させ、子宮重量を測定した。

広瀬雅雄；OECD ガイドライン 407：28 日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

今年度は、まず、前年度解析を行った ethinylestradiol(EE) 投与例で得られた発現データについて、Silicon Genetics 社の Gene Spring ver.4.0 で分析し、発現の増減する遺伝子を用量依存性の有無で抽出・分類を行った。次いで、雌雄各群 5 匹の SD:IGS ラットに genistein (GEN)を 120、400、1000 mg/kg、methoxychlor (MXC)を 20、100、500 mg/kg、nonylphenol (NP) を 10、50、250 mg/kg の割合で 28 日間、強制経口投与し、雄は 28 日目に屠殺し、雌は投与 22 日目から性周期を観察して 28 日目から発情休止期を示す日に屠殺・剖検した。次いで、RNA later に保存した肝組織から total RNA を抽出し、各群 3 匹につき CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 I Microarray による解析を行った。解析データについて、発現の増減する遺伝子を用量依存性の有無で抽出・分類し、前年度解析を行った EE 投与例のデータと比較を行った。

(倫理面への配慮)

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

菅野 純；内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究

ラットを実際に飼育し、ラット新生児への経口投与方法、脳の還流固定法、凍結切片作製法、染色法、神経核の解析法についてビデオ撮りを実施した。

井上 達；OECD/WHO 関連総括

OECD、WHO/IPCS を始め、関連する国内外の会議および学会へ出席し、それらの専門

家との意見交換および情報収集を行い、得られた成果の研究発表、雑誌を通して、最新の情報を紹介をしている。

(4) 〈確定試験等開発研究〉

長尾哲二；内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究 -経世代試験の改良-

〔実験1〕 ICR マウス（チャールズ・リバー株式会社）の妊娠10～13日（膣栓発見日＝妊娠0日と規定）に、DES、E₂、EE、Tamoxifen (TAM)、Clomiphene (CLOM) の100 μg/kg/day あるいは Atrazine (ATZ)（いずれも Sigma Chem. 製）の100 mg/kg/day をコーン油に懸濁して連日背部皮下に注射した。最終投与の24時間後（妊娠14日）あるいは妊娠17日にエーテル麻酔下で頸椎脱臼により屠殺して開腹し、子宮を摘出して胎児を得た。実体顕微鏡下で雄胎児の生殖巣あるいは精巣を取り出し、0.1M リン酸緩衝1.25%グルタルアルデヒドおよび2%パラホルムアルデヒド混合液で固定した。固定後にマウス胎児生殖巣を細切して0.1M リン酸緩衝液で洗浄後、同緩衝2%四酸化オスミウムで後固定した。エタノール脱水後、エポキシ樹脂に包埋して厚切り切片トルイジンブルー染色標本による光顕観察を行った。次いで電顕用にトリミングし、超薄切片を作成して酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛の重染色を行って電顕（日立H-7100）観察した。また、胎児生殖巣/精巣および新生児精巣における過剰アポトーシスの観察では、同様に子宮内暴露した胎児を、胎齢14および17日に摘出し、頭部を除去して生殖巣あるいは精巣を傷つけないよう0.1M 磷酸緩衝10%ホルマリン液に固定した。さらに半数の内分泌かく乱化学物質に暴露した妊娠マウスは、妊娠19日に帝王切開して雄胎児を摘出し、胎児は無処置マウスに哺育させた（養母哺育）。これらの児は、生後9、14あるいは28日にエーテル麻酔して屠殺し、実体顕微鏡下で開腹して精巣を摘出した。摘出した精巣は同様に0.1M 磷酸緩衝10%ホルマリン液に固定した。固定した胎児生殖巣および新生児精巣は、常法に従いパラフィン包埋

し、光顕観察を実施するとともに、Tunel 法に準じてTunel 陽性細胞の有無を観察した。

〈倫理面への配慮〉

いずれの実験においても使用した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など苦痛の少ない方法を用いた。

長尾哲二；内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究

Sprague-Dawley 系ラット（チャールズ・リバー株式会社）の雌雄を終夜同居して交尾した雌ラットを自然分娩させ、新生児を得た。新生児は生後1～5日（出生日＝生後0日と規定）に連続して、DESの0、1、10、50あるいは100 μg/kg/day を背部に皮下注射した。最終投与の24時間後に、各腹の雄出生児の半数を屠殺して脳を摘出し、以下の実験を行った。

〔実験1〕 視床を含む部位を0.1M 磷酸緩衝10%ホルマリン液にて固定した。これらの固定標本についてはパラフィン包埋後に切片を作成し、Tunel 法に準拠して過剰アポトーシス細胞を観察した。

〔実験2〕 青班核における過剰アポトーシスについても観察した。青班核は、大脳皮質や脊髄まで軸索を伸ばしている、脳幹の橋にある神経細胞群である。摘出した脳は、0.1M 磷酸緩衝10%ホルマリン液に固定し、常法に従いパラフィン包埋して、Tunel 法に準じてTunel 陽性細胞の有無を観察した。

次いで、脳の各部位に対する内分泌かく乱化学物質の神経伝達系への影響を検討する目的で、〔実験3〕生後1～5日に連続してDESの100 μg/kg/day を背部に皮下注射して、成熟させ生後10週に断頭にて屠殺して脳を摘出し、氷上にて大脳皮質前頭部、線条体、海馬、中脳および視床下部に分離した。ドパミン(dopamine: DA)、セロトニン(5-hydroxytryptamine:5-HT)およびそれらの代謝物(dihydrophenylacetic acid:DOPAC、homovanilic acid:HVA、5-hydroxy-3-indolacetic acid:5-HIAA)をHPLC-ECDを用いて測定した。

〈倫理面への配慮〉

使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは断頭など苦痛の少ない方法を用いた。

白井智之；トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱化学物質の検討

6週齢の雄性 probasin-SV40 Tag Tg ラットに、アトラジンの0%、0.05%あるいは0.1%を13週間混餌投与した。投与終了時に剖検し、前立腺重量及び血清中テストステロン濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋市立大学動物実験委員会の許可を得て、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護を十分配慮しおこなった。

広瀬雅雄；内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究

F344 妊娠雌ラット 10 匹を 2 群に分け、出産直後より、通常飼料 (AIN-93G、オリエンタル酵母工業) 及び低ヨード飼料 (AIN-93G、Iodine free) により飼育した。生後 3 週で児動物を離乳すると同時に、児動物にも 3 週間にわたり同じ飼料を与えた。生後 6 週より DHPN を 0.1% (雄) あるいは 0.2% (雌) 濃度で 4 週間飲水に混じ、更に生後 7 週時に 7,12-dimethylbenz[a] anthracene (DMBA) を 50 mg/kg 体重の用量で強制経口投与した。発癌物質処置終了後は、毎週 1 回、胸・腹部の触診を行い、触知可能な腫瘍の発生の有無を観察するとともに、腫瘍が触知された際にはその発生部位及び大きさを記録している。現在、発癌物質処置終了後 20 週目 (2004 年 1 月末現在) であり、実験を継続している。

(倫理面への配慮)

動物の取扱いは、国立医薬品食品衛生研究所の規定に基づいて行っている。なお、屠殺はエーテル深麻酔下、動脈からの脱血により行い、動物へ苦痛を与えないよう留意する。

長村義之；内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんおよび腫瘍発生に関する研究

代表的な乳腺発がんの実験モデルである DMBA ラット乳腺発がんモデルを用いて、E₂

処置が用量の差により腫瘍発生に及ぼす影響について検索した。

7 週齢の雌性 SD 系ラットに DMBA 100 mg/kg を 1 回経口投与し、2 週間後に卵巣摘出術(OVX)を実施し使用した。2 週間後に E₂ を 0、10、30、1000 μg/kg/週の用量で 30 週間反復筋肉内投与した(順に 2~5 群)。対照として DMBA 投与後、偽処置(Sham)を実施した動物を用いた(1 群)。投与後、乳腺腫瘍の発生率、発現期間、腫瘍個数および重量、病理組織学的検査を行った。また、免疫組織化学法、RT-PCR 法および Western blotting 法を用いて、エストロゲンレセプター(ER α 、ER β) および細胞増殖調節蛋白 Ki-67 の発現を解析した。

代表的な乳腺発がんの実験モデルである DMBA ラット乳腺発がんモデルを用いて、エストラジオール(E₂)処置が用量の差により腫瘍発生に及ぼす影響について検索した。

7 週齢の雌性 SD 系ラットに DMBA 100 mg/kg を 1 回経口投与し、2 週間後に卵巣摘出術(OVX)を実施し使用した。2 週間後に E₂ を 0、10、30、1000 μg/kg/週の用量で 30 週間反復筋肉内投与した(順に 2~5 群)。対照として DMBA 投与後、偽処置(Sham)を実施した動物を用いた(1 群)。投与後、乳腺腫瘍の発生率、発現期間、腫瘍個数および重量、病理組織学的検査を行った。また、免疫組織化学法、RT-PCR 法および Western blotting 法を用いて、エストロゲンレセプター(ER α 、ER β) および細胞増殖調節蛋白 Ki-67 の発現を解析した。

吉田 緑；内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

動物には約 4 ヶ月齢までは規則正しい性周期を示すものの、早期からのホルモンバランスの異常によりヒト子宮体部癌類似の子宮内膜腺癌が好発する Crj:Donryu ラットを用いた。

1. ヒト暴露相当量を含む低用量の内分泌かく乱化学物質暴露が雌性生殖器に及ぼす影響
前年度に実施した BPA と同様の方法で NP

の胎生期・授乳期暴露がラット雌性生殖器に与える影響について検索した。NPの投与量として明らかなエストロゲン作用を示す量、多世代繁殖試験における無影響量、ヒトの一日摂取量の近似値であることから、100、10、0.1mg/kgを選択した。

NPともに妊娠2日目から離乳前日まで母ラットに強制経口投与した。児ラットの雌性生殖器への影響の検出するために、OPの新生児期大量暴露実験で観察された各項目を指標として、性成熟までの発育・分化、性腺刺激ホルモンの測定(FSHおよび卵巣からのインヒビリンについて)および長期に亘る性周期について検索した。ENNG誘発子宮発癌への修飾作用についても15ヶ月齢まで観察し、子宮の増殖性病変について形態学的に検索した。

また、母動物から児への移行は検索するために、母ラットの血清、母乳および児ラットの血清および肝臓中のNP濃度を測定した。

2. 新生児期大量暴露を受けた卵巣における細胞増殖関連の遺伝子変化について

材料は前年度の実験で得られた卵巣を用いた。実験概略として生後1日齢より新生児雌ラットにp-tert-octylphenol(OP)100mg/kgを5日齢(PNDs1~5群)または15日齢(PNDs1~15群)まで隔日皮下投与した。15日齢投与は性成熟前から生殖器系に異常を示し、5日齢は性成熟後に遅延型の影響を示す投与期間である。

前年度は14週齢にて正常性周期(発情期の午前中)および持続発情を示した動物の卵胞数・黄体数など卵巣の形態について検索したが、これらの卵巣についてさらにlaser micro dissection法により発育卵胞および閉鎖卵胞を構成する顆粒膜細胞を集めた。卵巣ごとに集積したRNAを用いてGAPDHの発現を確認後、細胞増殖に関連するBcl-2、insulin growth factor receptor およびcyclin D2についてRT-PCR法により発現の有無を検索した。

〈倫理面への配慮〉

本実験は「動物の保護及び管理に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)」の主

旨およびおよびWHO(World Health Organization:世界保健機構)の医学研究顧問委員会の勧告に基づきCIOMS(The Council for International Organization of Medical Sciences:国際医科学関係組織協議会)が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に沿って実施した。

C. 研究結果

菅野 純；総括補佐及びOECDバリデーション関連総括・確定試験開発関連調査研究

2003年4月15日、パリのOECD本部で開催された、OECD哺乳綱動物バリデーション運営委員会において、げっ歯類一生涯試験プロトコルの発表がなされ、概念整理の段階であるが、概要として以下のような点を提案した。

- ① 実験期間は最長で受精前(交配前)から死までの単一世代とし、一生涯を概念的にカバーする。
- ② 従来の生殖毒性試験及びその改良試験において実施されている検査項目の実施(取捨選択はあり得る)；同腹仔数、性比、肛門生殖突起間距離、身体発育、繁殖能力、乳頭遺残、膈開口、包皮分離、性周期モニター、精子数、等
- ③ 行動異常など神経学的検索を、初期(環境省の改良一世代試験で採用されている17週まで)に加えて、26週以降を目安とした神経学的検索、記憶や学習の能力に関する検討(老化の観点から)を行う。
- ④ 幼若、成熟及び老齢期における免疫能の測定。
- ⑤ げっ歯類における生殖内分泌系の老化現象としての常時発情等の現象の早期発来がモニターできる期間が必要である。
- ⑥ その他、前立腺形成阻害・過形成、等を考慮する可能性がある。

また、本研究において、生物個体の一生涯を対象とした毒性試験という立場からEDCsの毒性評価を進めることを提案するに至った。

受精前後から死に至るまでの期間をカバーすることを念頭に置いた上で、不必要な部分を切り取る作業を行うことで、漏れの無いプロトコールを作成する。生殖毒性に捕らわれず、神経系、内分泌生殖系の他、免疫系、それら個々及び相互連携の発達と老化など、あらゆるものを考慮した上で、必要十分な実質実験プロトコールを開発することを目的に調査活動を行った。更に、第一線の神経行動学研究者、免疫学者を迎えて、Ad hoc研究会を開催し（平成15年11月11日、於東京国際フォーラム）確定試験としての齧歯類一生涯試験の構想の現実性、問題点を整理し、本申請へ向けての班員構成や必要とされる研究テーマの整理等を行った。

(1) 〈プレスクリーニング系追加試験〉

西原 力；酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーション - 特に複合効果の検討 -

E₂作用促進物質を Yeast Two-hybrid 試験によりスクリーニングしたが、検索できなかった。しかし、乳がん細胞 MGF-7 を用いたレポーター遺伝子試験で E₂ 共存下にエストロゲン様活性を測定したところ、7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin (BFC)、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) および 2-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBT) が検索された。中でも CDNB は 5 μM で 1 nM E₂ の活性を 4 倍程度増強した。なお、これらの物質は単独ではエストロゲン作用を示さず、ER との結合性もなかったことから、ER と E₂ の相互反応には直接関係のない経路、例えば MAPK 経路で、その作用を顕わしたと推定された。

17 種類 (ERα, ERβ, PR, AR, GR, MR, RARα, RARβ, RARγ, TRα, TRβ, VDR, RXRa, RXRβ, RXRγ, FXR, CAR) の核内レセプターの系について酵母 Two-Hybrid 試験系を作成し、既知リガンドによりその反応性や感度を確認したのち、ED 容疑物質を中心とした 23 物質について網羅的にアゴニスト活性を測定した。その結果、4-alkylphenol 類や

benzophenone、DES は、強さに強弱はあるもの、ERs だけではなく、RARs や RXR、CAR にも結合し、また、有機スズ化合物は RXRs と強く反応した。

松島裕子；マイクロアレイ法の基盤技術調査

マイクロアレイプラットフォーム間の比較

GeneChip と CodeLink は良い定量性を示すことが分かった。しかし、CodeLink は 1 つの遺伝子に対しプローブが 1 カ所であり、Gene Chip が数カ所のスポットを用いるのに比べて、個々のチップ毎に測定値が得られない欠測スポット (遺伝子) の出現率が高いという問題点を有することが明らかとなった。また、プローブセット数は GeneChip が約 4 万種類 / chip、CodeLink は約 2 万種類である。また、染色工程が GeneChip は自動化されているのに対し、CodeLink は手作業方式である。

Spike RNA を用いた絶対的な遺伝子発現比較

本年度は、今後引き続き安定して実施するために、Spike RNA cocktail の大量調製を行った。

極微量サンプルからのマイクロアレイ解析

Affymetrix 社 GeneChip の標準プロトコールでは、マイクロアレイ解析に必要な全 RNA 量として、5 μg が推奨されている。今回、T7 RNA polymerase による in vitro transcription を 2 回行う方法 (2 回増幅法) によって 10 ng の全 RNA からマイクロアレイデータを得ることが可能であることが確認された。

(2) 〈スクリーニング試験系確立研究〉

高木篤也；ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響

ES 細胞浮遊培養系に種々のエストロゲン様物質を添加し、4 日後に胚様体 (EB) を採取し、実体顕微鏡下で形態を観察した。その結果、DES の 1、0.1、0.01 nM 群で有意な減少が認められた。BPA では低用量の 1、0.1 μM 群で有意な減少が見られたが、10 μM 群では対照

群と差が無かった。E2では1、0.1、0.01nM群とも有意な減少が認められた。GENでは0.1、0.01 μ M群で有意な減少が見られたが、1 μ M群では有意な減少は見られなかった。4-NPでは1、0.1 μ M群で有意な減少が見られたが、10 μ M群では有意な減少は見られなかった。DEHPでは100、10、1 μ M群とも有意な減少が見られた。ERのアンタゴニストのICI-182,780では有意な減少が見られたが、サイズの大きなEBも散見された。

永井賢司；子宮肥大試験及び

Hershberger試験における遺伝子発現変化に関する研究

〈実験1：EE単回経口投与後の子宮重量および子宮の遺伝子発現量の経時変化〉

子宮重量は、EE投与後6~48時間で有意な高値を示した。ピークにあたる投与後24時間のEE群の子宮重量は、溶媒群の1.92倍であった。

子宮における性ステロイドホルモンレセプター遺伝子、エストロゲン応答遺伝子およびWntファミリー遺伝子の発現量は、EEの投与により様々な変動を示した。

性ステロイドホルモンレセプター遺伝子としては、PR、ER α およびARについて評価した。

PR mRNA量は、EE投与後の経時的変動パターンが類似していた。PR mRNA量は、EE投与後24時間（溶媒群の0.40倍）をピークとして、12~48時間の間で有意な低値が認められた。ER α mRNA量は、EE投与後48時間（溶媒群の0.57倍）をピークとして、24~48時間の間で有意な低値が認められた。

AR mRNA量は、EE投与後1~3時間に溶媒群の約2倍の値を示し、3時間では有意な高値（溶媒群の1.93倍）が認められた。EE投与後6~24時間では溶媒群とほぼ同様の値であったが、48時間では有意な低値が認められた（溶媒群の0.50倍）。

エストロゲン応答遺伝子としては、complement C3 (C3)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) およびcyclin D1について評価した。

C3 mRNA量は、EE投与後24~48時間（溶媒群の43.90~77.83倍）をピークとして、6~48時間の間で有意な高値が認められた。

IGF-1 mRNA量およびcyclin D1 mRNA量は、EE投与後の経時的変動パターンが類似していた。IGF-1 mRNA量およびcyclin D1 mRNA量は、いずれもEE投与後3時間（IGF-1 mRNA量：溶媒群の9.67倍、cyclin D1 mRNA量：溶媒群の1.89倍）をピークとして3~12時間の間で有意な高値が認められた。しかし、以降はいずれの発現量も減少し、IGF-1 mRNA量ではEE投与後48時間（溶媒群の0.53倍）、cyclin D1 mRNA量ではEE投与後24時間（溶媒群の0.45倍）に有意な低値が認められた。

Wntファミリー遺伝子としては、Wnt4、Wnt5a およびWnt7aについて評価した。Wnt4 mRNA量およびWnt5a mRNA量は、EE投与後の経時的変動パターンが類似していた。Wnt4 mRNA量は、EE投与後3時間（溶媒群の2.39倍）をピークとして、6~12時間の間で有意な高値が認められた。Wnt5a mRNA量は、EE投与後3時間（溶媒群の2.12倍）で有意な高値が認められた。しかし、EE投与後24~48時間の間では、逆にWnt4 mRNA量およびWnt5a mRNA量の有意な低値がみられ、そのピークはEE投与後48時間（溶媒群の0.43倍および0.39倍）であった。

Wnt7a mRNA量は、EEの投与により、投与後1時間から有意な低値が認められた（溶媒群の0.70倍）。EE投与後3時間では有意な差はみられなかったものの、EE投与後1時間と同じく溶媒群の0.70倍の発現量であった。それ以降は、EE投与後24時間（溶媒群の0.15倍）をピークとして、6~48時間の間で有意な低値が認められた。

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。したがって、以降の実験2~4では、被験物質投与後24時間に子宮を摘出し、各パラメータについて評価することとした。

〈実験2：EE単回経口投与後の子宮重量の用