

2. 学会発表（招待講演のみ）

- ・ 西原 力：化学物質のリスク評価とリスク管理—化学物質とうまく付き合うには、東北大学多元物質科学研究所特別講演、2004/1/23
- ・ 西原 力：環境ホルモン問題の現状と課題、大阪府成人病公開講座、2004/1/13
- ・ 西原 力：内分泌かく乱物質県研究の現状と課題、呉羽山シンポジウム、2003/7/26
- ・ 西原 力：化学物質のバイオアッセイとリスクアセスメント、環境省環境研修、2003/6/20
- ・ 西原 力：化学物質のリスクアセスメント—私たちができること—、日本薬学会第123年会、2003/3/29
- ・ T. Nishihara: *in vitro* Assay for Detecting Endocrine Disruptors by using Yeast Two-Hybrid System, APEC Workshop, Korea, 2002/9/28
- ・ T. Nishihara: *in Vitro* Assays & Models for Detection of Endocrine Disruptors、Food Safety 2002、Portugal、2002/5/24
- ・ 西原 力：内分泌攪乱物質問題の現状と課題、富山医科薬科大学和漢薬研究所セミナー、富山、2002/4/15
- ・ 西原 力：化学物質とうまくつきあうには—内分泌攪乱物質問題を中心に—、第17回湯川記念講演会、大阪、2001/11/10
- ・ 西原 力：化学物質のリスクアセスメント—ダイオキシン、内分泌攪乱物質を例に—、特別講義「科学技術論」、大阪、2001/7/6

- ・ 西原 力：酵母 Two-Hybrid System を用いたエストロゲン作用活性の検出法、JEMS. BMS 研究会第 27 回定例会、東京、2001/6/1
- ・ 西原 力：酵母 Two-Hybrid System 試験：内分泌攪乱化学物質の評価・試験法—*in vitro* assay 法とその問題点、日本薬学会 121 年会、札幌、2001/3/29.

H. 知的財産所有権の出願

1. 特許取得

- ・ 植田充美、田中渥夫、西川淳一、西原力、河田直紀：内分泌攪乱物質結合領域を細胞の表層に有する微生物およびその応用、特開 2002-153287、2002/.5/28

2. その他

なし

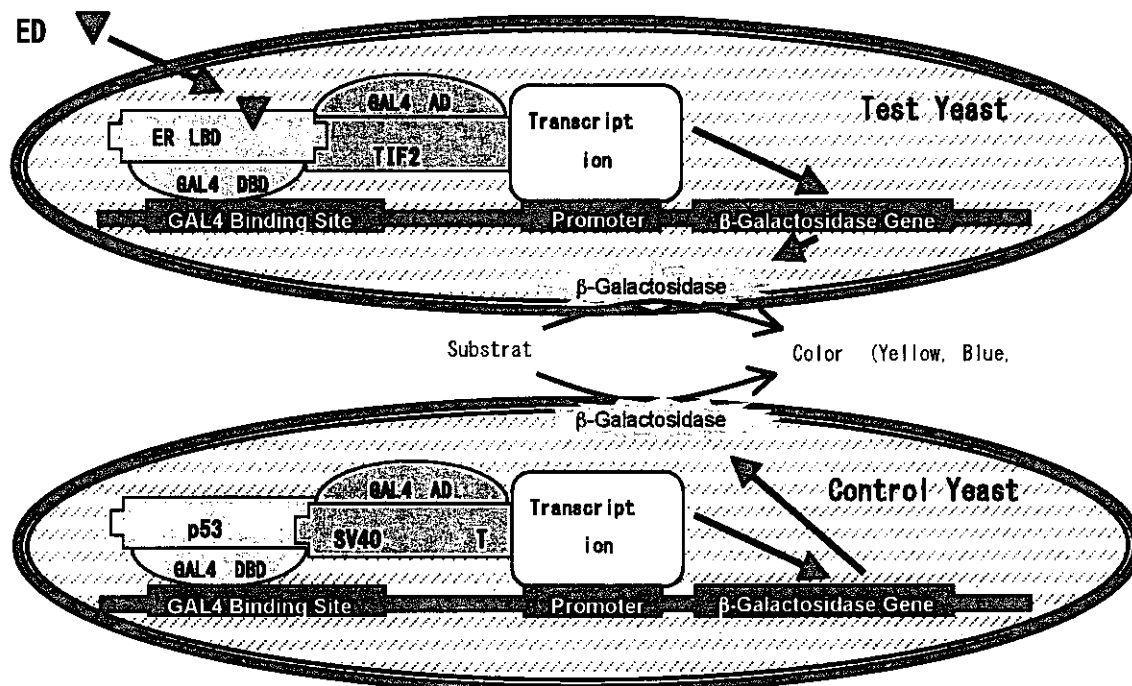


Fig. 1 Outline and Principle of Yeast Two-Hybrid Assay

HR LBD: Hormone Receptor Ligand Binding Domain

GAL4 AD: GAL 4 Activation Domain

GAL4 DBD: GAL4 DNA Binding Domain

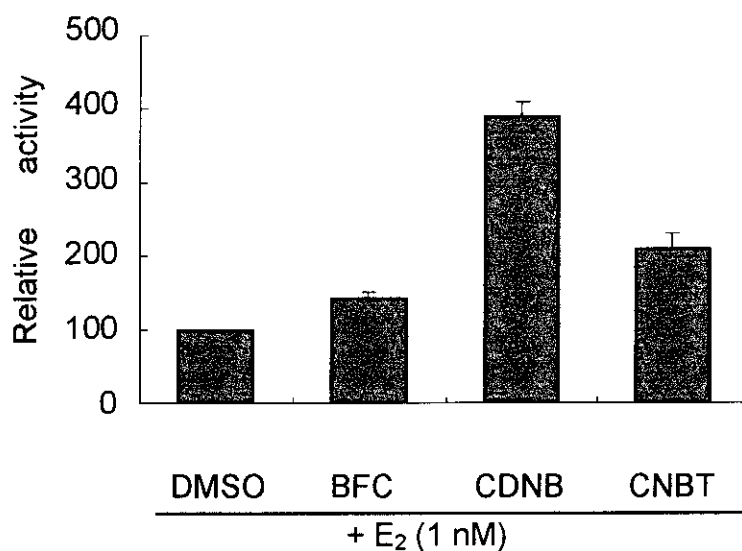


Fig. 2 Enhancement of E₂-induced Transcriptional Activity by Chemicals

Estrogenic activity was determined by the reporter gene assay using MCF-7 cells on 10 μ M BFC, 5 μ M CDNB, or 1 μ M CNBT with 1 nM E₂. Relative activity was expressed the luciferase activity of E₂ as 100 %. Values represent the mean \pm SD (n = 3).

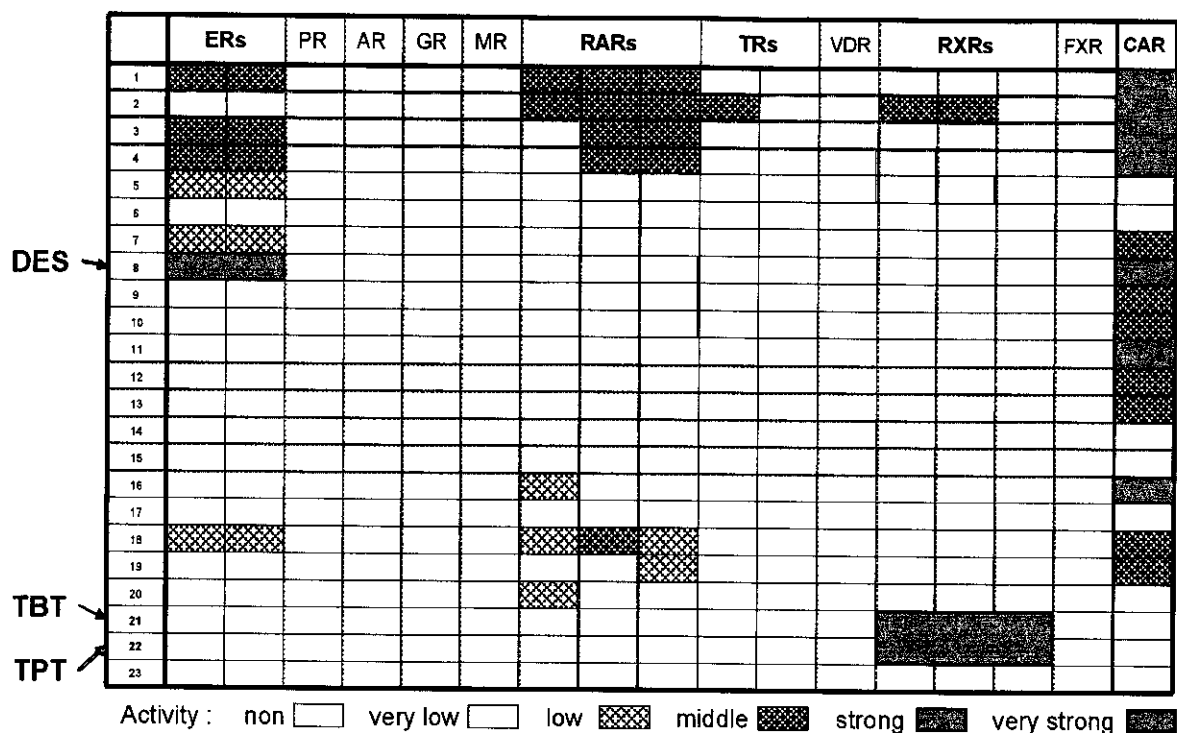


Fig.4 Agonistic Activity of Suspected EDs to Various NRs

Table 1 Test Chemicals for Agonistic Activity to Various NRs

No.	Name	Use
1	4-Butyl phenol	Industrials
2	2-Butyl phenol	Industrials
3	4-t-Octyl phenol	Industrials
4	Nonyl phenol	Industrials
5	2,4-Dichlorophenol	Industrials
6	Pentachlorophenol	Fungicide
7	Bisphenol A	Industrials
8	Diethylsterbesterol (DES)	Medicine
9	Diethyl phthalate	Phthalate
10	Dipropyl phthalate	Phthalate
11	Di-n-butyl phthalate	Phthalate
12	Di-n-pentyl phthalate	Phthalate
13	Dihexy phthalate	Phthalate
14	Dicyclohexyl phthalate	Phthalate
15	Diethylhexyl phthalate	Phthalate
16	Butyl benzyl phthalate	Phthalate
17	Amitrole	Agrochemical
18	Benzophenone	Industrials
19	Octachlorostyrene	Industrials
20	4-Nitrotoluene	Industrials
21	Tributyltin chloride (TBT)	Fungicide
22	Triphenyltin chloride (TPT)	Fungicide
23	Diocetyl adipate	Phthalate

3. マイクロアレイ法の基盤調査

分担研究者 松島 裕子

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・主任研究官

研究要旨

本研究では、マイクロアレイ法を内分泌かく乱化学物質研究に適応する際に必要となる基盤技術の検討及び必要な新技術の開発による基盤技術整備を行う。本年度は、マイクロアレイプラットフォーム間の比較 (Affymetrix 社 GeneChip とアマシャムバイオサイエンス社 CodeLink)、絶対量的遺伝子発現量測定に必要な Spike RNA cocktail の大量調製、下垂体、胎児等の少量臓器を解析する際に必要な極微量 RNA サンプルからのマイクロアレイ解析可否の検討を行った。プラットフォーム間の比較については、現在基本プラットフォームとして用いている GeneChip に比し、CodeLink がほぼ同等の質のデータを与えることが判明した。Spike RNA cocktail の大量調製については、約 6 万サンプルを解析するために必要な量の調製に成功した。極微量サンプルからのマイクロアレイ解析については、cRNA 増幅を 2 回行うことによる方法を検討し、利用の目処をつけた。これらの基盤整備により、当班でのマイクロアレイ解析は全て Spike RNA を用いた絶対的遺伝子発現量測定を行うことが可能となった。本技術を用いれば、マイクロアレイデータの品質管理、プローブ配列の変更を伴うチップのバージョンアップや試薬の改良に伴うデータ変換、各プラットフォームの性能チェック及びプラットフォーム間のデータ変換にも対応することが可能である。

A. 研究目的

DNA マイクロアレイ技術は一回のハイブリダイゼーションで数万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。

B. 研究方法

マウス組織からの RNA の分離精製

マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが 5mm 以下となるように細切した。その後、RNA 抽出操作まで -80℃ にて保存し、RNAlater を除いた後、TRIzol (インビトロジェン社) を用いて RNA の粗抽出を行い、さらに RNeasy キット (キアゲン社) を用いて全 RNA を精製した。得た全 RNA の 0.5µg を電気泳動し品質を確認した。

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 Lambda phage DNA (Bacteriophage lambda B capsid component)、Bacillus subtilis DNA (DAP, PHE, THR, TRP, LYS) の計 6 種類の遺伝子を用いた。Lambda phage DNA 断片は plasmid vector pBluescriptII を鋳型に PCR にて増幅し、増幅断片に poly A 配列 (16ヶの A) および T7 promoter 配列を 3'側に付加し、同 plasmid vector に組み込んだ。Bacillus DNA は T3 promoter 下流に各遺伝子断片が組み込まれた ATCC 以降のベクターを購入し用いた。Ambion 社の T7 もしくは T3 in vitro transcription kit にて、RNA を合成後、polyA+RNA を oligo dT を付加した磁性体を利用して精製し、予定した混合比で混ぜ、Spike RNA cocktail とした。

Gene Chip 解析

Affymetrix 社のプロトコールに従い、全 RNA 5 µg 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 (Affymetrix 社キット) を用

い、ビオチン化 CTP を取り込み、ビオチンラベルされた cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社の GeneChip sample cleanup module キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip はマウス MOE430A を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃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、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 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 は既述の方法で精製した。5µg, 1µg, 100ng, 50ng, 20ng, 10ng を準備し、T7-dT (T7 promoter を有する oligo dT primer) を用い、Superscript II (インビトロジェン社) にて逆転写し、第一鎖 cDNA を得た。次に、E. coli DNA polymerase, RNase H, DNA ligase を用いて第二鎖 cDNA を合成し、二本鎖 cDNA とした。精製した cDNA を鋳型に用いて、T7 RNA polymerase (Affymetrix kit : Enzo 社製) にて cRNA を合成した。5µg RNA サンプルについては、biotin-UTP, CTP を加え、biotin ラベルされた cRNA とした。他の量の RNA サンプルについては、2 回増幅を行うため、1 回増幅のステップにおいては biotin-UTP, CTP を加えずに反応させ cRNA を得た。2 回目の増幅に際して、1 回目の増幅で得た cRNA を用い、

Random hexamer を primer に用いて逆転写し、1 本鎖 cDNA を得、2 本鎖 cDNA の合成以降は 1 回目の増幅手順に従った。ただし、2 回目の cRNA 合成時には biotin-UTP, CTP を添加し、最終的に得られる cRNA を biotin ラベルし、GeneChip 解析に供した。

C. 研究結果

マイクロアレイプラットフォーム間の比較

オリゴ DNA を基盤上に合成する GeneChip (Affymetrix 社) とオリゴ DNA をスライドガラス上にスポットするガラスアレイの、2 種のプラットフォームにより得られる遺伝子発現データを比較した。GeneChip との比較対象として、昨年度はクロンテック社のガラスアレイを用いたが、今年度はアマシャムバイオサイエンス社の CodeLink を用いた。

同一の RNA から各プラットフォームに対応するターゲット液を調製し、得られた発現データを比較した。サンプル RNA には、遺伝子発現プロファイルが大きく異なる 2 つの臓器、肝臓と脳から調製した RNA を、100%:0%, 75%:25%, 50%:50%, 25%:75%, 0%:100% の 5 種類の混合比で混ぜたもの (LBM (Liver Brain Mix) RNA) を用意した。この LBM RNA を用いることにより、マイクロアレイ上に配置された遺伝子プローブの発現定量性、すなわち各プローブが対象遺伝子の発現量に相関したシグナルを与えるかについて検討することが可能である。

その結果、GeneChip は良い定量性を示すことが改めて示され、CodeLink も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、GeneChip が複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今回実際にデータを測定して明らかとなった。プローブセット数は GeneChip が最新バージョンでは 1 チップに約 4 万種類、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。以上を総合すると、現段階では基本プラットフォームは GeneChip が最適であるが、CodeLink はそれに次ぐプラットフォームとして評価できると結論した。

Spike RNA を用いた絶対的な遺伝子発現比較

本方法の原理については昨年度の報告書に記載した。簡単に説明すると、臓器や細胞サンプルの DNA 量を元に各遺伝子の発現シグナル値を標準化することで、細胞 1 個当たりの発現量、すなわち、コピー数 (mRNA 数 / 細胞) に対応する値に変換する (絶対量化する) 方法である。その際、臓器、細胞の粗抽出液中の DNA 量を測定し、DNA 量に対して一定量の spike RNA を添加することが必要である。

昨年度までに、本法の技術開発をほぼ終了できたので、本年度は、本方法を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。その結果、約 6 万サンプルを解析するのに十分な量の Spike RNA cocktail を調製することに成功した。具体的には、必要な各 Spike RNA 量を見積もり (10~620 μ g の polyA+ RNA)、in vitro transcription によって RNA を産生し、oligo dT 磁気ビーズによる精製を経て予定した混合比で混ぜ、Spike RNA cocktail とした。

実際にマウス肝臓等の臓器に、調製した Spike RNA cocktail を添加して GeneChip 解析し、理想的な数値が得られることを確認した。さらに、本技術では DNA 当たり添加する Spike RNA cocktail の量 (Spike factor) を解析対象とする臓器毎に最適化する必要があることに対応し、肝臓を対象に、Spike factor の検討を行い、DNA 1ng 当たり 0.02 μ L の添加量が最適であるとの結論を得た。

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 μ g が推奨されている。しかし、下垂体や胎児組織等、今後内分泌かく乱化学物質研究で対象とする臓器はごく少量であり、それら臓器から得られる全 RNA は極微量であることを考えると、より少ない全 RNA でのマイクロアレイ解析を当班で可能としておくことが重要である。そこで、肝臓全 RNA を、5 μ g, 1 μ g, 100ng, 20ng 及び 10ng 準備し、T7 RNA polymerase による in vitro transcription

を 2 回行う方法 (2 回増幅法) によって必要量の cRNA を得、マイクロアレイ解析可能かどうか検討した。その結果、10ng 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できた。

D. 考察

昨年度は、GeneChip と同等の性能を有する他のプラットフォームが見いだせていない状況であったが、本年度の検討により、CodeLink が GeneChip に次ぐプラットフォームとして評価できることがわかった。染色工程の自動化、品質の安定性、将来の発展性等、総合評価としては GeneChip が現状では依然、最も優れたマイクロアレイプラットフォームであるとの結論は変わらないが、1 種類のプラットフォームに固執せざるを得ない状況は回避できることとなった。比較的少数のサンプルを予備的にマイクロアレイ解析するなどの用途において、CodeLink を選択する (GeneChip と異なり、自動化に必要な Fluidics や専用スキャナーなどの設備が不要であるため) 研究者が一定数存在することは確実であり、今後 CodeLink を中心とする GeneChip 以外のプラットフォームの開発、利用動向も把握していく必要がある。

今年度、Spike RNA cocktail の大量調製に成功したことで、今後安定して Spike RNA を用いた絶対量化手法による遺伝子発現解析を行っていくことが可能となった。この手法は単に発現シグナル値を絶対化するに留まらず、他の手法では容易に判断しにくく研究者間で問題となっているマイク

ロアレイデータの品質チェックを同時に行うことができ、発展中の技術であるマイクロアレイのバージョンアップにも対応することができる画期的な方法であり、内分泌かく乱化学物質研究の基本技術として重要であると考えられる。

また、内分泌かく乱化学物質研究で対象となる臓器が少量のものが多くに対応し、極微量の全 RNA からマイクロアレイ解析可能であるかどうか検討し、10ng の RNA でも可能であることを確認した。品質の高いデータを得るには、20ng 以上の RNA を用いた方が良いが、通常の 5 μ g に比べると数百倍少ない RNA でマイクロアレイ解析可能であることが示された。ただし、2 回増幅の過程で発現プロファイルには一定の偏りが生じるので、1 回増幅によるデータと 2 回増幅によるデータを比較することは現在のところ不可能である。偏りの生じない微量サンプル解析方法の開発は今後の課題の一つである。

E. 結論

本年度までの検討により、DNA マイクロアレイ、特に Affymetrix 社の GeneChip システムを用いた遺伝子発現絶対量の網羅的測定を可能とするスパイク RNA システムを安定して利用する体制が整った。さらには極微量サンプルのマイクロアレイ解析が可能であることも明らかとなった。また、GeneChip 以外のプラットフォームとして CodeLink が評価できることが判明した。

以上、本研究により、スパイク RNA システムと多数遺伝子に関する検量線を組み

合わせ、遺伝子プローブ配列の変更を伴う version up への対応および異なるプラットフォーム間のデータ互換の確保を行うことで、DNA マイクロアレイ技術の発展に伴うバージョンアップにも対応可能なデータ取得システムの基礎が出来たものとする。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

- ・子宮肥大試験-卵巣摘出法、内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法（シュプリンガー・フェアラーク（株）、2000 年 9 月 19 日、松島裕子

2) 雑誌

- ・Yuko Matsushima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun kanno, Twenty-eight day repeated dose oral toxicity test of synergist of a pyrethroid insecticide, Bull Natl Inst Health Sci (2003)121, 040-047.
- ・小川幸男、関田清司、梅村隆志、齊藤 実、小野 敦、川崎 靖、内田雄幸、松島裕子、井上 達、菅野 純、Wistar ラットによるギムネマ・シルベスタ葉抽出物の 52 週間混餌投与毒性試験、食衛誌、45, 8-18、2003
- ・関田清司、梅村隆志、齊藤 実、小川幸夫、上野克典、金子豊蔵、内田雄幸、松島裕子、川崎 靖、井上 達、F344 ラットによるクーロー色素の 90 日間反復混餌投与毒性試験、食衛誌、43、148-154、2003

- ・ 関田清司、梅村隆志、齊藤 実、小川幸夫、上野克典、金子豊蔵。内田雄幸、松島裕子、川崎 靖、黒川雄二、井上 達、F344 ラットによるフクロノリ抽出物の90日間反復混餌投与毒性試験、食衛誌、43、96-101、2002

2. 学会発表

- ・ 卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた農薬 o,p'-DDT と Methoxychlor エストロゲン様作用の検討、環境ホルモン学会第5回研究発表会、平成14年11月25、26日(2002)、松島裕子、井上 達、菅野 純
- ・ 子宮肥大の特性について、第28回日本トキシコロジー学会学術年会、平成13年6月10～12日(2001)、松島裕子、井上 達、菅野 純
- ・ 17 β -estradiol の思春期前ラット投与における子宮肥大について -内分泌かく乱作用を照準とした経世代試験改良のための考察-、日本内分泌攪乱化学物質学会(環境ホルモン学会)、横浜、第3回、2000年、松島裕子、井上 達、菅野 純

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

(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

高木篤也

国立医薬品食品衛生研究所 安全生成物試験研究センター毒性部 主任研究官

研究要旨

発生初期の胎児は小さく、かつ、培養も困難なため、一般に解析が難しい。一方 ES 細胞から形成される胚様体は胎児の卵筒胚に近似している。そこで、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。ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で 4 日間浮遊培養し、その間、内分泌かく乱化学物質として Diethylstilbestrol (DES)、Bisphenol-A (BPA)、17 β -estradiol (E2)、Genistein (GEN)、4-Nonylphenol (4-NP)、Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) を添加した。形成された胚様体の形態学的検索を行った結果、いずれの検体添加によりサイズの低下が認められ、これらの影響は低濃度で強く認められる傾向にあった。この結果、ES 細胞培養系が内分泌かく乱物質の影響を検索するモデルとして有用であることが明らかになった。

A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。また、ES 細胞から形成される胚様体 (Embryoid body : EB と略す) は胎児の卵筒胚 (egg cylinder、5~7 日胚) に似ており、主に発生学の分野で発生初期胎児に発現する遺伝子の解析等に利用されている。さらに、ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。そこで、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。

B. 研究方法

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、0.1 μ M)、E2 (1、0.1、0.01nM)、GEN (1、0.1、0.01 μ M)、4-NP (10、1、0.1 μ M)、DEHP (100、10、1 μ M) を添加し、さらに、エストロゲン受容体 α (ER α) のアンタゴニストの ICI-182,780 (1 μ M) 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。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

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、0.01nM群で有意な減少が認められた。BPAでは低用量の1、0.1 μ M群で有意な減少が見られたが、10 μ M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。

D. 考察

EBはこれまでの検討の結果、各種エストロゲン反応性受容体を発現することから、エストロゲン様物質の検出系として適していることが示唆され、本年度は、形態学の観点から解析を行った。その結果、いずれのエストロゲン様物質添加によりサイズの低下が認められ、これらの影響はDEHPを除いて低濃度で強く認められる傾向にあった。これらサイズの低下及び低濃度

で作用が強いことの原因については現時点では明らかでないが、エストロゲン受容体のアンタゴニストICI-182,780ではサイズの小さなEBと大きなEBが同時に見られたことから、エストロゲン様物質が、濃度により、EBのサイズの減少にも増加にも双方向に働きうることを示唆された。以上、ES細胞培養系は内分泌かく乱物質の影響を検索するモデルとして有用であり、特に低用量域での作用を検索するモデルとしても有用であることが明らかになった。

E. 結論

ES細胞をLIFを除いたES培地で4日間浮遊培養し、内分泌かく乱化学物質としてDES、BPA、E2、GEN、4-NP、DEHPを添加した結果、いずれの検体添加によりEBのサイズの低下が認められ、ES細胞培養系が内分泌かく乱物質の影響を検索するモデルとして有用であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 書籍

高木篤也、ヒト全MHC遺伝子導入マウス、ヒト型モデル動物、pp79-82、井上達、野田哲生、野本明男編集、シュプリンガーフェアラーク社、2002。

2) 雑誌

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A.,

Takeda H., Inoue T. and Saga Y.,
Transcriptional regulation of Mesp1
and Mesp2 genes: differential usage
of enhancers during development.
Mechanisms of Development, 108
59-69, 2001.

学会発表

Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko
Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto
Ema and Jun Kanno, Assessment of
the cleft palate induction by seven
PCDD/F congeners in the mouse fetus.
The 23rd International Symposium on
halogenated Environmental
Organic Pollutants and POPs.
USA, 2003年8月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

5. 子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究

分担研究者 永井 賢司

所属機関名 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 部長

研究要旨 エストロジェン様物質が遺伝子発現に及ぼす影響を *in vivo* で評価するための指標として、性ステロイドホルモンレセプター遺伝子、エストロジェン応答遺伝子および Wnt ファミリー遺伝子に着目した。幼若雌性ラットに ER agonist として ethynylestradiol (EE), genistein (GEN) および methoxychlor (MXC), ER antagonist として ICI 182,780 (ICI) を単回強制経口投与し、投与後のエストロジェン応答遺伝子および Wnt ファミリー遺伝子の発現量変化を real-time RT-PCR 法で評価した。単独投与では子宮重量増加の明瞭な評価が困難な用量における複合影響を検討するため、混合物投与後の子宮重量および遺伝子発現量変化について比較を行った。

A. 研究目的

子宮肥大試験における標的臓器での遺伝子発現の変化を代表的なエストロジェ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。

B. 研究方法

<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 (3 μ g/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 (ER α), androgen receptor (AR)], エストロジェン応答遺伝子 [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 3 μ g/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 3 μ g/kg の用量で単回強制経口投与した直後に ICI を 1 mg/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 μ g/kg, 3 群 : GEN 10 mg/kg, 4 群 : MXC 30mg/kg, 5 群 : EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg, 6 群 : EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg, 7 群 : GEN 10mg/kg + MXC

30mg/kg, 8 群 : EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg, 9 群 : EE 0.3 μ g/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、RNA later 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。

C. 研究結果

<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 量および ER α 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量反応性>

EE 単回投与後の子宮重量の用量反応性を検討するために、幼若雌性ラ

ットに EE を 0.3, 1 および 3 μ g/kg の用量で単回強制経口投与し、投与後 24 時間に子宮重量を測定した。

子宮重量は、EE 1 μ g/kg 以上の群で溶媒群に対して有意な高値が認められた。溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg 群で 1.27, EE 1 μ g/kg 群で 1.61 および EE 3 μ g/kg 群で 2.09 であった。

ER antagonist に対する子宮重量の反応性を検討するために、EE を 3 μ g/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した群では、EE 3 μ g/kg 群に対して有意な低値が認められた (EE 3 μ g/kg 群の 0.61 倍, 溶媒群の 1.28 倍)。

<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>

GEN および MXC 単回投与後の子宮重量の用量反応性を検討するために、幼若雌性ラットに GEN (10, 100mg/kg) および MXC (30, 300mg/kg) を単回強制経口投与し、投与後 24 時間に子宮重量を測定した。

GEN 群の子宮重量の溶媒群に対する割合は、GEN 10mg/kg 群で 1.19 倍, GEN 100mg/kg 群で 1.75 倍であり, GEN 100mg/kg 群で溶媒群に対して有意な高値が認められた。

MXC 群の子宮重量の溶媒群に対する割合は、MXC 30mg/kg 群で 1.27 倍, MXC 300mg/kg 群で 2.25 倍であり, MXC 30mg/kg 以上の群で溶媒群に対して有意な高値が認められた。

<実験 4 : EE, GEN, MXC および ICI の複合影響>

子宮重量の溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg 群で 1.10 倍, GEN 10mg/kg 群で 0.99 倍, MXC 30mg/kg

群で 1.17 倍, EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg 群で 1.28 倍, EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg 群で 1.35 倍, GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群で 1.35 倍, EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群で 1.40 倍であった。単独投与では、EE 0.3 μ g/kg 群, GEN 10mg/kg 群および MXC 30mg/kg 群のいずれにおいても有意な変化は認められなかった。

しかし、それらの混合物を投与した EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg 群, EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg 群, GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群, EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg のいずれにおいても、有意な高値が認められた。EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg + ICI 10mg/kg 群の子宮重量は、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群に対して有意な低値 (0.60 倍) が認められた。

子宮における C3 mRNA の発現量の溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg 群で 1.26 倍, GEN 10mg/kg 群で 1.20 倍, MXC 30mg/kg 群で 3.51 倍, EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg 群で 2.69 倍, EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg 群で 3.93 倍, GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群で 3.98 倍, EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群で 5.43 倍であった。単独投与では、MXC 30mg/kg 群では有意な高値がみられたものの、EE 0.3 μ g/kg 群および GEN 10mg/kg 群では有意な差は認められなかった。しかし、それらの混合物を投与した GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群および EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群において、有意な高値が認められた。EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg + ICI 10mg/kg 群の子宮における C3 mRNA の発現量は、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群に対して有意な低値 (0.17 倍) が認めら

れた。

子宮における Wnt7a mRNA の発現量の溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg 群で 0.97 倍、GEN 10mg/kg 群で 1.07 倍、MXC 30mg/kg 群で 0.73 倍、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg 群で 0.78 倍、EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg 群で 0.68 倍、GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群で 0.59 倍、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10 mg/kg + MXC 30 mg/kg 群で 0.64 倍であった。単独投与では、EE 0.3 μ g/kg 群、GEN 10mg/kg 群および MXC 30mg/kg 群のいずれにおいても有意な変化は認められなかった。しかし、それらの混合物を投与した EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg 群、GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群および EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg において、有意な低値が認められた。EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg + ICI 10mg/kg 群の子宮における Wnt7a mRNA の発現量は、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群に対して有意な高値 (2.07 倍) が認められた。

D. 考察

エストロゲン刺激に応答する遺伝子は、投与後の時間帯により、発現量の変動パターンが大きく異なることが明らかとなった。PR, ER α および AR といった性ステロイドホルモンレセプター遺伝子の発現量は、EE 投与後にいずれも減少することが明らかとなった。また、EE 投与後早期から誘導される C3, IGF-1, cyclin D1 といった古典的なエストロゲン応答遺伝子だけでなく、EE 投与後 24~48 時間で明瞭にダウンレギュレーションされた Wnt ファミリー遺伝子は、エストロゲン投与後に起こる様々な現象を理解する上で重要な遺伝子群であると考えられた。cyclin D1 遺

伝子は、エストロゲン応答遺伝子としてよく知られているが、Wnt シグナル伝達系の下流にある β -catenin/TCF 複合体の標的遺伝子としても報告されている。本実験における cyclin D1 遺伝子の変動パターンは、EE 投与後早期にはエストロゲン応答遺伝子として誘導され、Wnt ファミリー遺伝子の発現が減少する投与後 24 時間以降には β -catenin/TCF 複合体の標的遺伝子としてダウンレギュレーションされた可能性が示唆された。

EE, GEN, MXC および ICI の複合効果を検討するために、それらの物質をいくつかのパターンで混合し、子宮重量および子宮における遺伝子発現量の変化を評価した。

ER agonist の陽性対照として EE, GEN および MXC を用いた実験 1~3 の結果から、本試験条件下において、単独投与では子宮重量増加の明瞭な評価が困難な用量は、被験物質群の子宮重量が溶媒群の 1.3 倍未満 (あるいは付近) の場合であると判断した。したがって、単独投与の用量は、その条件を満たす用量として EE 0.3 μ g/kg, GEN 10mg/kg および MXC 30mg/kg を設定した。複合影響は、EE, GEN および MXC を前述の用量で混合した 2 種混合群および 3 種混合群について評価した。また、それらの影響が ER を介したものであることを確認するため、3 種混合群の条件で ER antagonist である ICI をさらに混合投与する 4 種混合群を設定した。

子宮重量では、EE 0.3 μ g/kg, GEN 10 mg/kg および MXC 30mg/kg の単独投与により明瞭な影響は認められなかった。しかし、全ての 2 種混合群および 3 種混合群では、より明瞭な子宮肥大反応を統計学的な有意差をもつ

て検出することができた。

子宮における C3 mRNA および Wnt7a mRNA の発現量についても、単独投与では不明瞭な影響しかみられない用量を 2 種あるいは 3 種混合投与することで、より明瞭な反応として検出できることが明らかとなった。

子宮重量, 子宮の C3 mRNA および Wnt7a mRNA 発現量に対する EE (0.3 μ g/kg), GEN (10mg/kg) および MXC (30mg/kg) の複合影響は, ER antagonist の ICI (10mg/kg) の混合投与によりいずれのパラメータの変化もキャンセルされた。したがって, 本実験でみられた EE, GEN および MXC の複合効果は, ER を介したものであると考えられた。

E. 結論

幼若雌性ラットの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 の単回強制経口投与により, 様々なパターンで誘導または抑制されることが明らかとなった。本実験条件下において, EE を単回強制経口投与後, 有用な情報が最も多く得られた時間帯は, 投与後 24 時間であった。

単独投与では子宮重量増加の明瞭な評価が困難な用量においても, 2 種あるいは 3 種を幼若雌性ラットに混合投与することで, より明瞭な子宮重量および子宮の遺伝子発現量の変化として検出できることが明らかとなった。

環境中には, 人工および天然のものも含め, 多数のホルモン様活性物質および抗ホルモン様活性物質が混合物として存在する。しかし, 生体への影響は単独影響に多くの焦点が当てられており, 複合影響に関しては不明な点が多い。今後は, 混合物の

複合影響についても, 研究していく必要性があるものと考えられる。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 去勢成熟ラットの前立腺腹葉におけるアポトーシスを指標とした *in vivo* 抗アンドロジェン活性評価系の検討

片山誠一, 成見香瑞範, 岡村隆之, 永井賢司

第 27 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2000 年)

2) Linuron 投与によるラット前立腺腹葉におけるアポトーシスの誘導

片山誠一, 成見香瑞範, 岡村隆之, 永井賢司

第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001 年)

3) 幼若雌性ラットを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化

片山誠一, 岡村隆之, 永井賢司

第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002 年)

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

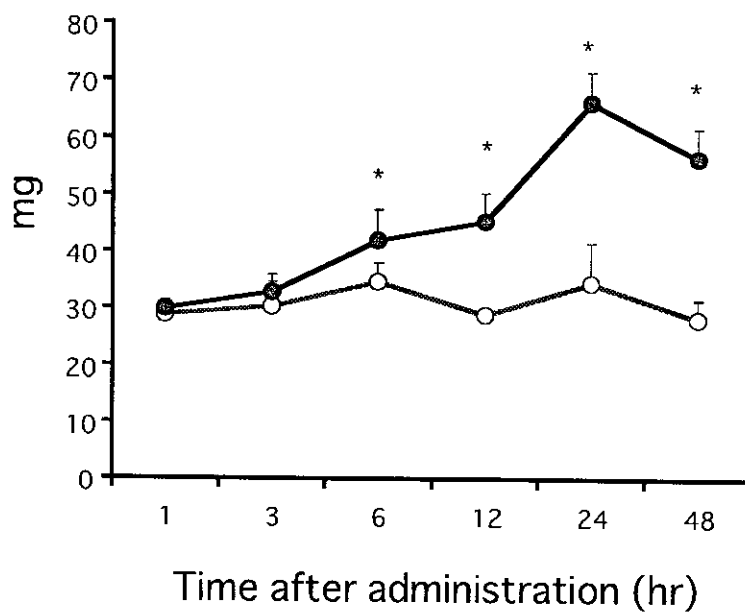
片山誠一, 芦沢幸二, 永井賢司

第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2003 年)

H. 知的財産所有権の出願, 登録状況

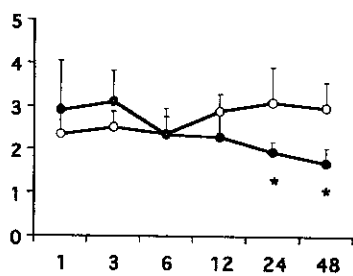
なし。

Uterine weight

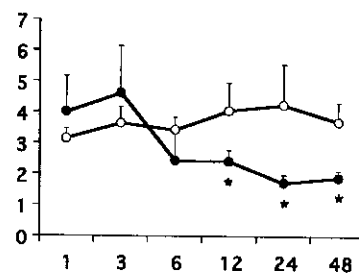


○ : Vehicle, ● : EE 3 μg/kg Mean ± SD, *: p<0.05

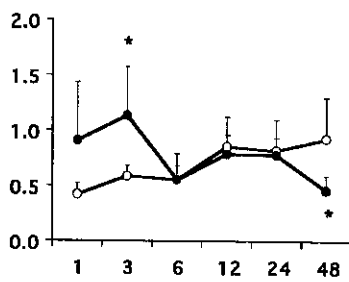
ER α mRNA



PR mRNA



AR mRNA

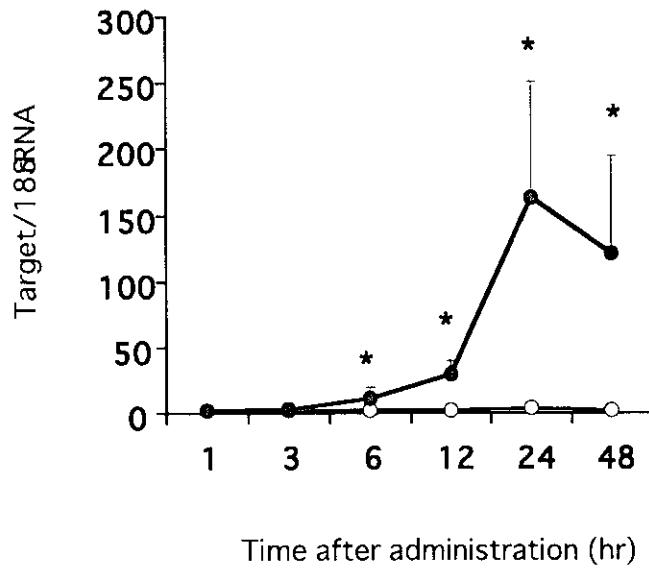


Target/18S RNA

Time after administration (hr)

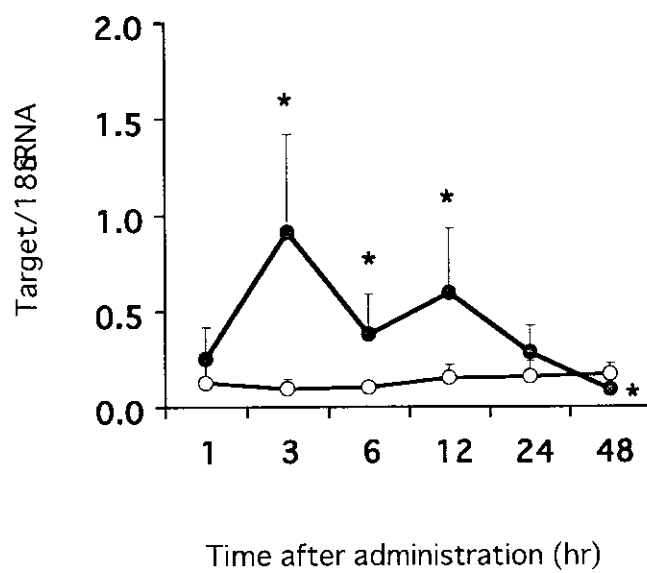
○ : Vehicle, ● : EE 3 μg/kg, Mean ± SD, *: p<0.05

C3 mRNA



○ : Vehicle ● : EE 3 μ g/kg Mean \pm SD, *: p<0.05

IGF-1 mRNA



○ : Vehicle ● : EE 3 μ g/kg Mean \pm SD, *: p<0.05