

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱化学物質の生体影響 に関する研究

— 特に低用量効果・複合効果・作用機構について —

(H13—生活—013)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

井 上 達

平成16（2004）年3月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究 ー特に低用量効果・複合効果・作用機構についてー	1
井上 達	

II. 分担研究報告書

I. プロジェクト課題研究

【総括】プロジェクト課題研究	25
関澤 純	
神経・免疫毒性を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量 影響の評価	29
関澤 純	
食品中のホルモン様物質と人工のホルモン様物質による生物影響の 差異に関する文献調査研究	38
松井三郎	
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	40
杉村芳樹	
低用量暴露による遺伝子発現、たんぱく発現データの解析による ホメオスタシスに関する研究	49
福島昭治	
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	53
加藤善久	

II. 基盤研究

【生殖・ステロイド代謝】

- 雌性生殖器官への作用メカニズムの解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 57
井口泰泉

【生殖・ステロイド代謝】

- 低用量の内分泌かく乱物質とヒト性ステロイド代謝との関連性に関する
研究：ヒト由来のエストロゲン受容体(ER)陽性細胞を用いたエストロゲン
作用の新たな展開について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64
笹野公伸

【免疫】

- 低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究・・・・・・ 70
廣川勝昱

【免疫】

- 内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究・・・・ 73
山崎聖美

【神経】

- 核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成に
おける内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 77
垣塚 彰

【神経】

- 神経系初期発生におけるエストロジェンレセプターの機能および内分泌
かく乱物質の低用量影響に関する解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 82
菅野 純

【核内レセプター】

- 核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御の影響に関する
研究・・ 88
加藤茂明

【核内レセプター】

- ステロイド受容体発現調節機構およびその内分泌かく乱物質低用量影響に
関する研究・・ 92
藤本成明

【マイクロアレイ基盤整備】

マイクロアレイ基盤整備 遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクス
の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 103
五十嵐勝秀

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 107

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究

-特に低用量効果・複合効果・作用機構について-（H13-生活-013）

主任研究者 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

研究要旨

世界保健機構によるグローバル・アセスメントの出版に基づいて、内分泌かく乱問題は、その実態が確認されるに至った。一方で、試験・研究の進展とともに多くの化学物質が、持続的な注意を必要としつつも、日常的使用を控えるべき対象とならないことが明らかになってきた。このような状況のもと、低用量問題を含む内分泌かく乱問題の科学的研究の必要性も、新たな段階を迎えつつある。

環境中の化学物質の内、内分泌作用を示すホルモン様化学物質（HAC）と、その延長線上で内分泌障害性を示す内分泌かく乱化学物質（EDC）の異同は、それらの核内レセプター作用を中心とした受容体原性効果に端を発する諸機構が明らかになるに従って、明らかになってきた。また、「いわゆる低用量」の問題点は、作用閾値の存在の如何、相乗・相加作用の如何、及び反応の線形・非線形等の解明・解決の課題へと収束し、その実験的解明が求められている。本研究ではこのために、1）現存する低用量作用関連の情報（米・欧での低用量問題討議で用いられた未発表データを含む）を調査収集し検討するとともに、2）これまで進めてきた高次生命系を中心とした生体影響研究の側からの能動的な基盤研究による低用量作用の実態の研究により、その可能性の如何とあり得る背景機構を検討した。低用量効果が試験管内分子反応としてその実態が種々追認されているのに対して、ほとんどの個体レベル反応でそうした結果が見られない事実に鑑みて、こうした乖離現象を引き起こす背景と実態的な障害の如何の追求についても実験的検討を行った。あわせて、当班班員を含むこの領域で相次いで発見されているシグナル伝達修飾因子について、それらが持つシグナルの大幅なバイアスもしくはリプレスに関する影響の研究に格段の重点をそそぎ、低用量問題の科学的認識に齟齬を生ずることなく、認識基盤を整備するよう研究を推進した。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名 (50 音順)

五十嵐 勝秀	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官
井口 泰泉	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所生命環境研究領域 教授
垣塚 彰	京都大学大学院生命科学研究科高次生体統御学分野 教授
加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所分子生物部門 教授
加藤 善久	静岡県立大学・薬学部 講師
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
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座 教授
杉村 芳樹	三重大学医学部泌尿器科学 教授
関澤 純	徳島大学総合科学部 教授
廣川 勝昱	東京医科歯科大学医学部感染免疫病理学講座 教授
福島 昭治	大阪市立大学大学院医学研究科 教授
藤本 成明	広島大学原爆放射能医学研究所放射線再生医学研究部門 助教授
松井 三郎	京都大学大学院地球環境学堂環境調和型産業論分野 教授
山崎 聖美	国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部 主任研究員

A. 研究目的

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質作用の可能性として指摘されてきた種々の事象の内、その主な問題点の中で解明の困難が集中しているいわゆる“高次生命系”での挙動に焦点をあてて、作用機構の解明にあたる。すなわち①内分泌系・②免疫系・③神経系などの高次生命系ネットワークの個々に対する影響について、在り得る作用機転の可能性を検討することによって問題の本質を明らかにし、施策の科学的基盤整備にあたる。

高次生命系は、上述3領域のそれぞれ複雑な受容体シグナルネットワークを構成し、相互に共通のモデルをもって機能と障害が理解され、共通の認識で情報を交換することによって得られる成果が期待されるところのものである。これらの臓器、組織では、時間軸や個々のネットワークの詳細面で異なった点があるが、共通に認識される普遍的な事柄も少なくなく、内分泌かく乱影響の発現の蓋然性

がたまたま危惧されていたところでもある。

高次生命系における特徴として知られる、発生・生殖面を始めとした時間軸やメモリー機構などへの影響に注意を払って検討をすすめる。

B. 方法

第1に [I. プロジェクト課題研究] として、低用量問題を構成する因子毎に国内外のデータおよび鍵となる試験研究項目を収集し検討した。またそれらの結果に直結する、必要な実験課題についても重点的に推進した。平行して第2にこれまで行ってきた高次生命系を中心に、実験的に低用量問題の背景を追求した [II. 基盤研究]。

I. プロジェクト課題研究は、関澤が責任者となり、引き続き文献調査と実験的課題を設定した検証を推進した。

(1) 文献情報調査(継続) : 人が曝露さ

れる低用量の内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響リスクの可能性について文献調査を行った。(関澤)

(2) 情報データベースの作成：神経免疫毒性を中心とした内分泌かく乱物質の低用量影響の評価(関澤)

(3) 文献調査研究：食品中や天然に存在する AhR に関する文献を収集し、情報をまとめて考察した。(松井)

(4) 低用量作用のメカニズムに直結する基礎的事項に関する実験的検討

重量・形態・組織学的変化の観察による低用量 estrogenic chemicals の前立腺重量、発育などに対する影響の研究(杉村)、低用量暴露による遺伝子発現、たんぱく発現データの解析によるホメオスタシスの検討(福島)、甲状腺ホルモンかく乱物質に対する感受性 T_4 の体内動態の動物種差の解明(加藤)を行った。

II. 基盤研究では、低用量問題の背景となりうる機構の解明に向けての研究を進めた。

【生殖・ステロイド代謝部門】

井口泰泉は、マウスの雌性生殖器官に対する低用量および高用量のエストロゲンの影響を、マイクロアレイを用いて遺伝子発現のプロファイルから明らかにすることを目的とした。発達中の雌性生殖器官に対するエストロゲン及びエストロゲン作用を有する化学物質(ノニルフェノール及びビスフェノール A)の影響を、組織学的変化と遺伝子発現の変化を対応させることにより、化学物質の作用メカニズムを明らかにすることが可能と考えた。

笹野公伸は、内分泌かく乱物質の人体への作用を *in vitro* の結果を外挿して検討する可能性を探究する目的で研究計画

をたてた。

【免疫部門】

廣川勝昱は、内分泌かく乱化学物質：Diethylstilbestrol (DES, Sigma:D4628), 17β -Estradiol (E2, Nakarai: 14541-61), Bisphenol A (BPA, Wako: 025-13541), p-n-Octylphenol (OP, Wako: 159-0261), Benzyl n-butyl phthalate, Wako: 023-06371)について、

1) 腺微小環境内における未熟胸腺リンパ球の増殖・分化への影響、および2) 細胞内情報伝達系への影響を検討した。

山崎聖美は、マクロファージ様培養細胞及び内分泌かく乱物質投与 BALB/c マウスから得た腹腔常在性マクロファージを用い、内分泌かく乱物質として、ノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A (BPA)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP) を選び、NO 産生、貪食作用に対する影響を調べた。

【神経部門】

垣塚 彰は、ラットにペルオキシソーム増殖誘導剤であるフェノバルビタールを腹腔内投与し、肝臓から脂溶性低分子を抽出精製することにより、フェノバルビタールにより誘導される脂溶性低分子を探索した。

菅野 純は、DES を妊娠マウスに投与し、胎児脳から神経幹細胞を培養して影響を検討した。その際、網羅的遺伝子発現解析も併用した。

【核内レセプター部門】

加藤茂明は、男性ホルモン、女性ホルモンレセプターの転写機能を担う転写共役

因子の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークを検討した。すなわち、性ホルモンレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学的に精製及びその構成因子群を同定する。また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討する。

藤本成明は、ラット前立腺において ER 等の遺伝子発現を定量解析した。マウス ER β 遺伝子上流域をクローニングしてレポーターを作成し機能解析した。すなわち、

マウス ER β 遺伝子上流域のクローニングは、既報の遺伝子 5' 端をプローブとしてマウス DNA ライブラリをスクリーニングすることにより行った。その全域および断片を pGL3-luc レポーターへ挿入したものを用い、前立腺培養細胞で発現を解析した。また、LacZ レポーターを作成し、これをマウス胚へ導入した。 *in vivo* での発現様式の解析のため、real-time RT-PCR 法により組織中の ERmRNA 等の定量をおこなった。動物は、F344 系雄ラットおよび BDF1 雄マウスを購入して用いた。

【マイクロアレイ基盤整備】

五十嵐勝秀は、各班員と協議の下、共同研究を行い、組織もしくは細胞の検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析データ解析結果を班員にフィードバックすることで研究をサポートした。

C. 結果

I. プロジェクト課題研究

(1) 文献調査の結果および考察

関澤 純：

内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響の報告は、個別物質につ

いては最近になり集積しつつあるが、低用量影響を評価する上で十分なデータはまだないといえる。影響リスクを検討するうえで基本となる試験系とリスクの評価法の確立が、求められる。

1. 文献検索結果

2. 影響リスク評価上の問題点の整理

3. 免疫系への影響の知見

免疫系と内分泌系、神経系の相互作用化学物質による免疫系への有害影響は医薬品による直接的な影響の場合を除きあまり多くの注意が払われてこなかった。内分泌系や神経系との相互作用についてよく知られているもののすべての作用が有害ではないのはいままでの副腎皮質から分泌される糖質コルチコステロイド、副腎髄質や交感神経末端から分泌されるカテコールアミン、脳下垂体から分泌されるプロラクチン、成長ホルモンや、エンドルフィンのような副腎髄質や自律神経末端から分泌される神経ペプチドなど、神経系は多様な様式で免疫系と作用しあっている。反対にサイトカインのような免疫系の産物は神経系への重要なシグナルを発している。このように免疫系と神経系は複雑な化学メッセンジャーのネットワークを形成し、生理的また病理的な結果につながる。行動学的条件付けによる免疫反応への影響など、ストレスによる免疫系への影響という例もある。

糖質コルチコイドが免疫抑制効果を持つことは良く知られているが、糖質コルチコイド投与による胸腺退縮（ストレスの兆候）によりリンパ球の分布が変化する。リンパ節のアドレナリン作動受容体 α と β は脾臓、胸腺、リンパ節などリンパ組織の交感神経支配により高濃度のカテコールアミンに曝される。カテコールアミンはナチュラルキラー細胞活性の重要な調節因子である。

4. 神経系・行動毒性に関する知見

5. 個別物質における知見の整理

参考文献

- Branchi I, Capone F, Alleva E, Costa L.G., Polybrominated Diphenyl Ethers: Neurobehavioral Effects Following Developmental Exposure., *NeuroToxicology*. 2003; 24, 449-462
- Chen C.W., Assessment of Endocrine Disruptors: Approaches, Issues, and Uncertainties., *Foria histochemicaet Cytobiologica*. 2001; 39, 20-23.
- Descotes J., Integrating immunotoxicity with effects on other biological systems in preclinical safety evaluation: a perspective. *Toxicology*, 2000; 142, 157-160.
- Drela N, and Zesko I., Gender-Related Early Immune Changes in Mice Exposed to Airborne Suspended Matter. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2003; 25, 101-121.
- Ferguson S.A, Scarret A.C, Flynn K.M, Meredith J. M, and Schwetz B.A., Developmental Neurotoxicity of Endocrine Disruptors: Focus on Estrogens. *NeuroToxicology*, 2000; 21(6), 947-956.
- Goldman L. R, and Koduru S., Chemicals in the Environment and Developmental Toxicity to Children: A Public Health and Policy Perspective. *Environmental Health Perspectives*, 2000; 108, 443-448.
- Takeyama M. and Tohyama C., Developmental Neurotoxicity of Dioxin and Its Related Compounds. *Industrial Health*, 2003; 41, 215-230.
- Kimmel C.A, Makris S.L., Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. *Toxicology Letters*, 2001; 120, 73-82.
- Kolker S., Ahlemeyer B., Huhne R. Mayatepek, E. Kriegelstein J., and Hoffmann G.F., Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal. *European Journal of Neuroscience*, 2001; 13, 2115-2122.
- Moser C., Increased susceptibility of adults following developmental exposure to neurotoxicants another susceptible population? *Abstracts/Neurotoxicology*, 2001; 22, 867-888.
- Winneke G, Walkowiak J, H. Lilienthal, PCB-induced neurodevelopmental toxicity in human infants and its potential mediation by endocrine dysfunction. *Toxicology*, 2002; 181-182, 161-165.
- 松井三郎：現在までに知られている天然の AhR リガンドには、人間の尿中に存在し、活性の強いインディルビンおよびインディゴ、豚の肺組織から単離された ITE、ブロッコリーや芽キャベツ中に含まれる ICZ および DIM、トリプトファンに紫外線を照射して生成する FICZ および dFICZ、などがあり、これらはすべてインドール環を持つ化合物である。一方 Jeuken らは 2003 年の *J. Agric. Food Chem* において様々な食品中（ジャガイモ、コーヒー、リンゴ、トウモロコシ、唐辛子、ピーマン、キャベツ、ブロッコリー）に強い AhR リガンドが存在することを報告している。これらの構造はまだ明らかになっていないが、上記のようなインドール化合物である可能性が高いと考えられる。このほか食品中では、ファイトエストロゲン類のダイゼイン、ジェニステイン、ワイ

ン中に含まれるレズベラトロールなども AhR を活性化する。また生体中ではリポキシシン A4、ビリルビン、7-ケトコレステロールなどが AhR リガンド活性を持つことが報告されている。

(2) 実験課題の検証

(A) 福島昭治： α -BHC の高用量投与では肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生を促進し、低用量投与では逆に抑制を示した。同様に高用量投与では、glutathione S-transferase (GST) 酵素の活性は上昇し、低用量投与では減少傾向をもたらした。また、酸化ストレスのマーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルは α -BHC (500 ppm) では増加し、 α -BHC (0.1, 1 ppm) では減少した。CYP450 蛋白量は低用量 (0.1, 1 ppm) で減少傾向を示し高用量 (500 ppm) で著明に増加した。また、 α -BHC に関係するとされる CYP2B1 蛋白量は高用量で増加傾向を示した。CYP3A2 蛋白量の変化も CYP2B1 と同様であった。CYP2B1 及び CYP2A2 の mRNA 発現は高用量で増加傾向を示した。アポトーシスに関連する遺伝子である Bad は低用量で増加し高用量で減少した。

(B) 杉村芳樹：前立腺重量および腺管先端数は $10\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 群において減少を認めたが、 $1\text{ng}\cdot 1\text{pg}$ 群では変化は無かった。また $10\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 群の特に DLP において結節状の異常腺管構造を認めた。前立腺重量は 60 日後でみると VP および DLP とともに Control 群と比較し $10\mu\text{g}\cdot 1\mu\text{g}$ 群で有意な減少 (VP は 10μ 群で 27%、 $1\mu\text{g}$ 群では 30%の重量減少、DLP は $10\mu\text{g}$ で 44%、 $1\mu\text{g}$ 群では 25%の重量減少) を認めたが $1\text{ng}\cdot 1\text{pg}$ 群では変化は認められなかった。この重量変化の傾向は 7、15 日目では有意差認められなかったが 30 日

後において、VP では $10\mu\text{g}$ 群の重量減少 (38%の減少)、DLP では $10\mu\text{g}\cdot 1\mu\text{g}$ 投与群 ($10\mu\text{g}$ 群で 46%、 $1\mu\text{g}$ 群で 29%の重量減少) で重量減少を認めた。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 VP および DLP とともに $10\mu\text{g}\cdot 1\mu\text{g}$ 群で腺管先端数は減少を認めたが (VP は $10\mu\text{g}$ で 58%、 $1\mu\text{g}$ 群で 49%、DLP は $10\mu\text{g}$ で 46%、 $1\mu\text{g}$ で 54%の減少)。 $1\text{ng}\cdot 1\text{pg}$ 群において腺管先端数は Control 群と比べ変化は認められなかった。この $10\mu\text{g}\cdot 1\mu\text{g}$ 群における腺管先端数の減少は 7、15、30、60 日目のいずれにおいても認められた。また DES を投与すると腺管分枝形態発生の抑制と一結節状の異常腺管構造が出現することが知られているが、この結節状の異常腺管構造は本実験で DLP においては $10\mu\text{g}\cdot 1\mu\text{g}$ 群に、VP においては $10\mu\text{g}$ 投与群にのみ認められたが $1\text{ng}\cdot 1\text{pg}$ 群においては認められなかった。ただし、VP の異常腺管構造はごく一部の腺管にのみ認めただけであった。DLP において異常腺管構造は 15 日目より出現し、経時的に増加し 60 日目において $10\mu\text{g}$ 群では全体の腺管の約 75%、 $1\mu\text{g}$ 群では約 35%に異常腺管構造を認めた。組織学的には DLP における結節状の異常腺管構造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。

(C) 加藤善久：KC500 投与により、血中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ のクリアランスおよび肝臓への移行量は、4 種の動物で著しく増加し、胆汁中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4\text{-Glu}$ の排泄量は、ラットでのみ増加した。また、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ と TTR の結合率は、ラットとモルモットで低下した。すなわち、KC500 投与により、血清中 total T_4 および free T_4 濃度は、いずれの動物でもほぼ用量依存的に低下した。また、KC500 (100 mg/kg) 投与後 4 日に $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ を投与し、血中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ のク

リアランスや胆汁中 T_4 -Glu の排泄量の影響を調べた結果、血中からの消失クリアランスは用いた全動物で、また、胆汁中 T_4 -Glu の排泄量は、ラットでのみ有意な増加が見られた。また、KC500 投与による $[^{125}I]T_4$ と TTR の結合への影響を調べた結果、ラットとモルモットでは用量依存的な低下が認められ、ハムスターでは、100 mg/kg 投与時のみ若干の低下が見られたが、マウスでは、本低下は全く認められなかった。また、この時、ラットでは $[^{125}I]T_4$ とアルブミンとの結合量の顕著な増加が、ハムスターやモルモットでは若干の増加が認められ、マウスでは全く増加は認められなかった。なお、ハムスターやモルモットでは、血中非結合同型 $[^{125}I]T_4$ の増加が認められた。さらに、各動物に KC500 を投与し、 $[^{125}I]T_4$ の組織移行量を詳しく調べた結果、 $[^{125}I]T_4$ の肝臓への移行量は、4 種の動物で顕著に増加し、それぞれ投与量のマウス：34%、ハムスター：55%、ラット：37%、モルモット：17%となった。

II. 基盤研究

【生殖・ステロイド代謝部門】

井口泰泉： 卵巣摘出マウスへ 5 μ g/kg エストラジオール投与後、1, 2, 6, 12, 24, 48 時間後に発現変動する遺伝子を調べ、最も変化の多い 6 時間後を選択した。エストロゲン投与後 1-6 時間で発現変動する遺伝子のパターンは 6 タイプに分けられた。初期に発現が増加する遺伝子としては、RNA 合成やタンパク合成に関わる遺伝子があり、発現低下する遺伝子には転写因子群、プロテアーゼ、アポトーシスあるいは細胞周期に関連した遺伝子群であった。これら、エストロゲンにより発現変動する遺伝子は、エストロゲン受容体 α (ER α)ノックアウトマウスでは発現変動が認められなかった。マ

ウス子宮で低用量と高用量のエストロゲン、ノニルフェノール、ビスフェノール A 投与 7 日後に起こる子宮肥大を、投与 6 時間後に発現変動する遺伝子群で予想ができること、およびそれらの遺伝子群を明らかにした。ラット胎児の輸卵管では、ER α 、プロゲステロン受容体(PR)とアンドロゲン受容体(AR)は発現していたが、ER β の発現はきわめて弱かった。輸卵管の ER α は胎生期から生後 3 日にかけて増加した。PR の発現は生後 10 日で最大となった。AR は生後 10 日にかけて弱いながら発現が増加した。出生直後のエストロゲン投与により、エストロゲン非依存的に細胞増殖する臍では、レクチンをはじめとして、いくつかの遺伝子が、エストロゲン非依存的に発現していることを見出した。

笹野公伸： マイクロアレイによる検討から、エストロゲン添加により細胞増殖抑制に関連して有意に増加している遺伝子 p120E4F が同定され、siRNA でその作用は阻害された。更にヒト大動脈で発現動態を検討したところエストロゲン作用との関連が示された。

①マイクロアレイによる抗動脈硬化に関するエストロゲン応答遺伝子の検出

ER α 細胞にエストロゲンを 8 時間投与する事により、細胞増殖抑制に関与する遺伝子の中では p120E4F がコントロールに比し有意に増加していた。この遺伝子は ER β 陽性細胞で発現は認められず、定量 PCR でも同様の結果が得られた。

②検出された遺伝子 p120E4F の細胞増殖抑制への関与

p120E4F の発現を siRNA で阻害すると、エストロゲンによる増殖抑制は阻害されたが、SERM(selective estrogen receptor modulators)では増殖抑制阻害は見られなかった。

③ 検出された遺伝子のヒト大動脈での発現

p120E4F の発現は軽度の動脈硬化を示す閉経前女性ヒト大動脈で強く認められ、動脈硬化症と逆比例する事が認められた。またその局在は ER α を有する新生内膜層内の平滑筋細胞であった。

【免疫部門】

廣川勝昱：

未熟胸腺細胞の胸腺内における増殖・分化への影響：フローサイトメトリー解析では胎生15日齢未熟胸腺細胞は CD4⁺CD8⁻ (DN) のサブセットのみで構成され、前方散乱光 (FSC) 強度の高いサイズの大きい細胞からなる。分化成熟が進むと FSC 強度が低下し、細胞のサイズが小さくなるとともに CD4⁺CD8⁻ (DN) から CD4⁺CD8⁺ (DP)、CD4⁺CD8⁺ (4SP)、CD4⁺CD8⁺ (8SP) のサブセットに分化する。この DN サブセットの中では更に CD44⁺CD25⁻ (DN1) \rightarrow CD44⁺CD25⁺ (DN2) \rightarrow CD44⁺CD25⁺ (DN3) \rightarrow CD44⁺CD25⁺ (DN4) と分化過程をたどる。このような生体内での動態が HOS-FTOC による *in vitro* でも観察することが出来る。

EDCs の存在下では、胸腺細胞の増殖が低下し、細胞数の減少が起こる。また DN1 \rightarrow DN2 への分化が抑制され、DN1 の割合が増加する。

EDCs に加えて、エストロゲン受容体拮抗剤 (ICI-182,780) を HOS-FTOC 培養液中に添加すると、上記の EDCs の抑制効果がなくなった。即ち、ICI-182,780 のみを添加した対照群と比べて差異は認められなかった。

T 細胞の細胞内情報伝達系への影響：T 細胞を EDCs 処理後に細胞刺激を与えた群とエストロゲン受容体拮抗剤 (ICI-182,780) と EDCs の処理群とを比較すると、T 細胞受容体下流のリン酸化のパタ

ーンは異なり PLC γ 、ZAP-70、Lck、MAPk-44、MAPk-42 などのタンパクのリン酸化の減少、時間の遅れが認められた。即ち、EDCs が T 細胞内の複数のシグナル伝達物質に影響を与えることが明らかになった。

山崎聖美：

C-1. 培養細胞を用いた研究

(1) NO 産生

① 内分泌かく乱物質単独の場合

内分泌かく乱物質単独で処理した場合のコントロールの NO₂⁻濃度は 1.26 \pm 0.88 μ M であった。

アルキルフェノール類の場合、NP は 10⁻³ ~ 10⁻⁴M と 10⁻¹⁰ ~ 10⁻¹¹M の濃度でコントロールに比べて有意に高い値を示した (p<0.01)。OP は 10⁻³M と 10⁻¹¹M の濃度でコントロールに比べて有意に高かった (p<0.05)。

フタル酸エステル類では、BBP と DEP は 10⁻³M と 10⁻¹¹M の濃度で、DEHP では 10⁻³M、DBP は 10⁻¹¹M の濃度でコントロールに比べて有意に NO 産生を上昇させた (p<0.05)。

BPA、2,4'-DDE、4,4'-DDE は、10⁻³M と 10⁻¹¹M の濃度で NO 産生が有意に上昇した (BPA は p<0.01、2,4'-DDE、4,4'-DDE は p<0.05)。

② 内分泌かく乱物質と LPS 同時処理の場合

LPS と内分泌かく乱物質を同時に処理した場合、コントロールの NO₂⁻濃度は、6.17 \pm 1.67 μ M であった。

アルキルフェノール類を LPS と同時に処理した場合、NP は、10⁻⁴ ~ 10⁻⁵M の濃度でコントロールに比べて有意に低い値を示した (p<0.01)。OP は 10⁻³ ~ 10⁻⁵M の濃度でコントロールに比べて有意に低い値を示した (p<0.01)。

フタル酸エステル類を LPS と同時に処

理した場合、BBP では 10^{-3} ~ 10^{-4} M と 10^{-6} ~ 10^{-8} M で有意に NO 産生が減少した ($p<0.01$)。DEHP では 10^{-1} ~ 10^{-5} M、DBP は 10^{-3} ~ 10^{-4} M で、DCHP は 10^{-3} ~ 10^{-4} M の濃度でコントロールに比べて有意に NO 産生を減少させた ($p<0.01$)。また、DEP は 10^{-5} M と 10^{-11} M の濃度で、また DBP は 10^{-11} M で有意に NO 産生を上昇させた ($p<0.01$)。

BPA は 10^{-3} ~ 10^{-4} M の濃度で NO 産生が有意に減少した ($p<0.01$)。2,4'-DDE、4,4'-DDE はともに 10^{-3} M、 10^{-8} M の濃度で有意に減少した ($p<0.01$)。4,4'-DDE では、 10^{-4} M、 10^{-10} ~ 10^{-11} M 以外の濃度で、すべてコントロールに比べて有意に NO 産生が減少した ($p<0.05$)。

(2) 食食作用

OP では 10^{-9} M 付近で食食能が高い傾向が見られた。NP、OP とともに 10^{-4} M の濃度で有意に食食作用が減少した。それよりもうすい濃度では、コントロールとの有意差はなかったが、 10^{-9} ~ 10^{-12} M で増加する傾向が見られた。

BBP はどの濃度でも食食作用を抑制する傾向が見られ、 10^{-5} M の濃度では有意に食食能が減少した ($p<0.05$)。DBP は有意差はなかったが、 10^{-4} M、 10^{-9} M の濃度付近で抑制する傾向が見られた。また DCHP は 10^{-4} M で食食能が減少した ($p<0.05$)。

BPA では 10^{-7} M 付近と 10^{-11} M 付近で食食能増加の傾向が見られた。

4,4'-DDE では 10^{-7} M で有意に食食能が減少した ($p<0.05$)。2,4'-DDE では変化が見られなかった。

C-2. マウスの腹腔常在性マクロファージを用いた研究

(1) NO 産生

LPS を加えずに 16 時間インキュベートした後の NO 産生量は、コントロールでは、 $0.77 \pm 0.15 \mu\text{M}$ であった。NP、DCHP、

BPA (DCHP、BPA : 0.5、5、50、500mg/kg 体重/day、NP : 0.5、5、50mg/kg 体重/day) 投与群のいずれもコントロールとの有意差は認められなかったが、NP 投与群から得られたマクロファージはどの濃度でも NO 産生を上昇させる傾向にあったが、BPA、DCHP 投与群から得られたマクロファージでは抑制する傾向が見られた。

LPS を加えて 16 時間インキュベートした場合の NO 産生量は、コントロールでは、 $1.43 \pm 0.32 \mu\text{M}$ であった。NP、DCHP、BPA 投与群のいずれもコントロールと比較して有意差はなかったが、DCHP 投与群については、NO 産生を抑制する傾向にあった。また、BPA 投与群は、0.5 及び 500 mg/kg 体重/day の場合には NO 産生が上昇し、5 mg/kg 体重/day では減少する傾向が見られた。

(2) 食食作用

食食能については、NP、BPA 投与群のいずれもコントロールに比べて有意な差は見られなかった。DCHP 投与群については、0.5 mg/kg 体重/day で、有意に食食作用を低下させた。

【神経部門】

垣塚 彰 :

1) mPXR 活性化物質の同定

フェノバルビタールを投与した肝臓から抽出した脂溶性低分子分画に含まれる mPXR の活性化能を持つ物質を HPLC を用いて分離・同定したところ、その物質は di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) であることが判明した。

すなわち、ラットにフェノバルビタールを 3 日間連続で腹腔内投与し、4 日目に肝臓を摘出した。Folch 法によって肝臓から脂溶性低分子を抽出した。この抽出液によって活性化される核内受容体を検討した。この分画は Retinoic acid receptor (RAR) 及び peroxisome

proliferators- activated receptor alpha (PPAR α), PPAR γ を活性化したが、それは肝臓に内在性に多く含まれるレチノイドや脂肪酸の影響と考えられた。他の受容体として、特に mPXR が良く応答しているのが観察された。フェノバルビタールは主に constitutive androstane receptor (CAR) を介して P450 (CYP2B) を誘導する。しかしながら、フェノバルビタールは CYP3A も誘導する。CYP3A は主に PXR を介して誘導されるが、フェノバルビタールが PXR のリガンドとして働くかどうかは明らかではない。フェノバルビタールによって直接 CAR、PXR が活性化される可能性も考えられるが、フェノバルビタールの代謝産物が 2, 3 次応答といった多段階の反応を引き起こし PXR を活性化している可能性も否定できない。我々は、フェノバルビタールによって 2, 3 次的に誘導されている物質が PXR を活性化している可能性を考え、肝臓抽出液から mPXR を活性化する物質の同定を試みた。

まず肝臓抽出液を順層系の CN カラムを用いて HPLC で分画し、それぞれの分画を培養細胞に添加し mPXR を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、分画 8, 9 に強い活性が観察された (図 1)。この分画をさらに精製するために逆層系の C18 カラムを用いて分画後、同様に培養細胞を用いてレポーターアッセイを行った。分画 12-15 に活性物質が含まれていると考えられたため (図 2)、これらの分画のうち分画 12 を用いてさらに C18 カラムで分画後、培養細胞を用いてレポーターアッセイを行った結果、分画 13, 14 に mPXR の転写活性化能が観察されたので、この分画に関して NMR 解析を行った。その結果、この分画に含まれる物質は、di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) であることが判明した。

この物質はフタル酸エステル類の 1 つであり、内分泌攪乱物質の一つとして考えられている。

そこで、DEHP の応答性に種間で差が見られるかどうかをマウスとヒトの PXR を用いて検討した。また、DEHP は代謝されて mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) が生じるため同時に MEHP についても検討した。

その結果、DEHP はヒトよりもマウス PXR に対して活性化能が高く、その代謝産物である MEHP はヒト、マウス PXR を共に活性化しないことが判明した。しかしながら、MEHP は PPAR α , PPAR γ に作用し、特に PPAR α に対して強い活性を示すことが明らかとなった。

2) Nurrl 活性化物質の同定

上記と同様な方法を用いて、血清から Nurrl の転写を活性化すると思われる物質をほぼ HPLC の単一ピークまで精製した。

菅野 純：DES 胎児期投与により神経幹細胞の自己複製能のみならず、分化能も影響を受ける可能性を示唆する結果が得られた。DNA マイクロアレイ解析により選択した数十種類の遺伝子の発現変化を定量的 RT-PCR により検証することに成功した。

すなわち、

神経幹細胞におけるエストロゲンレセプターの発現

昨年度までに、マウス胎児脳から取り出し培養した神経幹細胞において、ER が発現していることを、タンパク質レベルで検討し、発現を確認した。今年度は、mRNA レベルでの発現について確定的なデータを得るために、ER alpha, beta を確実に検出し分けることができる primer を設計し検討した。Primer を設定する領域としては、mRNA の 5'側が比

較的相同性が低いことを利用し、5'側を選択した。設計した primer の特異性は、PCR により増幅された断片の DNA 配列を確認することで行い、確かに alpha, beta 特異的な primer が設計できたことを確認した。培養したニューロスフェアから全 RNA を回収し、RT-PCR を実施した結果、alpha, beta とともに逆転写反応を行った場合にのみ特異的な PCR 増幅を得た。すなわち、今回得られた PCR 増幅が RNA サンプル中に混入したゲノム DNA に由来するものではなく、RNA に由来するものであることが示された。以上をもって、ER は alpha, beta とともに神経幹細胞に発現していると結論した。

DES *in utero* 暴露影響検討-分化能への影響-

昨年度までの検討により、*in utero*でのDES暴露が、胎児終脳中の神経幹細胞のその後の増殖（自己複製能）に影響を与えていることを示唆する結果を得た。そこで、今年度は、*in utero*でのDES暴露が神経幹細胞の分化能に影響を及ぼす可能性を検討した。妊娠11.5日目から14.5日目まで母体にDES 0.02, 0.2, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与し、胎生15日目に胎児終脳を分離し、bFGF, EGF存在下浮遊培養して得たニューロスフェアを1%FBSおよび接着培養条件に置き分化を促進する条件において検討した。1週間の分化培養の後、20ヶのニューロスフェア由来のコロニーを選び、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてそれぞれMAP2, GFAP, O4を選び、3重免疫染色を行い、個々のニューロスフェアの分化能を測定した。その結果、VehicleおよびDES0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与由来のニューロスフェアは90%が3系統の神経系細胞に分化し、多分化能を維持していたが、DES0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与では分化能に影響が生じ、ニューロン

への分化能を失い、グリア系細胞にのみ分化可能な細胞の割合が増えていた。

網羅的遺伝子発現解析の検証

昨年までに行った、Genechipを用いた網羅的遺伝子発現解析結果を検証するために、発現変動を示した複数の遺伝子について定量的RT-PCRを行い検討した。検討の対象とした遺伝子は、GAPDH, b-actin, Dlx-2(distal-less gene 2), PDGFR, EST (GluR-B like), Hox-1.2, Ob-r, Igfbp10, cycB1, Egfr, I110038L14Rik, Gklf, c/ebp delta, junB, N10, Gdnfif, mGIF, vascular endothelial growth factor, hsp68, Id1, NL, IGFBP-2, pip92, Krox-24, c-fos の25種である。このうち、GAPDH, b-actinは網羅的遺伝子発現解析の結果、DESによる変動を示さなかったコントロール遺伝子として選んだ。実際の測定においては、用いるRNAの量を厳密に揃えるために、広い定量域を持つRNA定量試薬であるRibogreenを用いて正確にRNA量を測定した。RNA量に応じ、Bacillus PHE mRNAをspike RNAとして添加し、PHEの量を他の遺伝子と同時に定量して標準遺伝子として用い、データの補正を行った。その結果、適切なprimer設計が困難であるか、発現量が低すぎて定量的な測定ができなかったHox1.2, Ob-r以外については、GeneChip解析から得られたのと同様の発現変化を示すことが明かとなった。

【核内レセプター部門】

加藤茂明：男性ホルモン及び女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子のいくつかを同定した。また、ダイオキシンレセプターと女性ホルモンレセプターが核内で会合することを見出した。すなわち、

1) ホルモン活性を規定するレセプター転写共役因子の検索及び同定

男性ホルモンに結合する新しい転写共役因子として p54, PSF, PSP1 等を生化学的に同定した。これら因子は、直接男性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進領域に会合することで、転写促進能を亢進することが分かった。また p54、は女性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進領域に会合すると、逆に転写機能を抑制することが分かった。このように p54 は、性ホルモンレセプター群のグローバルな調節因子である可能性が示唆された。

2) ダイオキシシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニズム

ダイオキシシンレセプターとエストロゲンレセプターとの関連を検討することで、活性化されたダイオキシシンレセプターが核内に移行し、結果として、女性ホルモンレセプターと会合することを見出した。興味深いことに、エストロゲンが結合していないエストロゲンレセプターは、ダイオキシシンレセプター結合により、その転写促進機能が惹起された。一方、エストロゲンが結合した状態では、ダイオキシシンレセプターはその機能を抑制することが明らかとなった。

3) 新たな染色体構造調節因子複合体の同定

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の 3 つの転写共役因子複合体に加え、第 4 の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンア

セチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。更に、この複合体群の中にはヒストンメチル化酵素活性を持つものも見出された。そこで、この酵素活性を指標にこの複合体の精製を行っている。同様の方法を用い、ヒトビタミン D レセプター (VDR) に相互作用する核内複合体を単離同定したところ、13 の因子から構成される新規染色体構造調節因子複合体の同定に成功した。この複合体は VDR のみならず、他の核内レセプターにも作用するようであり、現在、その詳細を検討しているところである。

4) ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行なってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR を組織特異的に発現する系の構築に成功したが、今年度は ER 発現ハエラインも樹立した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ER のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサに性ホルモンを加えると、GFP による蛍光が観察された。また、このレセプターを介した転写促進能は、AR を強制発現させたいずれの組織においても観察されている。次に、各種染色体特定領域を欠損したショウジョウバエ変異体群を、これらトランスジェニックハエと交配させることで、分子遺伝学的に ER 若しくは AR に必須な因子を検索している。

藤本成明: 前立腺では、部位によらず ER α と ER β がアンドロゲンにより発現調節されていた。マウスの ER β 遺伝子上流域をクローニングし解析した結果、基

本転写活性およびアンドロゲン応答性活性があることが示された。すなわち、

C-1. ラット前立腺の各部位での ER 発現

正常ラットの前立腺各葉での ER α 、ER β 、AR、またアンドロゲン依存性の遺伝子である probasin、Kallikrein S3 の発現を Table 1 にまとめた。いずれの葉でも、ER β の mRNA 発現が高いが、ER α との比率では腹葉 (VP) がもっとも高かった。10 週齢と 52 週齢とを比較してみると、52 週齢では、ER β 発現の α に対する比率が低下しており、側葉 (LP) においては、ER α の mRNA レベルが β と同程度にまで増加していた。

C-2. ラット前立腺の ER 発現の調節

去勢により前立腺の腹葉、背葉のいずれでも ER α の上昇、ER β の低下がみられた (Table 2)。また、probasin、Kallikrein S3 発現は明確に部位特異的であった。精囊においては、去勢により ER α の発現が大きく上昇していた。アンドロゲン存在下においてエストロゲンが作用すると前立腺肥大が促進されるが、この時 ER α の上昇が観察された (Table 3)。さらに、アンドロゲン依存性の遺伝子である probasin、KallikreinS3 の発現が相乗的に上昇していた。

C-4. マウス ER β 遺伝子上流域の構造

λ フェージライブラリより exon 1 とその上流を含む 2 つのクローンを得、転写開始点上流-2135bp までの領域をサブクローニングして構造決定した (Fig. 1)。配列解析の結果、この領域は転写因子結合モチーフを多く含み、特に完全な SRY、CdxA、AML-1a 結合部位が複数個存在していた。

C-5. *In vitro* プロモーター活性

クローニングした ER β 遺伝子上流域の全長および一部配列をルシフェラーゼ (luc) レポータープラスミドに挿入し細

胞導入実験をおこなったところ、それらが遺伝子転写活性を持つことが示された。さらに、アンドロゲン受容体発現遺伝子を同時に導入した系では、テストステロンによる ER β の発現誘導が観察された。

【マイクロアレイ基盤整備】

五十嵐勝秀：笹野班員、井口班員、加藤班員の 3 人と共同研究を実施した。特に加藤班員との共同研究により、ARKO により予想以上に広範な遺伝子発現変化が生じることが分かった。

各班員の研究サポート

今年度は、(1) 笹野公伸班員とヒト血管平滑筋細胞に対するテストステロン、アロマターゼ阻害作用、(2) 井口泰泉班員とマウス新生児視床下部に対する DES 影響、(3) 加藤茂明班員と Androgen receptor knock-out (ARKO) mice ovary における遺伝子発現変化、について、Genechip システムを用いて網羅的遺伝子発現解析サポートを実施した。

(1) 笹野公伸班員とヒト血管平滑筋細胞に対するテストステロン、アロマターゼ阻害作用

笹野班員による、動脈におけるステロイドホルモン局所作用検討をサポートするために、ヒト血管平滑筋細胞におけるテストステロン、アロマターゼ阻害応答遺伝子の網羅的遺伝子発現解析を行っている。

笹野班員により選択されたヒト血管平滑筋細胞株に対し、テストステロン、アロマターゼ阻害剤刺激後一定時間経過後に細胞から RNA を抽出し、Genechip HGU133A を用い、今年度中に解析する予定である。用いる細胞は ATCC より入手した human umbilical vein 由来の血管平滑筋細胞、human thoracic aorta 由来の血管平滑筋細胞 (CRL) である。化合物濃度はテストステロン 10nM、ア

ロマターゼ阻害剤 100nM、処理時間は2時間および8時間である。

(2) 井口泰泉班員：マウス新生児視床下部に対する DES 影響

本研究の目的は、DES による連続発情の作用機序の解明を網羅的遺伝子発現解析によって行うことである。昨年度、DES 暴露直後に誘導される遺伝子発現変化に注目し、DES 処理後6時間での発現変化の解析を実施したが、顕著な発現変動を検出することは出来なかった。そこで今年度は処理後時間を延長し、12時間、24時間での変化を解析することとした。マウス出生後0日の新生児に対し、DESを0.1 μ g投与し、雌雄毎に視床下部を分離し、RNAを抽出し、Genechip MOE430Aによって解析した。その結果、雌雄共にTransthyretinの発現量が著明に上昇していることを見出した。

(3) 加藤茂明班員：Androgen receptor knock-out (ARKO) mice ovaryにおける遺伝子発現変化

加藤班員によって作製された Androgen receptor knock-out (ARKO) mice の ovary における遺伝子発現変化を GeneChip で網羅的に解析することにより、Androgen receptor knock-out (ARKO) により生じる ovary の表現形を説明しうる遺伝子発現変化を捉えるために、出生後3週、8週の卵巣を野性型および ARKO マウスから得、GeneChip 解析した。その結果、ARKO により、予想以上に広範な遺伝子発現変化が生じていることが判明した。

D. 考 察

I. プロジェクト課題研究

(1) 文献調査

(A) 神経・免疫毒性を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量影響の評価 (関澤 純)

内分泌かく乱化学物質による影響につ

いて当初は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、また甲状腺ホルモン受容体を介した内分泌系への直接的な影響に関心が寄せられていた。しかし免疫系、神経系は内分泌系と緊密な関係を持ち、生体の生理作用の制御やホメオスタシスに関与しており、化学物質による作用は単一の標的における一つの影響に留まらない。

(B) 食品中のホルモン様物質と人工のホルモン様物質による生物影響の差異に関する文献調査研究 (松井三郎)

AhR リガンドの性質を調べると、多くのリガンドがリン酸化に影響を与える活性も併せ持っていることが目に付く。例えば薬剤では、SU5416 (血管新生阻害剤、Receptor tyrosine kinase inhibitor) および SP600125 (Jun N-terminal kinase inhibitor) など、インドール構造を有する物質に AhR リガンド活性があることが報告されている。今回リストアップされた天然の AhR リガンドのうち、インディルビンとジェニステインにキナーゼ阻害活性が報告されている。また、TCDD、B(a)P もキナーゼの阻害活性を持つ。レズベラトロールはキナーゼを活性化する。これらを考え合わせると、AhR は細胞内のリン酸化カスケードを攪乱するような物質群を代謝するために発達したのかもしれない。今後注意深くこの仮説を検証したい。

(2) 実験課題の検証

(A) 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 (福島昭治)

GST-P 陽性細胞巢の結果から、 α -BHCの発がん作用にはホルミシス現象があることが判明した。8-OHdGの形成レベル、CYP450 蛋白量、cDNA microarray による

mRNA の発現量もこれを支持する結果となっている。

(B) 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)

発生初期の前立腺に対するエストロゲン暴露は生長後の前立腺の増殖および分化を抑制し催奇形性をもたらすことが知られているが (Rajfer et al. Urol. 1978)、この作用は高用量なエストロゲン暴露であると考えられている。一方 vom saal ら (Proc Natl Acad Sci. 1997) らが胎児期に 0.2ng/g/body の DES を投与して前立腺重量の増加を認めたと報告し、いわゆる低用量効果として認識されている。今回我々の実験においては、高用量と考えられる DES 投与量として 10 μ g の投与を、低用量の DES 投与量として 1pg 群の投与を行ったが、10 μ g \cdot 1 μ 投与群はその重量の減少を認めたが、1ng \cdot 1pg 群において重量の変化は認められず、いわゆる低用量効果は認められなかった。今後 1pg 群よりさらに低用量の DES 投与の結果が必要であると思われる。催奇形性に関しては我々の実験では、10 μ g \cdot 1 μ 投与群の DLP において異常腺管構造の発生が強く認められ、また 10 μ g 投与群の VP においても若干の異常腺管構造が認められたが、1ng \cdot 1pg 群においてはこの異常腺管構造は認められなかったことから DES の前立腺にたいする催奇形性は 1 μ g/g/body 以上の投与で起こると考えられる。前立腺の発生・増殖・分化は主に間質細胞に存在する ER- α と増殖因子、上皮に存在する ER- β が重要な役割を果たす。Prins ら (Cancer Research. 2001) らも ER- α および ER- β ノックアウトマウスを用いて DES 2 μ g の 5 日間の投与により同様の異常形態の発生を観察し、前立腺にたいするこれらの作用は ER- α を介

して異常形態発生を促すと報告している。しかしながらより詳細なシグナル伝達経路や分子機能は未解決であり、今後この研究システムにおいては ER- α および ER- β を介した前立腺に対するこれらの分子機能のさらなる検討が必要である。

(C) 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 (加藤善久)

一般に、PCB による血清中 T₄ 濃度の低下の要因として、甲状腺濾胞上皮細胞における T₄ の合成系の抑制、T₄ のグルクロン酸抱合をはじめとする T₄ の代謝系の促進が考えられる。また、PCB の水酸化体は血中 T₄ の輸送タンパクである TTR と競合的に結合し、T₄ と TTR の結合を阻害する。このことが、血中 T₄ 濃度を低下させる一因になるとも報告されている。

すでに、加藤善久らは、マウス、ハムスター、ラットおよびモルモットに 2,2',4',5,5'-pentachloro- biphenyl (PentaCB)、2,2',3',4',5,6-hexachloro- biphenyl (HexaCB) および KC500 を投与する時、血清中 T₄ 濃度の低下には、甲状腺への直接作用の可能性は低いこと、血清中 T₄ 濃度の低下作用を有するメチルスルホン (MeSO₂) 代謝物の関与および肝臓の T₄-UDP-グルクロン酸抱合酵素 (T₄-UDP-GT) の関与はほとんどないことを示唆した。そこで、4 種の動物の KC500 投与による血清中 T₄ 濃度の低下に TTR が関与しているか否かを検討した。ラットおよびモルモットでは、KC500 により T₄ と TTR の結合阻害が起こっていることが示され、その結果、血清中 T₄ 濃度が低下した可能性が考えられる。ハムスターでは、血清中 T₄ と TTR との結合阻害がわずかに起こり、このことが、血清中 T₄ 濃度の低下の一部となっている可能性が考えられる。一方、マウスでは、TTR の関与は考