

▲▲ subcutaneous treatment, PND, post natal day

EE, ethynyl estradiol, DES, diethylstilbestrol

Fig. 1 Preliminary protocol for detection of delayed effects of neonatal exposure to endocrine disrupting chemicals on the female reproductive system

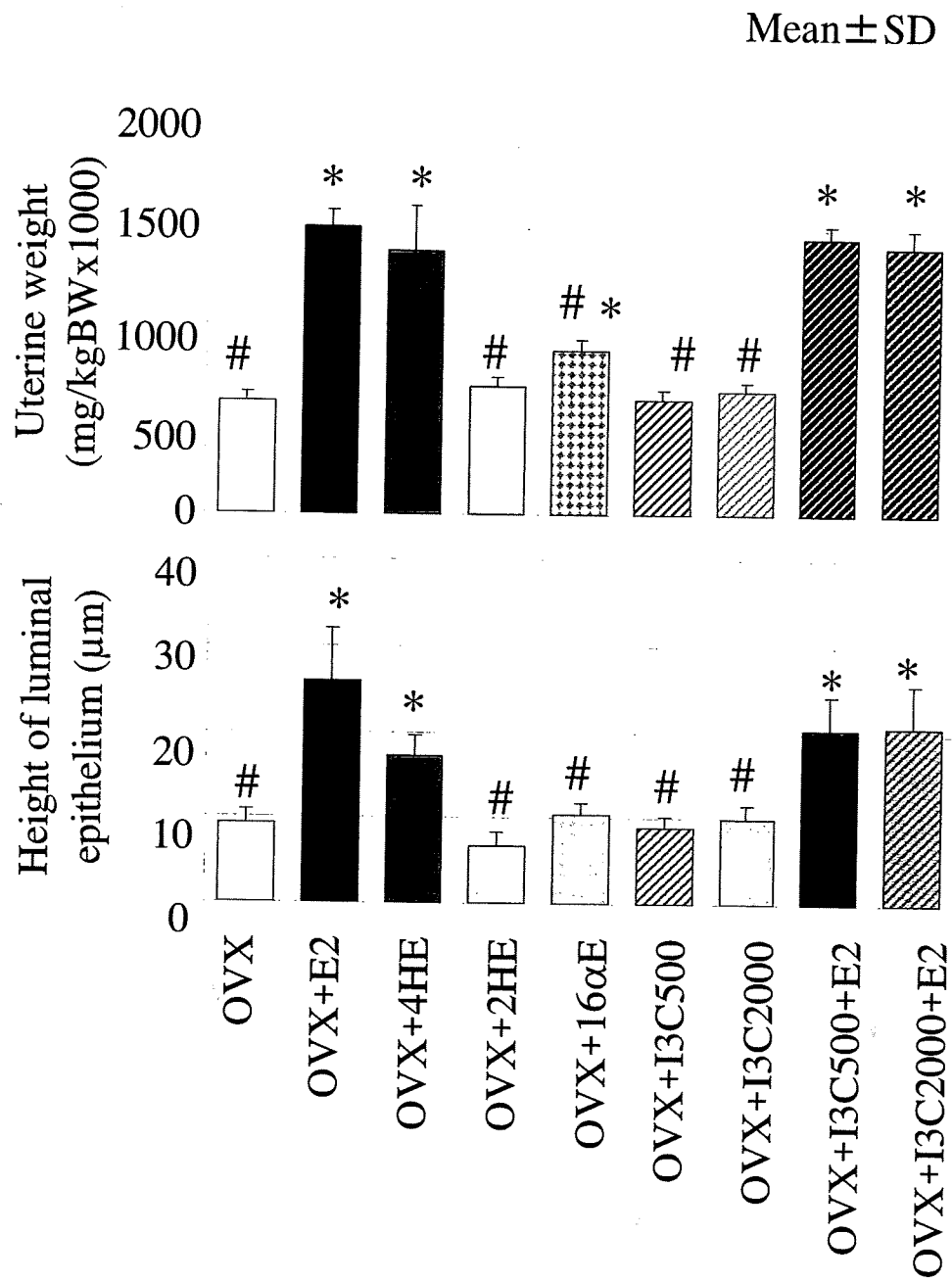


Fig. 2 Changes of uterine weights and heights of luminal epithelium of the uterus in ovariectomized rats

Table 1
Incidence of uterine proliferative lesions# and their multiplicities

No. of rats with abnormalities	Hyperplasia				Adeno-carcinoma	Multiplicities##	no
	Slight	Moderate	Severe				
Experiment 2							
15 months of age							
Control (n=24)	4	2	5	7	6	1.04 ± 0.62	
I3C500 (n=30)	1	2	3	7	17*	1.50 ± 0.63*	
Experiment 3							
15 months of age							
Control (n=18)	2	2	7	3	4	1.17 ± 0.62	
I3C2000 (n=18)	1	2	5	2	9	1.78 ± 0.73**	
E2 (n=16)	0	3	2	3	8	1.50 ± 0.52	
4HE (n=16)	0	0	5	1	10*	1.69 ± 0.60**	

#Uterine proliferating lesions include slight to severe atypical hyperplasia and adenocarcinomas, these criteria referred to Nagaoka et al. (37, 38).

##Multiplicities are calculated average number of uterine proliferative lesion per rats, and indicated mean ± SD.

Values in parenthesis show the number of rats examined.

*,**, Significantly different from relevant control group at p<0.05 and p<0.01, respectively

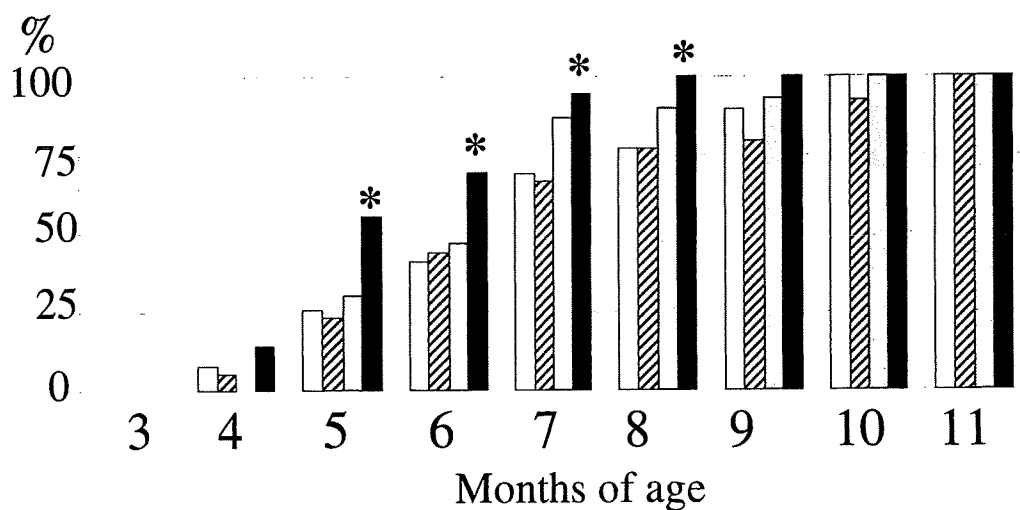
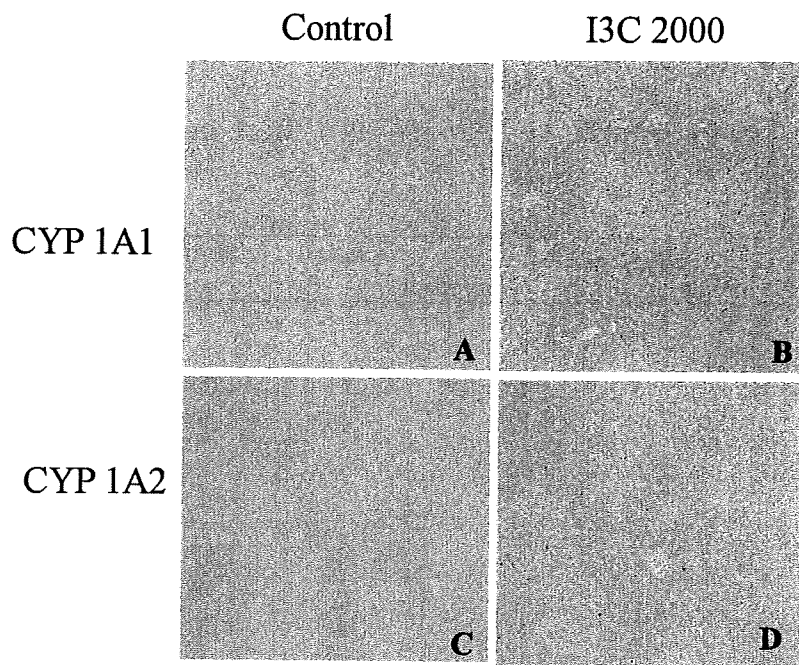


Figure 3 Incidence of persistent estrus at vaginal cytology



a. Immunohistochemical staining

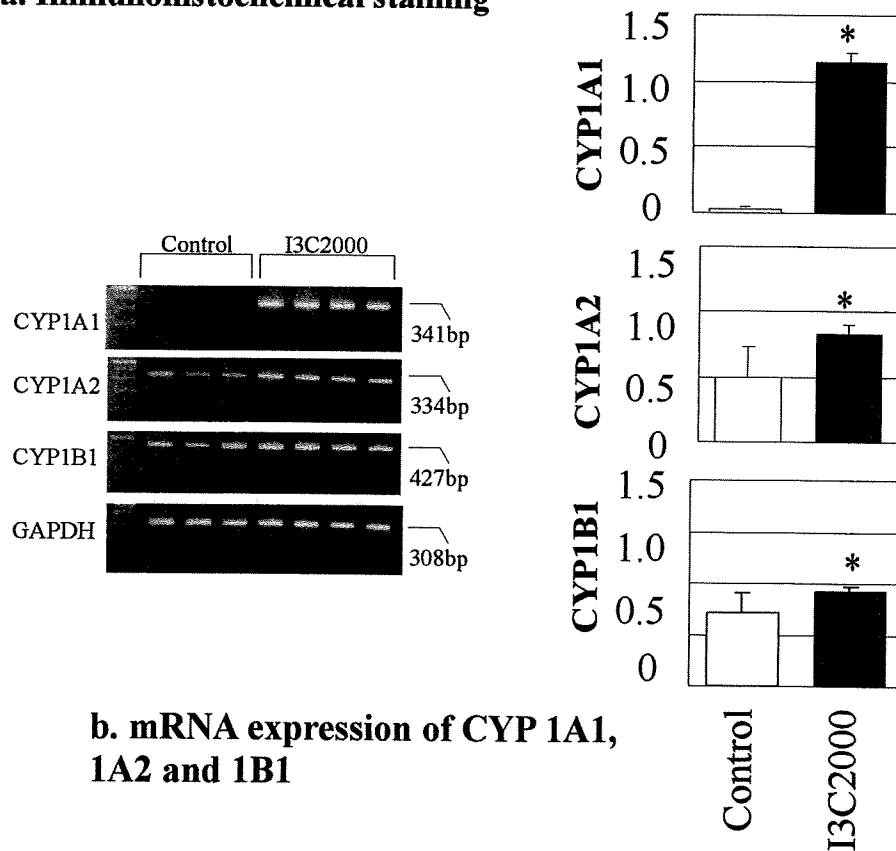


Figure 4 Expression of cytochrome P450 enzymes in the liver

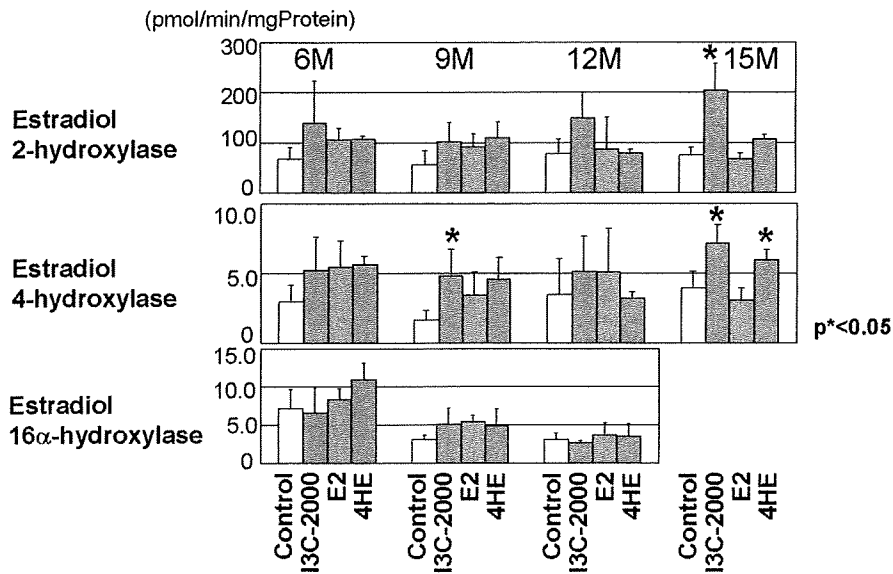


Figure 5. Enzyme activities of estradiol 2- or 4-hydroxylase

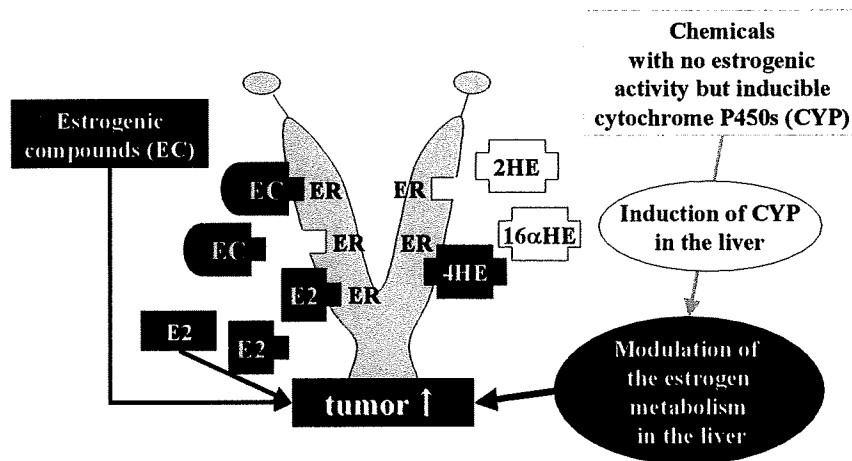


Figure 6 Hypothesized mechanism of promoting effects of chemicals with or without estrogenic activities on uterine carcinogenesis in rats

9. 内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響

分担研究者 太田 亮 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨：内分泌かく乱化学物質確定試験としてのげっ歯類を用いる一生涯試験の確立を目的として、ラットあるいはマウスを用いる一生涯試験のガイドライン案を作成し、ガイドライン案の検証を目的として、現在、陽性対照物質のDESを用いて、一生涯試験を実施中である。

A. 研究目的

近年、内分泌かく乱化学物質の影響が、生殖系のみならず、神経系や免疫系にも及ぶことが示唆され、ほ乳類を用いる内分泌かく乱化学物質の確定試験として、一世代あるいは多世代繁殖試験に代わる試験系の確立が急務となっている。そこで、内分泌かく乱化学物質確定試験としてのげっ歯類を用いる一生涯試験の確立を目的として、本研究ではガイドライン案を作成し、そこで問題となった点を考慮した一生涯試験を実践し、問題解決の情報を提供する。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質の影響が、生殖系のみならず、神経系や免疫系にも及ぶことを考慮し、さらに生殖器系の老化に至る過程に対する影響についても対応可能な試験として、一生涯試験のガイドライン案を作成した(別添1)。このガイドライン案で最も重要な問題点は、被験物質の投与(暴露)期間である。ヒト暴露のモデルとして一生涯試験を考えた場合、妊娠期、授乳期さらには離乳後の断続的な暴露が適切と思われるが、一方では、継続的な被験物質暴露が、かえって異常(影響)検出の妨げになると言う懸念もある。また、一生涯試験の位置づけを、あくまでスクリーニングの最高位と考えた場合、むしろ感受性の高い時期のみに投与(暴

露)して、白黒はつきりさせる方が良いと言う考え方もある。そこで、本研究では、投与(暴露)期間を哺育1日から哺育5日までに限定し、新生児に直接投与する方法を選択し、別途に実施される予定の妊娠期および授乳期の母動物に断続的に暴露する試験との比較を通じて、被験物質の投与(暴露)期間に関する問題を解決することを主目的にして、プロトコールを作成した。以下に、プロトコールの概略を示す。

1. 使用動物：Crj:CD-1GS ラット及びC57BL/6J マウス
2. 群数：4 群(生児出産雌として各群 10 腹以上)
3. 飼料：固型 CE-2 (日本クレア)
4. 飲料水：水道水(秦野市水道局給水)
5. 投与物質：ジエチルスチルベストロール(シグマ)
6. 媒体：コーン油(和光)
7. 投与経路：強制経口
8. 投与量：0(コーン油)、0.05、0.5、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$
9. 投与量設定理由：子宮肥大試験において、子宮重量の増加を来たす 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を最高用量に設定し、子宮重量の増加が起こらない 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を中用量、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を低用量に設定。
10. 投与期間：生後1日～生後5日
11. 観察項目
 - a. 生存率

- b. 体重推移
- c. 性成熟（膣開口、陰茎包皮分離）
- d. 性周期（8 週齢から 2 週間毎に剖検まで）
- e. 交配（12、23、34、45、56 週齢～）
- f. 交尾率、受胎率
- g. 産児数
- h. 行動試験（24 および 48 週齢）
- i. 剖検（26、52 および 104 週齢）
- j. 器官重量
- k. 精子検査（26、52 週齢）
- l. 免疫学的検査（26 週齢）
- m. 排卵検査（52 週齢）

C. 研究結果

現在、陽性対照物質（DES）を用いたラットの
の一生試験を実施中である。

G. 研究発表

無し

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

一生涯試験（ガイドライン案）

本試験は、被験物質が胎生期、授乳期さらには離乳後の性成熟に至る期間に暴露された動物について、長期間（一生涯）にわたり観察し、被験物質によって発現する遅発性変化を検出するために行われるものであり、長期間（1年間）反復投与毒性試験や発がん性試験とは投与時期において明確に区別される。

1. 動物種および性

げっ歯類 1 種（ラットまたはマウス）について実施する。未経産の雌を同系統の雄と交配させて、交尾が確認された雌を試験に用いる。系統の選択に当たっては、産児数の少ない系統は避け、一般的に実験動物として広く使用されているものとする。

2. 動物数

試験に用いる動物数は、生児出産雌が 1 群あたり 10 匹以上得られるだけの妊娠雌を用意する。各群への割り付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。

3. 投与経路

被験物質の投与経路は経口投与とし、通常、混餌投与または飲水投与により行う。ただし、被験物質が飼料（飲水）中で不安定である場合、飼料（飲水）中から被験物質が検出される場合、または飼料（飲水）が忌避される場合などの場合には、強制経口投与を行うことも可能であるが、投与媒体量はできるだけ少量にする。

4. 投与期間

交尾確認日（妊娠 0 日）から投与を開始し、妊娠期間、哺育期間を通じて母動物に投与し、必要に応じて出生児が離乳した後も出生児に投与を継続し、出生児が性成熟するまで連日投与する。→妊娠動物の分娩後の哺育 1 日から哺育 5 日まで、新生児に直接投与する。

5. 用量段階および対照群

(1) 用量段階

各用量段階は、以下により、被験物質の遅発性毒性の有無を明らかにできるように設定する。なお、用量設定にあたっては、そのための繁殖毒性試験の結果等を参考とすること。

- ① 最高用量：少なくとも、新生児が生存し得る用量とする。なお、本試験は低用量での毒性影響の有無を検討することを目的としているので、1 mg/kg/day より高い投与量では実施する必要はない。
- ② 最低用量：環境中の濃度や、ヒトの摂取量を考慮して用量を設定する。一日許容摂

取量 (ADI) が求まっている物質は、それを最低用量とするのが望ましい。

- ③ 中間用量：中間用量は、最高用量と最低用量との等比中項をとるのが望ましいが、群間の公比が 20 を超える場合は、設定する群数を増やす必要がある。

(2) 対照群

対照群としては、被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件の群を設ける。被験物質の投与に媒体を使用する場合には、媒体のみを投与する群を設ける以外に、無処置群を設ける必要がある。

6. 観察および検査

- (1) 一般毒性：一般状態、体重、摂餌（摂水）量などを検査する。検査の項目、頻度等は、発がん性試験に準拠する。
- (2) 免疫系：血液学的検査において、免疫学的指標を調べるとともに、免疫機能検査を積極的に実施する。
- (3) 神経系：遅発性の中樞神経障害をみることを目的とすることから、6 ヶ月齢以降に検査を実施する点で、神経発生毒性試験とは区別される。
- (4) 生殖系：性成熟の時期を検査すること加えて、発情周期などを指標にした加齢に伴う生殖機能の低下の時期を精査する。
- (5) 発がん性：特に生殖系や内分泌系の器官を中心に病理組織検査を実施する。

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

10. 確定試験に関わる発がん性検討：乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討

分担研究者 長村 義之 東海大学 医学部 基盤診療学系 病理診断学 教授

研究要旨： 我々は、内分泌かく乱化学物質の乳腺に対する影響を確認するため、ラットを用いた検索を実施している。内分泌かく乱物質は周産期ないし幼若期に曝露されることにより作用が顕在化することが知られている。そこで今回は母動物を介し周産期にビスフェノールAや diethylstilbestrol を曝露されたラットの DMBA 乳腺発がん系に対する反応を精査した。これらの解析を通し内分泌かく乱物質が本来有する乳腺への作用を明らかにしていく。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の乳腺発がんに及ぼす影響を検討するため、ビスフェノールAや diethylstilbestrol の母動物を介しての周産期曝露が乳腺上皮細胞の分化および腫瘍化にもたらす影響について検討を進める。

B. 研究方法

Bisphenol A(Bis-A)及び diethylstilbestrol (DES)の周産期曝露が乳腺の発達や細胞増殖の調節機構に及ぼす影響についての検索に着手した。

試験系を図1に示す。Bis-A の25および250 μ g/kg(Bis-A 低および高用量群/5,6群), DES の10および100 μ g/kg(DES 低および高用量群/3,4群)を器官形成期(妊娠12日目)から離乳時(生後3週齢時)まで曝露された仔ラットに対し、7週齢時に7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)処置を施し、その後4週ないし13週間後に乳腺を採材した。対照群として、周産期に溶媒投与の無処置仔ラット(1群)および周産期に溶媒投与で7週齢時にDMBA処置を施した仔ラット(DMBA 単独群/2群)を設定した。現在、本試験はDMBA投与4週間後の採材までが終了している。

採材した乳腺は、定法に従い組織標本を作製し、病理組織学的にTerminal end bud (TEB)を主体とした乳腺上皮細胞の解析を実施した。さらにTEBを中心に乳腺上皮細胞の細胞周期(ki-67の免疫組織化学染色)およびアポトーシス(TUNEL法)について検索した。この検討と並行し乳腺の凍

結切片上からLaser Capture Microdissection (LCM)によりTEBの上皮細胞を採取し、細胞増殖因子を中心にRT-PCRによる解析を進めている。

また、新たな腫瘍化および腫瘍促進に関連する因子検出の試みとして、既存のヒトマーカーであるHER2/neu、およびその他の因子としてvascular endothelial growth factor (VEGF)の発現についても追加検討を進めている。

C. 研究結果

今回は実験が進行中につき、途中採材ポイントであるDMBA投与4週間後の結果について示す。

まず、本試験の曝露条件の背景として、仔ラットにおいて体重値の推移、剖検時の下垂体、子宮および卵巣重量値には群間に明らかな差は認められなかった(図2)。

剖検では、DMBA処置の各群に1~3mm径の小結節形成が認められ、その頻度はDMBA単独群1/10例、Bis-A低用量群2/10例、Bis-A高用量群2/10例、DES低用量群3/10例、DES高用量群2/10例と群間に明らかな差は見られなかった。

病理組織学的検査では、DES高用量群のみで、全例に乳腺の腺房形成が認められ、一部乳汁の貯留を伴う腺腔の拡張が認められた。その他の変化として、剖検時の小結節は乳腺上皮由来の腺腫であった(図3,4)。

ki-67免疫染色による細胞増殖活性は、1群と比較し、DMBA処置の全群におい

て TEB および導管とも高い陽性率を示した。その中でも特に Bis-A 低用量群の TEB で陽性率が高い傾向が見られた。

アポトーシスの検索では、1 群と比較し、DMBA 処置の全群において TUNEL 陽性細胞が TEB および導管ともに多く認められた。また、DMBA 単独群と比較し、Bis-A 低および高用量群、DES 低用量群では TEB の陽性細胞がやや多い傾向にあった。

D. 考察

Bis-A や DES の母動物を介しての周産期曝露が、仔動物の乳腺の発達や腫瘍化に及ぼす影響について検討した。今回は DMBA モデルを用い仔ラットの乳腺上皮細胞における細胞増殖の調節機構について TEB を中心に解析した。TEB は上皮細胞の分化・増殖の主要な部位であり、乳腺の化学発がんモデルの標的組織とされている。さらに、そこに内分泌かく乱物質の処置を加えることにより腫瘍化が促進されるか否かを見極めることを重点として検索を進めている。

本実験系において DMBA 投与 4 週間後では、乳腺は対照群を含め基本的に導管を主体とする組織変化が認められたが、DES 高用量群では明らかに腺房形成が主体であった。この変化は我々が正常雌ラットにエストラジオール(30 μ g/kg)を筋注した際の組織所見と類似しており、DES の 100 μ g/kg の周産期曝露が乳腺の組織形態に明らかな影響を及ぼしているものと考えられた。しかし、この時点で腫瘍性病変の形成には群間で明らかな差は見出せなかった。

さらに、TEB における変化として、ki-67 による細胞増殖活性は、Bis-A 投与により用量相関性は明らかでないものの、Bis-A 低用量群でやや高い傾向にあった。また、アポトーシスの発現は、TEB の組織形態を有する Bis-A 低および高用量群、DES 低用量群にやや多い傾向が見られた。これら TEB の変化は、いずれも導管の伸長に関連しているものと考えられるが、さらに同部位の cyclinD1 ないし CyclinD1-Cdk4 complex 形成等の細胞増殖因子の解析を追加して究明する必要があると考え

られる。この点については、TEB の特定の上皮細胞を対象として LCM を用いての mRNA レベルの検索も追加検討を進めている。

E. 結論

内分泌かく乱物質の乳腺への影響を *in vivo* 系で検証するため、Bis-A および DES を周産期に曝露し、乳腺発がん試験系にもたらす影響を精査した。DMBA 投与 4 週間後では、TEB における変化として、ki-67 による細胞増殖活性が Bis-A 低用量群でやや高い傾向にあった。この点については他の細胞増殖因子の解析も含め追加検討を進めている。これらの解析から、さらに内分泌かく乱物質の乳腺の分化ないし腫瘍化促進に及ぼす作用を明らかにしていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Y Sekido, S Umemura, S Takekoshi, Y Suzuki, Y Tokuda, T Tajima, RY Osamura: Heterogeneous gene alterations in primary breast cancer contribute to discordance between primary and asynchronous metastatic/recurrent sites: HER2 gene amplification and p53 mutation, *International Journal of Oncology* 22, 1225-1232, 2003

2) S Umemura, H Itoh, M Ohta, Y Suzuki, M Kubota, Y Tokuda, T Tajima, RY Osamura: Immunohisto-chemical Evaluation of Hormone Receptor for Routine Practice of Breast Cancer: Highly Sensitive Procedures Significantly Contribute to the Correlation with Biochemical Assays, *AIMM* 11(1), 62-72, 2003

2. 学会発表

1) 環境ホルモン学会、第 6 回研究発表会、2003 年 12 月 2-3 日(仙台国際センター) 卵巣摘出およびエストロゲンの用量が DMBA 誘発乳腺腫瘍に及ぼす影響 (P306) 美谷島 克宏、柿本 恒知、竹腰 進、長村 義之

2) 92nd USCAP(United States and Canadian Academy of Pathology), 2003 年 3 月 22-28 日 (Marriott Wardman Park Hotel, Washington DC)

DC)

3) 日本トキシコロジー学会学術年会, 第
31 回研究発表会, 2004 年 7 月 6-8 日(大
阪国際会議場)

低および高用量エストロゲン処理におけ
るラット乳腺増殖・腫瘍化とエストロゲ
ンレセプター発現の変動比較(P304)

美谷島 克宏, 柿本 恒知, 竹腰 進, 長村 義
之

H. 知的所有権の出願・取得状況

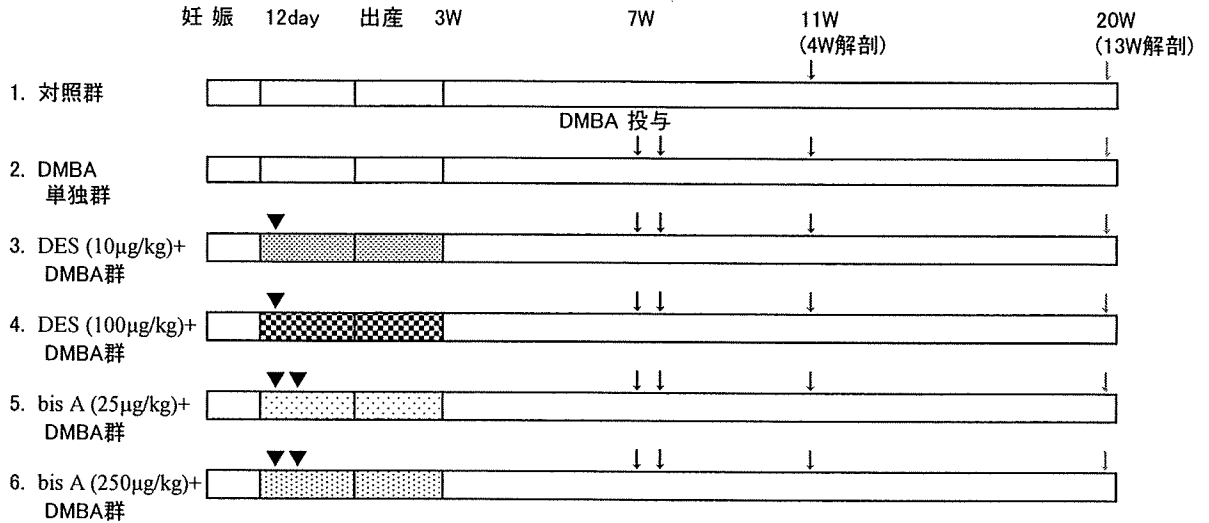
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1 試験系



周産期投与:母動物に妊娠12日~出産後20日を予定.
 →対照群, DMBA単独群には溶媒を投与. ▼: diethylstilbestrol (DES)投与, ▼▼Bisphenol A (bis A)投与
 ↓↓:DMBA投与, ↓:4週間後解剖, ↓:13週間後解剖.

図2 化合物曝露による影響

群	最終体重 g	下垂体		卵巣		子宮		性周期 スメア像 の異常
		重量 mg	相対重量 mg/g*100	重量 mg	相対重量 mg/g*100	重量 mg	相対重量 mg/g*100	
1. Vehicle + Sham (Control)	289.6	15.1	5.19	96.1	33.18	447.10	154.38	-
2. Vehicle + DMBA (DMBA)	262.3	13.5	5.16	89.4	34.08	431.80	164.60	-
3. DES 10µg/kg + DMBA (DES-L)	259.8	14.2	5.46	83.8	32.34	544.52	207.96	-
4. DES 100µg/kg + DMBA (DES-H)	284.1	17.8	6.27	90.8	32.13	318.35	113.13	持続発情 異常像 +
5. bisA 25µg/kg + DMBA (bisA-L)	284.1	13.5	4.92	88.1	32.24	433.90	158.29	-
6. bisA 250µg/kg + DMBA (bisA-H)	274.9	14.7	5.53	87.7	32.68	719.70	272.96	-

図3 乳腺の病理組織学的変化

群	病理組織学的検査および免疫組織化学				
	組織像	ER α	Ki-67	Cdk2	Apoptosis
1. Vehicle + Sham (Control)	TEB	+	+	+	+
	Duct	+	+	+	-
2. Vehicle + DMBA (DMBA)	TEB	+	+	+	+
	Duct	+	+	+	-
3. DES 10 μ g/kg + DMBA (DES-L)	TEB	+	++	++	+
	Duct	+	++	+	-
4. DES 100 μ g/kg + DMBA (DES-H)	Duct (dilatation)	+	++	+	+
	Acinus, Lactation	+	+++	++	+
5. bisA 25 μ g/kg + DMBA (bisA-L)	TEB	+	++	+	+
	Duct	+	+	+	-
6. bisA 250 μ g/kg + DMBA (bisA-H)	TEB	+	+	+	+
	Duct	+	+	+	-

図4 DMBA投与4週後の乳腺の小結節発現状況

群	小結節 発現例数 (10例中)	小結節の 組織像
1. Vehicle + Sham (Control)	-	-
2. Vehicle + DMBA (DMBA)	1	hyperplasia
3. DES 10 μ g/kg + DMBA (DES-L)	3	hyperplasia
4. DES 100 μ g/kg + DMBA (DES-H)	2	hyperplasia
5. bisA 25 μ g/kg + DMBA (bisA-L)	2	hyperplasia
6. bisA 250 μ g/kg + DMBA (bisA-H)	2	hyperplasia

11. 確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

分担研究者 西川 淳一 大阪大学大学院 助教授

研究要旨 化学物質の核内受容体への作用を迅速に検出できるシステムを構築し、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した。その結果、有機スズ化合物が低濃度で RXR (Retinoid X Receptor) 及び PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) γ に作用することが明らかとなった。PPAR γ は RXR と共同して遺伝子発現を制御し、脂肪細胞の分化に関与することが知られている。そこで、有機スズ化合物の脂肪細胞分化への影響を調べたところ、TBT (Tributyltin) 及 TPT (Triphenyltin) は顕著に前駆脂肪細胞株 3T3-L1 の脂肪細胞への分化を誘導した。

A. 研究目的

核内受容体はリガンド依存性の転写調節因子であり、多細胞生物の内分泌調節系の主要な部分を担っている。核内受容体の生体内リガンドは、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、脂溶性ビタミン等の低分子脂溶性物質であり、内分泌かく乱作用が疑われている環境汚染物質とその化学的性質が似ている。その為、内分泌かく乱作用の多くが核内受容体を介していると疑われるが、核内受容体にはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体以外にも多数存在し、ヒトにおいては48種類の核内受容体が確認されている。ノックアウトマウス等の解析から、これらの受容体のほとんどが生物の発生や分化、恒常性の維持に重要な役割を担っていることが分かっている。そのため、最終的には48種類すべての受容体について化学物質の影響を評価しなければならないと考えられるが、現在の方法論では膨大な数の化学物質の多種類の受容体への影響を調べることは困難である。そこで、

本研究課題では簡便、迅速で経済性に優れたハイスループット型アッセイ法の開発を行い、構築したアッセイ法を用いて、内分泌かく乱物質の核内受容体への影響を調べる。

B. 研究方法

核内受容体リガンド検出系 (CoA-BAP システム)

ER α 、ER β 、RAR α 、RAR γ 、TR α 、VDR、RXR α 、RXR γ 、PPAR α 、PPAR γ 、PPAR δ 、LXR α 、LXR β 、FXR、ERR α 、ERR γ のリガンド結合領域を GST との融合タンパク質として、大腸菌を用いて大量に発現させ、精製した。これを96穴ポリスチレンプレートに固定化し、ここに化学物質とともにコアクチベーター TIF2 を加えた。もし、化学物質にアゴニスト様活性があれば、核内受容体の構造変化を誘起し、コアクチベーターが結合する。コアクチベーターは、あらかじめアルカリフォスファターゼと融合させてあるので、この酵素活性を指標に、化学物質のアゴニスト活性を評価した。

レポーター遺伝子試験

RXR 発現用ベクターとして、ヒト由来 RXR のリガンド結合領域を GAL4DNA 結合領域 (GAL4DBD) につないだ GAL4DBD-hRXR α を、PPAR γ 発現用ベクターとして、ヒト由来 PPAR γ のリガンド結合領域を GAL4DBD につないだ GAL4DBD-hPPAR γ を用いた。レポーター遺伝子としては、4 つの GAL4 結合配列を tk プロモーター上流につないだ p4xUAS-tk-luc を用いた。GAL4DBD-hRXR α 及び GAL4DBD-hPPAR γ を p4xUAS-tk-luc とともに、F9 細胞及び NIH3T3 細胞にリポフェクチン法で遺伝子導入し、化学物質添加後のルシフェラーゼ活性の誘導を調べた。

脂肪細胞分化誘導試験

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を、10% Calf Serum を含む DMEM 中でコンフルエントに達するまで培養した。さらに 24 時間培養後、試験化合物を含む分化誘導培地 (DMEM、10% FBS、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin、1 μ M Dexamethasone、10 μ g/ml insulin) に交換した。誘導開始 60 時間後、分化促進培地 (DMEM、10% FBS、5 μ g/ml insulin) に交換した。その後、試験化合物を添加した分化促進培地を 2 日毎に新鮮なものに交換した。分化誘導開始 6 日後、脂肪滴の蓄積を Oil Red O 染色で、脂肪細胞に特異的に発現する ap2 遺伝子の発現をノーザンブロット法で調べた。

C. 研究結果

内分泌かく乱作用が疑われる 40 種類の化学物質について、16 種類のヒト由来核内受容体への影響を CoA-BAP システムを用いて調べた。その結果、多くの化学物質が核内受容体に作用することが分かった。アルキルフェノール類は、これまでの報告と同様に、ER α 及び ER β に対し比較的強い作用を示した。アルキルフェノール

類は、ER 以外にも RAR にも作用した。また、有機スズ化合物の TBT は RXR α に、TPT は PPAR γ に強力に作用し、既知リガンドとして知られている 9-cis retinoic acid や rosiglitazone と同程度の用量-応答性を示した。

次に、CoA-BAP システムの結果を検証するため、哺乳動物細胞を用いたレポーター遺伝子試験を行った。その結果、TBT 及び TPT は用量依存的に RXR α 及び PPAR γ の転写活性化能を増強した。これらの結果は、有機スズ化合物が RXR α 及び PPAR γ のアゴニストとして作用することを示唆している。

さらに有機スズ化合物の生理学的な作用を検証するため、PPAR γ /RXR が主要な役割を演じている脂肪細胞分化への TBT 及び TPT の影響を検討した。前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞は、適当な培養条件で PPAR γ リガンドにより脂肪細胞への分化が促進される事が知られている。そこで、有機スズ化合物添加後の 3T3-L1 細胞について、脂肪滴の蓄積を調べた。その結果、有機スズ化合物は、溶媒コントロールに較べ有意に脂肪細胞に分化した細胞数を増加させた。また、脂肪細胞に特異的に発現する ap2 の mRNA 量を調べたところ、顕著に増加していた。

D. 考察

CoA-BAP システムを用いて 40 種類の化学物質について、多種類の核内受容体への影響を調べた結果、アルキルフェノール類は比較的強く ER に作用するなど、他の方法論で得られた結果とある程度的一致が見られ、スクリーニング法として使用可能であると考えられた。しかし、CoA-BAP システムでは、TBT は RXR α に作用する

が、PPAR γ には作用しなかった。逆に、TPT は PPAR γ に作用するが、RXR α には作用しなかった。しかし、レポーター遺伝子試験を行ったところ、TBT と TPT は、いずれも RXR α と PPAR γ の両方の受容体に作用し、CoA-BAP システムの結果との矛盾が生じた。これは、CoA-BAP システムが、無細胞系のアッセイ法であり、コアクチベーターとして TIF2 一種類しか用いていないのに対し、レポーター遺伝子試験では培養細胞中に存在する多種類のコアクチベーターのいずれもも利用可能であることに起因していると考えられる。この問題を解決するためには、今後、CoA-BAP システムに使用可能なコアクチベーターの種類を増やし、化学物質選択的な核内受容体への結合を検討する必要がある。

本研究において、有機スズ化合物は PPAR γ と RXR のリガンドとして、脂肪細胞の分化に影響を及ぼすことが明らかになった。現在、PPAR γ や RXR のリガンドは生活習慣病改善薬として開発中であり、その中の一部は既に II 型糖尿病改善薬として臨床応用されている。しかし、これらの薬剤は同時に深刻な副作用も報告されており、医師の管理下、慎重な投与が義務付けられている。一方、環境中に放出された化学物質は、このような管理を受けず、ヒトを含む野生生物に常時、摂取される危険性を有しており、この事による健康影響が危惧される。

有機スズ化合物の RXR 及び PPAR γ への活性は、非常に低濃度 (10 nM) から認められ、これまでに知られているアロマトラーゼへの阻害濃度 1 μ M と較べても、100 倍程度低い。有機スズ化合物の内分泌かく乱作用としては、海産性巻貝類のインボセックス誘導が有名であり、この

作用も非常に低濃度で起こることが知られている。我々は、別の研究で、海産性巻貝類に RXR に非常に似た遺伝子が存在することを確認しており、このような低容量作用が核内受容体を介している事が推察される。

E. 結論

- ・ ヒト核内受容体 16 種類について、迅速なリガンド検出系を構築した。
- ・ 有機スズ化合物が、RXR 及び PPAR γ のアゴニストとして作用することを明らかにした。
- ・ 有機スズ化合物が、脂肪細胞の分化を促進することを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., Nishikawa, J. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ / retinoid X receptor (RXR) pathway. *Mol. Pharm. in press*

Osada, S., Nishikawa, J., Nakanishi, T., Tanaka, K., Nishihara, T. Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity. *Toxicol. Lett. in press*

Ohta, K., Osada, S., Nishikawa, J., Nishihara, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding the histone acetyltransferase MOZ (monocyclic leukemia zinc finger protein) in the rat. *J. Health Sci. in press*

Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Horiguchi, T. Involvement of the

- retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in Gastropods. *Environ. Sci. Technol.* 38: 6271-6276 (2004)
- Jung, J., Ishida, K., Osada, S., Nishikawa, J., Nishihara, T. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene stimulates the estrogenic activity in MCF-7 cells. *J. Health Sci.* 50: 581-587 (2004)
- Nishizuaka, M., Heitaku, S., Maekawa, S., Nishikawa, J., Imagawa, M. Development of standardized in vitro assay system for estrogen receptors and species specificity of binding ability of 4-nonylphenol and p-octylphenol. *J. Health Sci.* 50: 511-517 (2004)
- Maekawa, S., Nishizuaka, M., Heitaku, S., Kunimoto, M., Nishikawa, J., Ichikawa, K., Shimada, K., Imagawa, M. Development of a competitive enzyme immunoassay for detection of capacity of chemicals to bind quail estrogen receptor α and β . *J. Health Sci.* 50: 25-32 (2004)
- Mikamo, E., Harada, S., Nishikawa, J., Nishihara, T. Endocrine disruptors induce cytochrome P450 by affecting transcriptional regulation via pregnane X receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193: 66-72 (2003)
- Kanayama, T., Mamiya, S., Nishihara, T., Nishikawa, J. Basis of a high-throughput screening method for nuclear receptor ligands. *J. Biochem.* 133: 791-797 (2003)
- Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishihara, T. Effect of suspected endocrine disruptors on various kinds of nuclear hormone receptors. *J. Environ. Biotech.* 3: 37-42 (2003)
- Shiraishi, F., Okumura, T., Nomachi, M., Serizawa, S., Nishikawa, J., Edmonds, J., Shiraishi, H., Morita, M. Estrogenic and thyroid hormone activity of a series of hydroxy-polychlorinated biphenyls. *Chemosphere.* 52: 33-42 (2003)
- Mikamo, E., Harada, S., Nishikawa, J., Nishihara, T. Methoxychlor induces CYP2C11 to convert itself into hormonally active metabolites. *J. Health Sci.* 49: 229-232 (2003)
- Kawamura, Y., Ogawa, Y., Nishimura, T., Kikuchi, Y., Nishikawa, J., Nishihara, T., Tanamoto, K. Estrogenic activities of UV stabilizers used in food contact plastics and benzophenone derivatives tested by the yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 49: 205-212 (2003)
- Kitagawa, Y., Takatori, S., Oda, H., Nishikawa, J., Nishihara, T., Nakazawa, H., Hori, S. Detection of thyroid hormone receptor-binding activities of chemicals using a yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 49: 99-104 (2003)
- Takatori, S., Kitagawa, Y., Oda, H., Miwa, G., Nishikawa, J., Nishihara, T., Nakazawa, H., Hori, S. Estrogenicity of metabolites of benzophenone derivatives examined by a yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 49: 91-98 (2003)

2. 学会発表

第7回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム (2004年、12月、名古屋)

「Effects of Suspected Endocrine Disruptors on Nuclear Receptor Family」

日本薬学会第124年会 (2004年、3月、大阪)

「有機スズによる海産巻貝類のインポセックス
誘導への RXR の関与」

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

出願番号：特願2003-166686

発明の名称：核内受容体リガンド検出剤、組換えタンパク質、発現用遺伝子、組換えベクター、形質転換体、核内受容体リガンド検出方法、及び、核内受容体リガンド検出キット

発明者：西川淳一

特許出願人：財団法人大阪産業振興機構

12. 確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の為の ES 細胞分化増殖影響解析研究

分担研究者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨； 内分泌かく乱物質は、種々のホルモン作用を障害することにより毒性を引き起こすことが知られている。本研究で用いる 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。それゆえ、内分泌かく乱化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用であると思われる。本年度は ES 細胞から形成される胚様体 (EB) を用いて Bisphenol-A (BPA) の影響を解析したところ、細胞数の増加が見られることを確認した。さらに、内分泌かく乱化学物質の研究に適した ES 細胞培養用の無血清培地を新規に作製し、レチノイン酸及び BPA の影響を検索した結果、それぞれ、EB のサイズの増加、ならびに細胞分化に影響が見られ、この培地が有用であることが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の暴露は、エストロジェン、アンドロジェン、甲状腺ホルモン等のホルモン作用を障害することにより種々の毒性を引き起こすことが知られている。本研究で取り上げる 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。それゆえ、内分泌かく乱化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用であると思われる。そこで、エストロジェン等の種々のホルモンの ES 細胞分化への影響を形態及び遺伝子レベルで明らかにし、ES 細胞の *in vitro* 試験系としての有用性を確認し、リスク予測に役立てることを目的に下記の実験を行った。

B. 研究方法

マウス ES (E14-2s) 細胞をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIF を除いた ES 培地 (従来使用した血清入り) で、4 日間浮遊培養した。その間に all-trans retinoic acid (ATRA) ($5 \times 10^{-6} \text{M}$)、または、BPA (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}M) を添加し、4 日後に胚様体 (EB) を採取し、細胞数を

計測した ($n=9$)。

ES 細胞培養用の培地血清中に存在する各種ホルモンの影響ならびにエストロジェン様作用を有する Phenol-red の影響を除外するため、新規に無血清培地を作製した。次いで、マウス ES 細胞 (E14-2a) をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIF を除いた上記無血清 ES 培地で 4 日間浮遊培養した。その間に、ES 細胞培養系における神経分化誘導物質として知られている all-trans retinoic acid (ATRA) を $5 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度で添加、または、BPA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}M) を添加し、各々、4 日間浮遊培養後、化合物を除いた無血清培地でさらに浮遊培養あるいはゼラチンコート dish 上で培養し、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 ATRA ($5 \times 10^{-6} \text{M}$)、BPA (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}M) を添加し、4 日後に胚様体 (EB) を採取し、