

20040/255A

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）

内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・  
新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究

H16-化学-003

2004（平成16年度）

総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞  
国立医薬品食品衛生研究所

平成17年（2005）4月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

研究課題名（課題番号）＝ 内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）  
の胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究（H16-化学-003）

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露による

リスク予測に関する総合研究（H16-化学-003）

江馬 眞 ----- 1

II. 分担研究報告書

1. 奇形の受容体シグナルを介した発生メカニズムの解析

江馬 眞/高木 篤也 ----- 13

2. 胎生期・授乳期ダイオキシン暴露のアカゲザル歯形成・発育に及ぼす影響

安田 峯生 ----- 17

3. 胚幹細胞（ES細胞）に対する受容体シグナルを介する化学物質の胎児毒性

モデルとしての有用性の検討

高木 篤也 ----- 21

4. 受容体原性シグナルを介したエピジェネティック発がんの分子機能解析

菅野 純 ----- 25

5. 細胞アレイを指標とした内分泌かく乱化学物質の影響

矢守 隆夫 ----- 31

6. ヒト型モデル動物によるAhRの分子基盤解析とAhRの生理的プロセスへの関与

藤井 義明 ----- 37

7. ヒト型モデル試験系による内分泌かく乱化学物質の影響解析

鎌滝 哲也 ----- 43

8. ダイオキシン類の短期間雌雄ラットへの暴露が生殖器に及ぼす影響

藤本 成明 ----- 47

9. 甲状腺ホルモンかく乱物質の作用機構の解明：ラットからヒトへ

加藤 善久 ----- 59

10. 受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーション

井上 達 ----- 69

11. ダイオキシン類の毒性学的研究における国際動向に関する研究

広瀬 明彦 ----- 73

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 81

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 87

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

内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露による  
リスク予測に関する総合研究

主任研究者 江馬真 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露影響を明らかにすると共に、毒性影響の作用機序に関する基礎的解析を推進することにより、ヒトへのリスクアセスメント向上に資することにある。特に胎児・新生児暴露の影響、発がん機構並びに動物からヒトへの予測性の問題等の未だ解決されていない分野についても注意深く検討する必要がある。平成16年度より下記計画に沿って研究に着手した。これまでに得られた主な成果として、【奇形発生】に関しては、それぞれ口蓋裂を誘導することが知られている2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシン（TCDD）、レチノイン酸、コルチコステロンを対象にそれらの標的遺伝子解析のためのRNA抽出ならびにマイクロアレイ解析のための基礎的検討を実施し、マウス胎児口蓋の正常発生過程における多くの遺伝子発現変化を同定することが出来、これをもって口蓋裂標的遺伝子同定のための技術基盤を確立した。TCDDの胎生期・授乳期暴露は、児の歯の形成を障害し、そのLOAELは、げっ歯類における発生毒性のそれとほぼ同じ桁にあることを示した。マウス胚性幹細胞（ES細胞）の細胞数増加に対しTCDDが抑制的に作用すること、一方、反対にES細胞の浮遊培養で形成される胚様体に対しては、TCDDはその細胞数増加に対し促進的に作用することを確認した。【発がん】に関しては、発癌プロモーター高感受性マウスであるTg.ACマウスの雄に、TCDDを1、3、10、30及び100ng/kg体重の用量で週2回、6ヶ月間の経口投与実験を実施した結果、投与群において前胃の腫瘍が低頻度ながら観測され、TCDD投与の低濃度影響の検出系としての可能性が示唆された。また、Tg.ACマウスのB6系への戻し交配中に前胃乳頭腫の高頻度自然発生現象を見出した。【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数(TEF)及び耐容一日摂取量(ADI)の妥当性の検討】に関しては、ダイオキシン類を含む種々の化学物質のCancer Cell Informaticsによる評価を進めた。さらに、Tributyltinの分子メカニズム解析にがん細胞パネルの中の前立腺癌PC-3細胞株がモデル系として使えることが示唆された。AhRホモ欠失雌マウスの部分的不妊は、生殖サイクルの不順による排卵数の低下が原因であり、コレステロールからエストロジェンを合成する卵巣におけるステロイドホルモン合成系の律速酵素であり、最終の合成反応を触媒するCYP19遺伝子の発現制御にAhR/Arntが関与していることが明らかになった。PAHsがLXR $\alpha$ のリガンドによって誘導されるLXR $\alpha$ 標的遺伝子の

mRNA 発現を濃度依存的に抑制し、LXR $\alpha$  を介して誘導された転写活性は PAHs によって AHR 依存的に抑制されることを明らかにした。また、LXR $\alpha$  のヘテロ二量体のパートナーである RXR $\alpha$  のタンパク質の分解はプロテアソームを介して PAHs によって促進される可能性が示唆された。新生仔期マウス前立腺において、Z2G、Peroxa6、MUP、GRP78、UB 遺伝子が、アンドロゲン応答性の転写調節を受けていることが明らかになった。これらのいくつかは、新生仔期でも高発現しており、3MC により発現抑制され、前立腺の発生分化への関与が示唆された。PCB の一つである KC500 投与後、4 種の動物において、血清中 T<sub>4</sub> 濃度の低下には、T<sub>4</sub> の肝臓への移行が重要であることが示唆された。ヒト UGT 分子種の中で、T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性の高い分子種は、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A8 であることが示された。【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】に関しては、受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーションについて、最近の三つの論点について検討し、その考え方を解明した。第 24 回ハロゲン化有機環境汚染物質と POPs に関するシンポジウム「DIOXIN' 2004」等の国際会議に参加し、ダイオキシン類の毒性評価上重要な TEF 評価、非ダイオキシン様 PCB、芳香族炭化水素 (PAH)、ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) の健康影響に関する最新の国際動向についてまとめた。

以上、平成 16 年度においては、これまでに得られた情報をもとに化学物質の胎児・新生児影響を中心にさらに発展並びに詳細な検討を行い、国民の健康に関わる、より確度の高いリスクアセスメントに役立つ研究を遂行することが出来た。

## 分担研究者

江馬真 (国立医薬品食品衛生研究所)

安田峯生 (広島国際大学保健医療部)

高木篤也 (国立医薬品食品衛生研究所)

菅野純 (国立医薬品食品衛生研究所)

矢守隆夫 (癌研究会癌化学療法センター)

藤井義明

(筑波大学先端学際領域研究センター)

鎌滝哲也 (北海道大学薬学部)

藤本成明

(広島大学原爆放射線医科学研究所)

加藤善久 (静岡県立大学薬学部)

井上達 (国立医薬品食品衛生研究所)

広瀬明彦 (国立医薬品食品衛生研究所)

## A. 研究目的

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質 (ダイオキシン類を含む) の胎児・新生児暴露影響を明らかにすると共に、毒性影響の作用機序に関する基礎的解析を推進することにより、ヒトへのリスクアセスメント向上に資することにある。特に胎児・新生児暴露の影響、発がん機構並びに動物からヒトへの予測性の問題等についての未だ解決されていない分野についても注意深く検討する必要がある。具体的には、齧歯類モデルにおいて口蓋裂発生に関する様々な標的分子種を明らかにし、作用機序を明らかにする。本研究では、3

種類の異なった核内受容体 (AhR、レチノイン酸受容体 (RAR)、グルココルチコイド受容体 (GR)) を介した口蓋裂誘導物質、すなわち、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシシン (TCDD)、レチノイン酸、コルチコステロンを対象に、それらの標的遺伝子を明らかにし、口蓋裂発生メカニズムを明らかにする (江馬、高木)。霊長類を対象とする研究として、胎生期・授乳期を通じて TCDD に暴露されたアカゲザル児の乳歯期からほぼ成獣期に至るまでの歯の形成・発育を明らかにする (安田)。TCDD の ES 細胞分化への影響について遺伝子レベルで明らかにし、ダイオキシシンによる種々の胎児毒性に直接関与する遺伝子を同定することによって、胎児毒性予測モデルとしての ES 細胞培養系の有用性を検討する (高木)。受容体原性シグナルを介したエピジェネティック発がんの分子機構解析を行う。すなわち、p53 ヘテロ欠失マウスを用いたこれまでの研究で示唆されたダイオキシシンによる発がんの非単調用量反応性 (逆U字型反応) の機序解明のため、短期発がんモデルである Tg.AC マウスを用いて再現性を確認すると同時に、その発がん用量相関性の分子機構を解析する (菅野)。新規化学物質の細胞増殖阻害メカニズムを予測するシステム「Cancer Cell Informatics」を用い、細胞増殖への影響を切り口として活用し、内分泌かく乱分子機構のフィンガープリントを解析し、生体作用様式の推測を行う (矢守)。外来異物に対する生体反応

における AhR の役割を明らかにする。また、これまでに作製したヒトの AhR をマウスの AhR に入れかえたマウスを用いて、ヒトの外来異物の感受性を明らかにする (藤井)。AhR-CYP シグナル伝達経路を介した酸化ストレスが芳香族炭化水素 (AH) による内分泌かく乱作用に関与している可能性がある。そこで、ヒト型モデル試験系を用いて AH による内分泌かく乱作用における CYP 誘導及びその機能の役割を明らかにし、リスクアセスメントに役立てる (鎌滝)。新生仔期の齧歯類前立腺でアンドロゲン応答遺伝子を検索し、それへのダイオキシシンの作用を定量的に検証し、そのアンドロゲン阻害作用を指標としたリスク予測を行う (藤本)。いくつかの動物種を用いて、PCB による血清中  $T_4$  濃度の低下作用機序を解明し、さらに、その機序がヒトにおいて適用できるか否かを検討する (加藤)。海外における最新の内分泌かく乱化学物質 (ダイオキシシン類を含む) のヒトへの健康影響評価、特に胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する研究の国際的な進展状況に関する情報を収集し、本基盤研究の実験部分や事実上情報が不足している低用量効果の毒性評価のための背景的な支援を行う (井上)。受容体シグナルを介するスクリーニング試験法の確立に関する国際動向を調査・整理する。また、年次毎の国内外の、ダイオキシシンを含む受容体を介した毒性研究の成果の一般への発信法について、必要な課題を整理し、個々の課題に対し年次毎に提

言を作成する（広瀬）。

## B.研究方法

核内受容体を介した内分泌かく乱化学物質の口蓋裂誘導の分子機構を明らかにするため、第一段階として、C57BL/6 マウスの 13.5-15.5 日齢の胎児口蓋の正常発生過程における遺伝子発現変化を 40,000 以上の遺伝子解析が可能なアフィメトリクス社の gene chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて解析<sup>\*</sup>した（江馬、高木）。

妊娠 20 日のアカゲザルに TCDD を 30 または 300ng/kg 皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。児は母体に哺育させ、約 1 年後に離乳した。生後約 200 日から 1700 日まで、軽麻酔下で児の歯を口腔内デジタルカメラ及び X 線により観察した（安田）。

TCDD の胎児発生初期への影響を検討するため、胚性幹細胞であるマウス ES 細胞(E14-2a)を用いて、TCDD の細胞数、分化に及ぼす影響を検討した（高木）。

発がんプロモーター作用高感受性動物として知られている Tg.AC マウス(癌遺伝子の v-Ha-ras 導入トランスジェニックマウス)をベースにした TCDD 発がん作用の解析に適したマウスの樹立を目指すとともに、Tg.AC マウスの雄(一群 8 匹)に、2,3,7,8-TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で

週 2 回 6 ヶ月間経口投与し生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析した（菅野）。

ダイオキシン類を含む種々の化学物質、核内受容体アゴニストについて、ヒト培養細胞パネルに対する増殖阻害活性の強弱を調べることにより、その毒性(増殖阻害)を指標としたプロファイル評価を行った。次いで、「Cancer Cell Informatics」により、その作用メカニズムについて既知の抗がん剤や阻害剤との比較検討を行った。また、ヒト癌細胞に対する化学物質暴露の影響を、Gene Chip を用いた遺伝子発現解析<sup>\*</sup>により、その影響を調べた（矢守）。

AhR 欠失雌マウスの卵巣の形態及び機能を野性型マウスと比較して検討するため、先ず実験的にどの程度不妊であるかの検討を開始した。また、AhR の卵巣の機能欠損の原因を明らかにするため、さらに排卵数、生殖サイクル、精巣の遺伝子発現の変化について RT-PCR 法による検討を開始した（藤井）。多環芳香族炭化水素(PAHs)が LXR $\alpha$  標的遺伝子(ABCA1, SREBP1c) mRNA 発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。TK プロモーターに LXR 応答配列を連結させたレポータープラスミドを HepG2 細胞に導入し、3-methylcholanthrene (MC) の LXR $\alpha$  転写活性に及ぼす影響を検討した。RXR $\alpha$  タンパク質の発現量は HepG2 細胞から調製した核抽出液を用い、ウエスタンブロット法により定量した（鎌滝）。

<sup>\*</sup> “Percellome” 法を用いた解析

<sup>\*</sup> “Percellome” 法を用いた解析

マウス前立腺に対する化学物質暴露の作用を検討する第一段階として、前立腺における発現タンパク質のプロテオーム解析を行った。また、新生仔期マウス前立腺における cDNA マイクロアレイ解析により、この時期におけるアンドロゲン応答性遺伝子を検索した(藤本)。

ddY 系マウス、Syrian 系ハムスター、Wistar 系ラット、Hartley 系モルモットに、Kanechlor-500(KC500) (100 mg/kg) を投与し、血清中 total T<sub>4</sub>、free T<sub>4</sub> 濃度及び肝臓中甲状腺ホルモントランスポーター遺伝子の発現量を測定した。また、T<sub>4</sub> の血清クリアランス、血清-組織間分配係数及び組織分布量を測定した。さらに、ラット、マウスに KC500 投与後 4 日に肝実質細胞懸濁液を調製し、肝実質細胞への T<sub>4</sub> の取り込み量を測定した。また、COS 細胞発現系ラット及び昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種の T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性を測定した(加藤)。

国際機関や各国政府機関で採用している化学物質の安全性評価に関する情報を収集し、また化学物質の生体影響に関する基礎研究成果をトランスレーショナルに社会に対して公表するなど、情報の質に応じた開示を進めるべく戦略的に考察した(井上)。

2004 年 9 月にベルリンで行われた第 24 回ハロゲン化有機環境汚染物質と POPs に関する国際シンポジウム

「DIOXIN' 2004」、及び第 7 回環境ホルモン学会研究発表会・国際シンポジウムに参加し、最新の内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する国際動向に

ついて情報収集した(広瀬)。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。また、ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

## C.D.研究結果と考察

### 【奇形発生】

核内受容体を介した内分泌かく乱化学物質の口蓋裂誘導の分子機構を明らかにするため、第一段階として、C57BL/6 マウスの 13.5-15.5 日齢の胎児口蓋の正常発生過程における遺伝子発現変化を 40,000 以上の遺伝子解析が可能なアフィメトリクス社の GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて解析した。13.5、14.5、15.5 日齢のマウス胎児の 13.5 日齢と 14.5 日齢のアレイデータの比較により、著しい数の遺伝子発現が 14.5 日で増加していることが明らかとなった。2 倍以上の変化を示したものの内、増加は約 40,000 遺伝子中 11,500 であり、減少は 2 遺伝子であった。14.5 日と 15.5 日齢のデータの比較では、増加は 770 遺伝子、減少は 190 遺伝子であった。14.5 日齢と 15.5 日齢の変動遺伝子のオントロジー解析を実施した結果、骨化、液性免疫応答遺伝子、細胞外スペ

\* "Percellome" 法を用いた解析



ース、核、中間フィラメント、酸素輸送、筋収縮等の機能に関連する遺伝子の増加が確認され、本測定技術は十分に今後の試験に用いることが出来るものと示唆された（江馬、高木）。

妊娠 20 日のアカゲザルに TCDD を 30 または 300ng/kg 皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5%量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。児は母体に哺育させ、約 1 年後に離乳した。生後約 200 日から 1700 日まで、軽麻酔下で児の歯を口腔内デジタルカメラ及び X 線により観察した。アカゲザルを用いた試験で観察出来た生存児は、対照群 15 例、30 ng/kg 群 13 例、300 ng/kg 群 11 例であった。対照群及び 30 ng/kg 群では乳歯、永久歯に異常は認められなかった。これに対して 300 ng/kg 群では、7 例（64%）に歯の欠如、円錐歯のような形態異常、正常な歯列弓から歯尖が舌側に偏位した萌出方向の異常が見出された。げっ歯類ではダイオキシン類の胎生期・授乳期暴露により歯の形成異常が誘発され、歯はダイオキシン類の発生障害作用に、感受性の高い器官と考えられている。ヒトでも油症患者やセベソ事故被爆者の追跡調査で、ダイオキシン類に胎内で暴露された児には歯の欠如、石灰化不全、エナメル質欠損が多発することが報告されている。本実験結果から、TCDD300 ng/kg の母体負荷が児の歯形成を障害することが明らかになった（安田）。

TCDD の胎児発生初期への影響を検討するため、胚性幹細胞であるマウス ES

細胞(E14-2a)を用いて、TCDD の細胞数、分化に及ぼす影響を検討した。マウス ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で LIF が存在下で培養し、培養 4 日後に ES 細胞の細胞数を計測した結果、TCDD の用量相関的に有意な減少、もしくは減少傾向が、1nM 以上の濃度で認められた。また、RT-PCR の結果、LIF 存在下で TCDD 添加 2 日間培養後、TCDD の 1nM から CYP1A1 の増加を確認した。ES 細胞を LIF が非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体 (EB) の細胞数を計測した結果 1nM 以上群で有意な増加が認められた。ゼラチンコート dish 上で TCDD を除いた培地で上記 EB をさらに培養して分化誘導させて形態学的観察を行った結果、0.1nM 以上で形態学的に異なった大形細胞の出現数の増加が見られ、ES 細胞への TCDD の暴露が、後期の分化過程に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された（高木）。

#### 【発がん】

発がんプロモーター作用高感受性動物として知られている Tg.AC マウス（癌遺伝子の v-Ha-ras 導入トランスジェニックマウス）をベースにした TCDD 発がん作用の解析に適したマウスの樹立を目指すとともに、Tg.AC マウスの雄（一群 8 匹）に、TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 6 ヶ月間経口投与し、生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析した。Tg.AC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のためのマウスの樹立に関しては、動物の SPF 化と TCDD 高感受性系統の C57BL/6 への back cross を継続した。その過程で

胃の前胃に高頻度に発生する乳頭腫が TCDD 経口投与実験の標的として利用可能であることが示唆された。Tg.AC マウスの雄に、TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 6 ヶ月間経口投与した結果、死亡率、体重には差は認められなかったが最高用量群で肝重量増加が確認された。また、投与群において前胃の腫瘍が低頻度ながら観測され、TCDD 投与の低濃度影響の検出系としての可能性が示唆された (菅野)。

【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数(TEF)及び耐容一日摂取量(ADI)の妥当性の検討】

ヒト培養細胞パネルを用いた「Cancer Cell Informatics」解析の結果、9-cis, retinoic acid と all-trans retinoic acid が同一のクラスターを形成したことから、ヒト培養細胞アレイが新規化学物質に対しての内分泌攪乱化学物質、核内受容体アゴニスト評価系として有用であることが示唆された。また、Tributyltin が各種の化合物と比較して、高い感受性を示すことが明らかとなった。ヒト前立腺癌培養細胞株 PC-3 おいて、Tributyltin 暴露による遺伝子発現変動を検討した結果、濃度及び時間依存的な発現変動を示す遺伝子が多数抽出された。その中には 3T3-L1 細胞で Tributyltin による発現誘導が報告されている aP2 遺伝子も含まれていた。Tributyltin 処理 24 時間後に発現変化の見られた遺伝子は VEGF などの血管新生関連遺伝子や、RHO 関連シグナル伝達遺伝子などを始め 300 以上にのぼり、このヒト前立腺癌培養細胞株 PC-3 は Tributyltin の作用メカニズムの

モデル解析系として使える可能性が高いことが明らかとなった (矢守)。

AhR 欠失雌マウスの卵巣の形態及び機能を野性型マウスと比較して検討するため、先ず実験的にどの程度不妊であるかの検討を開始した。また、AhR の卵巣の機能欠損の原因を明らかにするため、さらに排卵数、生殖サイクル、精巣の遺伝子発現の変化について RT-PCR 法による検討を開始した。AhR ホモ欠失雌マウスは、野性型雌マウスに比較して平均 1/4 産児数しか得られない事が分かった。また、野性型雌マウスは、この間に殆どすべて 3 回出産するが、AhR ホモ欠失雌マウスは、3 回目の出産はどの雌マウスでも見られなかった。AhR ホモ欠失雌マウスの部分的不妊は、生殖サイクルの不順による排卵数の低下が原因であり、さらに原因を追求した結果、コレステロールからエストロジェンを合成する卵巣におけるステロイドホルモン合成系の律速酵素であり、最終の合成反応を触媒する CYP19 遺伝子の発現制御に AhR/Amt が関与していることが明らかになった。生殖周期において AhR は FSH あるいは、LH によって直接又は間接に活性化されて CYP19 の発現を制御していると考えられた (藤井)。

多環芳香族炭化水素(PAHs) が LXR  $\alpha$  標的遺伝子 (ABCA1, SREBP1c) mRNA 発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。TK プロモーターに LXR 応答配列を連結させたレポータープラスミドを HepG2 細胞に導入し、3-methylcholanthrene (MC) の LXR  $\alpha$  転写活性に及ぼす影響を検討した。

RXR $\alpha$  タンパク質の発現量は HepG2 細胞から調製した核抽出液を用い、ウエスタンブロット法により定量した。PAHs の一つである 3-methylcholanthrene (MC) で処置した場合、 ABCA1 及び SREBP1c mRNA 発現量は MC の濃度依存的に抑制された。LXR $\alpha$  を介して誘導された転写活性は MC によって抑制された。MC による LXR $\alpha$  を介した転写活性の抑制は siAHR 導入により回復した。MC による RXR $\alpha$  タンパク質の発現量の抑制はプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン共処置によって解除された。このことから、LXR $\alpha$  シグナル伝達経路は PAHs によって AHR を介した RXR $\alpha$  タンパク質のプロテアソームによる分解が促進されることで抑制される可能性が示唆された。PAHs は LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  シグナル伝達系を抑制することでコレステロールのホメオスタシスを阻害し、その結果、動脈硬化誘発などの毒性が誘発される可能性が示唆された (鎌滝)。

マウス前立腺に対する化学物質暴露の作用を検討する第一段階として、前立腺における発現タンパク質のプロテオーム解析を行った。また、新生仔期マウス前立腺における cDNA マイクロアレイ解析により、この時期におけるアンドロゲン応答性遺伝子を検索した。マウス前立腺における既知分泌タンパク質の probasin (Pb), prostatic secreted protein 94 a.a. (PSP94) の高いレベルの発現が lobe 特異性をもって見られた。マウス前立腺分泌物を 2 次元電気泳動で展開して、多く発現しているタンパク質を同定した。

cDNA マイクロアレイ解析により、生後 1 W の前立腺の腹葉と背側葉において有意な RNA 発現量があつて、テストステロンに応答の見られた遺伝子として、small proline-rich proteins (SPRP)、lipin2、cathepsin E、defensin  $\beta$  等が同定された。去勢 10W 動物において、アンドロゲン応答性遺伝子発現に対する、E2 及び 3MC の作用を検討した結果、DHT 単独投与群に比べ、DHT +E2 群では IGF-1 及び ER $\alpha$  が 2.5 倍発現上昇していた。一方で、DHT +3MC 群においては mUB、grp78 の発現がそれぞれ 1/2、1/4 に低下した (藤本)。

ddY 系マウス、Syrian 系ハムスター、Wistar 系ラット、Hartley 系モルモットに、Kanechlor- 500(KC500) (100 mg/kg) を投与し、血清中 total T<sub>4</sub>、free T<sub>4</sub> 濃度及び肝臓中甲状腺ホルモントランスポーター遺伝子の発現量を測定した。また、T<sub>4</sub> の血清クリアランス、血清-組織間分配係数及び組織分布量を測定した。さらに、ラット、マウスに KC500 投与後 4 日に肝実質細胞懸濁液を調製し、肝実質細胞への T<sub>4</sub> の取り込み量を測定した。また COS 細胞発現系ラット及び昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種の T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性を測定した。KC500 投与により、マウス、ハムスター、ラットあるいはモルモットにおいて、T<sub>4</sub> の血清クリアランス及び分布容積は有意に増加した。分布容積の増加の度合いには、種差が見られ、KC500(100 mg/kg)を投与した時、ラットで 4.2 倍、ハムスターで 3.7 倍、モルモットで 1.8 倍、マウスで 1.4 倍であった。分布量は肝臓で特に高値を示した

。ラット、マウスでは、KC500 投与により、肝臓の LAT1 及び Mrp3 の mRNA の発現量が有意に増加した。ラット及びヒトの T<sub>4</sub>-UDP -glucuronosyl-transferase(T<sub>4</sub>-UDP-GT)活性を担う UGT 分子種を明らかにするために、COS 細胞発現系ラット及び昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種の T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性を測定した。ラット UGT 分子種では、UGT1A2、UGT1A5 及び UGT1A7 の T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性は、UGT1A1、UGT1A3 及び UGT1A6 の活性よりも著しく高かった。一方、ヒト UGT 分子種では、UGT1A1、UGT1A3 及び UGT1A8 の T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性は UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9 及び UGT2B7 の活性よりも著しく高く、ヒトで、T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性の高い分子種は、これら UGT1A1、UGT1A3、UGT1A8 であることが示された (加藤)。

【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】

内分泌かく乱化学物質 (ダイオキシン類を含む) の生体作用及びその作用機構に関する新たな科学的知見を一般社会にリスク情報として還元してゆくための要件を整理し、化学物質危害情報に対する適切な一般社会の対応、すなわち適切な危機管理と同時に適切な安心感を醸成する方途を提供するため、リスクの質と先進科学の普及に関する考察として、生体と異物の相互作用、リスクの質、ダイオキシン受容体のシグナル伝達に関する新たな情報について検討した (井上)。

2004年9月にベルリンで行われた第24回ハロゲン化有機環境汚染物質と POPS に関する国際シンポジウム「DIOXIN」

2004」に参加し、最新の内分泌かく乱化学物質の、ダイオキシン類の毒性評価上重要な TEF 評価及び同時に暴露している非ダイオキシン様 PCB、芳香族炭化水素 (PAH) 及び近年暴露量の増大が懸念されている臭素化難燃剤の一つであるポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) の健康影響に関する最新の国際動向について情報収集した (広瀬)。

## E. 結論

1. マウス胎児口蓋の正常発生過程における多くの遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析法により同定することが出来、口蓋裂標的遺伝子同定のための技術基盤を確立した。TCDD の胎生期・授乳期暴露は児の歯の形成を障害し、その LOAEL はげっ歯類における発生毒性のそれとほぼ同じ桁にあると考えられた。TCDD は ES 細胞培養系において、LIF 存在下で、細胞数を減少させ、LIF の非存在下で形成させた EB においては細胞数を増加させた。また、TCDD 暴露により EB の分化過程で他と異なった細胞の割合が増加した。
2. 発がんプロモーター高感受性マウスである Tg.AC マウスの雄に、TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回、6 ヶ月間の経口投与実験を実施した結果、投与群において前胃の腫瘍が低頻度ながら観測され、TCDD 投与の低濃度影響の検出系としての可能性が示唆された。また、Tg.AC マウスの B6 系への戻し交配中に前胃乳頭腫の高頻度自然発生現象を確認した。

3. 現在まで種々の化学物質をがん細胞パネルにかけ Fingerprint をデータベース化した。Tributyltin の分子メカニズム解析にがん細胞パネルの中の前立腺癌 PC-3 細胞株がモデル系として利用できる可能性が示唆された。
4. AhR ホモ欠失雌マウスの部分的不妊は、生殖サイクルの不順による排卵数の低下が原因であり、コレステロールからエストロジェンを合成する卵巣におけるステロイドホルモン合成系の律速酵素であり、最終の合成反応を触媒する CYP19 遺伝子の発現制御に AhR/Amt が関与していることが明らかになった。PAHs が LXR $\alpha$  のリガンドによって誘導される LXR $\alpha$  標的遺伝子の mRNA 発現を濃度依存的に抑制した。LXR $\alpha$  を介して誘導された転写活性は PAHs によって AHR 依存的に抑制された。LXR $\alpha$  のヘテロ二量体のパートナーである RXR $\alpha$  のタンパク質の分解はプロテアソームを介して PAHs によって促進される可能性が示唆された。
5. 新生仔期マウス前立腺において、Z2G、Perox6、MUP、GRP78、UB が、アンドロゲン応答性の転写調節を受けていることが明らかになった。これらのいくつかは、新生仔期でも高発現しており、3MC により発現抑制され、前立腺の発生分化への関与が示唆された。KC500 投与後、4 種の動物において、血清中 T<sub>4</sub> 濃度の低下には、T<sub>4</sub> の肝臓への移行が重要であることが示唆された。ヒト UGT 分子種の中で、T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性の高い分子種は、UGT1A1、

UGT1A3、UGT1A8 であることが示された。

6. 受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーションについて、最近の三つの論点について検討し、その考え方を解明した。第 24 回ハロゲン化有機環境汚染物質と POPs に関するシンポジウム「DIOXIN' 2004」等の国際会議に参加し、ダイオキシン類の毒性評価上重要な TEF 評価、非ダイオキシン様 PCB、芳香族炭化水素 (PAH)、ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) の健康影響に関する最新の国際動向についてまとめた。

以上、平成 16 年度本研究班における研究の進展の結果、得られた新知見ならびに新技術により、現実的なリスクアセスメントに今後よりいっそう貢献することが期待された。

#### F.健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A. and Kamata, E. (2005)  
Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. Food Chem Toxicol, 43, 325-331

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2004) OECD 化学物質対策の動向 (第 5

報) 衛研報告、 122, 37-42

広瀬明彦, 江馬 眞 (2004) 生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容 1 日摂取量 (TDI) 算定の考え方について、衛研報告、 122, 56-61

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M, Ema M (2004) Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride-Differences from the latest WHO guideline drafts- J Toxicol Sci, 29, 535-539.

Takahashi M, Ogata H, Izumi H, Yamashita K, Takechi M, Hirata-Koizumi M, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. (2004) Comparative toxicity study of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in newborn and young rats. Cong Anom, 44, 204-214

Fukui Y, Ema M, Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, and Tanimura T (2004). Comments from the Behavioral Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003). Cong. Anom., 44,172-177.

Fukuda, N., Ito, Y., Yamaguchi, M., Mitsumori, K., Koizumi, M., Hasegawa, R., Kamata, E. and Ema, M.(2004) Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. Toxicol. Lett., 150, 145-150.

Ema, M., Hrazono, A., Fujii, S. and Kawashima, K. (2004) Evaluation of developmental toxicity of  $\beta$ -thuyaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats. Food Chem. Toxicol., 42,465-470.

## 2. 学会発表

Ema M, Harazono A, Fujii S, Kawashima K. (2004): Developmental toxicity of  $\beta$ -thuyaplicin (TP) in rats. The 43th Annual Meeting of the Society of Toxicology Hirata-Koizumu M, Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, Mitsumori K, Hasegawa R,

Kamata E, Ema M (2004) Unxpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. 10th International Congress of Toxicology Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hayashi M (2004)

Development of genotoxicity prediction QSAR system for resistered and existing industrial chemicals in Japan. 10th International Congress of Toxicology

Yamaguchi Y, Nishimura N, Yahara M,

Edamoto H, Ikezaki S, Kasahara K,  
Tamura K, Kamata E, Hasegawa R, Ema M  
(2004) Renal damage in newborn  
rats treated with p-Cumylphenol.  
International Federation of Societies of  
Toxicologic Pathology

江馬 眞、原園 景、藤井咲子、川島邦  
夫 (2004) ヒノキチオールの子ラットにお  
ける発生毒性の検討、第44回日本先天  
異常学会学術集会

Ema M (2004) Decreased anogenital  
distance and increased incidence of  
undescended testes in fetuses of rats given  
monobenzyl phthalate, a major metabolite  
of butyl benzyl phthalate. Congress of the  
5th Royan International Research Award.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J,  
Ema M. (2004) Review of reproductive and  
developmental toxicity induced by organotins  
in aquatic and experimental animals. The  
24th International Symposium on  
Halogenated Environmental Organic  
Pollutants and POPs (DIOXIN 2004).

Ema M, Fukunishi K, Nagata R, Matsumoto

M, Hirose A, Kamato E. (2004)  
Developmental toxicity study of ultra violet  
light absorber  
2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-  
chloro-2H-benzotiazole in rats.  
The 25th Annual Meeting of the American  
College of Toxicology.

広瀬明彦、鎌田栄一、高橋美加、江馬 眞  
(2004) 有機スズの水生動物と実験動物  
における生殖発生毒性、環境ホルモン  
学会第7回研究発表会

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予  
定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

国内特許申請中 (特願 2003-  
317031、特願 2004-219285)

## 別添 4

### 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

#### II. 分担研究報告書

##### 1. 奇形の受容体シグナルを介した発生メカニズムの解析

国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 江馬眞

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 高木篤也

#### 研究要旨

核内受容体を介した口蓋裂発生に関する様々な標的分子種の同定ならびにシグナル伝達への影響を明らかにすることを目的に、本年度は基礎的検討として、13.5、14.5、15.5日齢のマウス胎児の口蓋を対象にマイクロアレイ解析を実施した。その結果、マウス胎児口蓋の正常発生過程における多くの遺伝子発現変化を同定し、口蓋裂標的遺伝子同定のための技術基盤を確立することが出来た。

#### A. 研究目的

核内受容体を介した口蓋裂発生に関する様々な標的分子種の同定ならびにシグナル伝達への影響を明らかにすることにより、作用機序を明らかにし、受容体原性物質のリスクアセスメントの信頼性を高める。

#### B. 方法

実験：C57BL/6の妊娠マウスより13.5、14.5、15.5日齢の胎児を摘出し、口蓋をハサミで採取し、RNAをRNAlater（キアゲン）で抽出、蛍光ラベル後、40000以上の遺伝子解析が可能なアフィメトリクス社のGeneChip Mouse Genome

430 2.0 Arrayを用いて正常発生過程における遺伝子発現解析を行った。なお、各日齢毎に使用したchip数は3で、chip一枚当たり13.5日齢では各5匹、14.5日齢では各3匹、15.5日齢では各2匹のプールサンプルを使用した。データ取り扱いは“Percellome”法を用いた。

（倫理面への配慮）

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。



### C. 研究結果

1) 13.5、14.5、15.5日齢の胎児のそれぞれの日齢が同じで異なるチップのデータを比較したところ、いずれもバラツキの少ない良好なデータであることが明らかとなった。

2) 13.5日齢と14.5日齢のデータを比較すると多くの遺伝子発現が14.5日で増加していることが明らかとなった。2倍以上の変化を示したものの内、増加は約40000遺伝子中11500であり、減少は2遺伝子であった。14.5日と15.5日齢のデータを比較では、多くの遺伝子の増加と減少が認められた。増加は770遺伝子、減少は190遺伝子であった。

3) 14.5日と15.5日齢の変動遺伝子の解析を実施した結果、骨化、液性免疫応答遺伝子、細胞外スペース、核、中間フィラメント（ケラチン）、酸素輸送、筋収縮等の機能に関連する遺伝子の増加が見られることが明らかとなった。

### D. 考察

本研究では、それぞれ口蓋裂を誘導することが知られている2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシン(TCDD)、レチノイン酸、コルチコステロンを対象にそれらの標的遺伝子の解析を行う。そのための基礎的検討として、正常発生過程の口蓋遺伝子のマイクロアレイ解析を実施した。その結果、既報にある遺伝子より遥かに多くの遺伝子が増動していることが明らかになった。また、それらの中には骨化

や筋分化等の遺伝子が含まれ、口蓋突起の増殖のみならず、口蓋の成熟過程の変化も検出出来るものと思われた。また、既報にあるようにケラチン遺伝子の増加も確認され、本測定技術は十分に今後の試験に用いることが出来るものと示唆された。

### E. 結論

マウス胎児口蓋の正常発生過程における多くの遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析法により同定することが出来、口蓋裂標的遺伝子同定のための技術基盤を確立した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文

Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A. and Kamata, E. (2005) Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. Food Chem Toxicol, 43, 325-331.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬眞(2004) OECD 化学物質対策の動向(第5報) 衛研報告、122, 37-42.

広瀬明彦、江馬眞(2004) 生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量(TDI)算定の考え方について、衛研報告、122, 56-61.

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A,

Takahashi M, Ema M (2004) Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride- Differences from the latest WHO guideline drafts- J Toxicol Sci, 29, 535-539.

Takahashi M, Ogata H, Izumi H, Yamashita K, Takechi M, Hirata-Koizumi M, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. (2004) Comparative toxicity study of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in newborn and young rats. Cong Anom, 44, 204-214.

Fukui Y, Ema M, Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, and Tanimura T (2004). Comments from the Behavioral Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003). Cong. Anom., 44, 172-177.

Fukuda, N., Ito, Y., Yamaguchi, M., Mitsumori, K., Koizumi, M., Hasegawa, R., Kamata, E. and Ema, M. (2004) Unexpected nephrotoxicity

induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. Toxicol. Lett., 150, 145-150.

Ema, M., Hrazono, A., Fujii, S. and Kawashima, K. (2004) Evaluation of developmental toxicity of  $\beta$ -thuyaplicin (hinokitil) following oral administration during organogenesis in rats. Food Chem. Toxicol., 42, 465-470.

## 2. 学会発表

Ema M, Harazono A, Fujii S, Kawashima K. (2004): Developmental toxicity of  $\beta$ -thujaplicin (TP) in rats. The 43th Annual Meeting of the Society of Toxicology Hirata-Koizumu M, Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, Mitsumori K, Hasegawa R,

Kamata E, Ema M (2004) Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. 10th International Congress of Toxicology Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hayashi M (2004)

Development of genotoxicity prediction QSAR system for resistered and existing industrial chemicals in Japan. 10th International Congress of Toxicology

Yamaguchi Y, Nishimura N, Yahara M, Edamoto H, Ikezaki S, Kasahara K,

Tamura K, Kamata E, Hasegawa R, Ema M (2004) Renal damage in newborn rats treated with p-Cumylphenol. International Federation of Societies of Toxicologic Pathology

江馬 眞、原園 景、藤井咲子、川島邦夫 (2004) ヒノキチオールの子ラットにおける発生毒性の検討、第44回日本先天異常学会学術集会

Ema M (2004) Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. Congress of the 5th Royan International Research Award.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J, Ema M. (2004) Review of reproductive and developmental toxicity induced by organotins in aquatic and experimental animals. The 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2004).

Ema M, Fukunishi K, Nagata R, Matsumoto M, Hirose A, Kamato E. (2004) Developmental toxicity study of ultra violet light absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-benzotiazole in rats. The 25th Annual Meeting of the

American College of Toxicology.

広瀬明彦、鎌田栄一、高橋美加、江馬眞 (2004) 有機スズの水生動物と実験動物における生殖発生毒性、環境ホルモン学会第7回研究発表会

#### 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

## 2. 胎生期・授乳期ダイオキシン暴露のアカゲザル歯形成・発育に及ぼす影響に関する研究

安田 峯生

広島国際大学保健医療学部 教授

### 研究要旨

妊娠 20 日から生後 90 日まで、母体に 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) 0 (対照)、30 または 300 ng/kg の体内負荷をかけたアカゲザル母体の児について、生後約 1700 日まで発育を観察したところ、300 ng/kg 群で 11 例中 7 例に乳歯や永久歯の欠如、円錐歯のような形態の異常、萌出方向の異常が認められた。30 ng/kg 群および対照群では異常は認められなかった。この結果から、TCDD のアカゲザルにおける最小毒性量 (LOAEL) は、げっ歯類における発生毒性のそれとほぼ同じ桁にあると考えられた。

### A. 研究目的

PCB やダイオキシンの胎生期暴露がヒトの歯の形成、発育に悪影響を及ぼしているとの疫学調査報告がある。本研究は、胎生期・授乳期にダイオキシン暴露を受けたアカゲザル児の歯の形成と発育を調べ、ヒトでの影響評価に資することを目的とする。

### B. 研究方法

アカゲザルを交配し、約 70 匹を 3 群に分け、妊娠 20 日に 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (以下 TCDD) 0 (溶媒)、30 または 300 ng/kg を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5%量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。児は母体に哺育させ、

約 1 年後に離乳した。生後約 200 日から 1700 日まで、軽麻酔下で児の歯を口腔内デジタルカメラおよび X 線により観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物は愛護的に扱い、また実験者が TCDD からの悪影響を受けないように配慮した。

### C. 研究結果

観察できた生存児は、対照群 15 例、30 ng/kg 群 13 例、300 ng/kg 群 11 例であった。対照群および 30 ng/kg 群では乳歯および永久歯に異常は認められなかった。これに対して、300 ng/kg 群では 7 例 (64%) に歯の欠如、円錐歯のような形態異常、正常な歯列弓から歯尖が舌側に偏位した萌出方向の異常が見出された。欠如していたのは上