

厚生労働科学研究研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価の  
基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究  
(H15-化学-002)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成17(2005)年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

化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究  
(H15-化学-002)

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 17(2005)年 4 月

## 目 次

|   |          |
|---|----------|
| I. 総括研究報告書                              |          |
| 網羅的遺伝子発現解析による毒性評価システム開発及び研究の総括<br>菅野 純  | ..... 1  |
| II. 分担研究報告書                             |          |
| 1. 生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析<br>江馬 眞         | ..... 13 |
| 2. 発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析鳴法による検出系の開発<br>北嶋 聡 | ..... 25 |
| 3. 造血毒性の発現メカニズム研究<br>井上 達               | ..... 29 |
| 4. ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関する研究<br>漆谷 徹郎 | ..... 33 |
| 5. 胸腺毒性に関わる分子メカニズムの研究<br>山中すみへ          | ..... 39 |
| 6. T細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究<br>北川 昌伸  | ..... 49 |
| 7. ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究<br>矢守 隆夫   | ..... 53 |
| 8. マウス培養細胞による毒性メカニズム研究<br>小野 宏          | ..... 57 |
| 9. 変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究<br>本間 正充       | ..... 59 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                     | ..... 67 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷                         | ..... 71 |

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

化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究

主任研究者 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

研究要旨

本研究は化学物質リスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現変化解析法を毒性学に適用するものであり、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質トキシコゲノミクスデータベースを構築することにより、インフォマティクス技術を活用した化学物質の安全性評価の為の、より迅速、正確且つ安価な評価システムを構築することを目的とする。これにより、従来、人への外挿の際に採用してきた LD<sub>50</sub> や安全係数(不確実係数)の概念が持つ不確実性を補い、毒性発現メカニズムに基づいた、より正確な毒性評価システムの作成を目指す。

今年度の研究成果としてデータベース生成研究では、小型実験動物暴露に於いて、更なる実験データの蓄積とインフォマティクスの改善に注力した。実験データについては、1つの化学物質について、投与時間4点、投与用量4段階からなる16群、合計48匹(各群3匹)のマウス肝臓(及び化合物に応じたその他の標的臓器)について網羅的遺伝子発現プロファイリング取得を行い、前年度完了した25種類に続き、今年度は30種類の化学物質についてデータを蓄積した。化学物質の選択に於いては、第一候補物質として選んだ100種類以上の化学物質の中から、今年度は、核内受容体作用物質等、体内に特異的な標的分子が存在することが明らかな物質を中心としてデータの蓄積を行った。評価システムの構築と基盤となるアルゴリズム開発に於いては、多群多層データを解析できるソフトウェアをより一層充実させるため、前年度に開発した化合物毎のデータを解析する基本ソフトウェア(16群の遺伝子発現値を3次元表示し、定型パターンに似た発現パターンを示す遺伝子群を抽出するソフトウェア(MF Surface))に続き、今年度は、評価システム開発の基盤となるアルゴリズム開発を目指し、NTTコムウェア社への委託研究により、アンスーパーバイズド(教師無し)クラスタリング解析を実現するインフォマティクスシステムの開発及び導入に成功した。遺伝子発現プロファイル生成方法に於いては、ゲノムの全遺伝子発現解析を目標とし、Affymetrix社のGeneChipシステムを引き続き用いた。前年度までに独自開発に成功した、スパイクRNAデータに基づくDNAマイクロアレイデータの品質検定法を用い、一貫したデータ品質検定を進め、データ蓄積を行った。得られたデータは、Percellome手法を適用し、順次絶対値化し、データベースとして保管

順次絶対値化し、データベースとして保管すると共に、その解析を進めた。アレイ間のばらつきに対する監視機構として開発を始めた定量的 PCR (いわゆる TaqMan PCR) については、測定対象とする遺伝子を約 300 種類選び、測定用の primer の最適化を開始し、100 種類について最適化を終了し、Percellome 手法を取り入れた独自の定量的 RT-PCR システムとして完成させるに至った。基盤研究では、<標的臓器別解析>として生殖毒性についてラットでしか検討されていない DBTCI による着床阻害効果のマウスの実験系への適用性を進め、前年度に検討し決定した条件 (3.8mg/kg を妊娠あるいは偽妊娠 4 日目に単回投与し、6 時間後の子宮をサンプルとする) に於いて、網羅的遺伝子発現解析を実施した。発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析として、マウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験技術基盤整備を行い、モデル遺伝子改変マウス胚を用いたマイクロアレイ解析の妥当性検討等を行った。造血毒性の発現メカニズム研究では、ベンゼン暴露マウスの造血器系で発現する造血前駆細胞特異的プロファイリングに注目し、これらの中からバイオマーカーとしての robustness のある候補遺伝子の組合せの試行的な抽出を行った。また、それらの遺伝子の p53 欠失 (p53-KO) マウスに於ける発現態様についても比較検討した。酸化ストレス消去系としてのチオレドキシシン (Trx) 遺伝子の遺伝子改変動物に於ける遺伝子発現背景については基礎的検討を終了した。ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関して、酸化ストレス応答の鍵となる分子である ASK1 欠損マウスを用いて酸化ストレスシグナルを解析し、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、肝臓及び脳に於いて ASK1 欠損マウスと野生型マウスの間に発現の差のある遺伝子群を抽出した。また、MPTP 投与による実験的 Parkinson 病の感受性が ASK1 欠損マウスと野生型マウスの間で異なる可能性が見出され、この現象と関連する候補遺伝子を抽出した。胸腺毒性に関わる分子メカニズム研究に関して、免疫毒性を有するといわれているダイオキシシン等の影響解析を中心として、*in vivo* 投与による胸腺細胞への影響と併せて、*in vitro* におけるリンパ球 T 細胞への影響を調べ、*in vivo* 投与影響については網羅的遺伝子発現解析も実施した。T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究に関して、コルチコステロイドの影響解析を開始した。<個体差、種差に関わる解析>として、ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究について、本年度は、毒性作用メカニズムが明らかではない ziram が、がん細胞パネルを用いたプロファイル解析で活性酸素発生作用を持つことが示唆され、今後網羅的遺伝子発現解析を実施する対象として取り上げることとした。また、RXR を介した内分泌かく乱性が指摘されている TBT (Tributyltin) による遺伝子発現変化を前立腺癌細胞株 PC-3 を用いて Percellome 手法により網羅的に評価し、TBT により変動する遺伝子群の候補を抽出することに成功した。マウス培養細胞による毒性メカニズム研究では、マウスの系統による遺伝子発現応答の違いについて検討するために、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を材料とすることとし、*in vivo* における  $\text{Cd}^{2+}$  による毒性作用の

違いが、*in vitro* である MEF においても再現されるかどうか検討し、細胞増殖阻害の IC50 値が、C3H/He マウス細胞では 4.1 $\mu$ M、DBA マウス細胞では 5.7 $\mu$ M となることを明らかとした。遺伝毒性メカニズム解析に於いて、アルキル化剤及び多環芳香族化合物などの遺伝子傷害性物質7化合物、非遺伝子傷害性物質としてフェノバルビタールとエタノールをマウスに投与し、肝臓に於ける遺伝子発現変化を経時的に GeneChip を用いて解析した。遺伝子傷害性物質にのみ共通して発現変化する遺伝子群を絞り込み、約 30 種類の遺伝子を抽出することができた。これらは、遺伝子傷害性をスクリーニングするための候補遺伝子としての有用性が期待される。

#### 分担研究者

江馬眞 国立医薬品食品衛生研究所  
総合評価室長  
北嶋聡 国立医薬品食品衛生研究所  
毒性部主任研究官  
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  
漆谷徹郎 国立医薬品食品衛生研究所  
大阪支所室長  
山中すみへ 東京歯科大学衛生学客員教授  
北川昌伸 東京医科歯科大学助教授  
矢守隆夫 癌研究会癌化学療法センター  
分子薬理部部長  
小野宏 (財)食品薬品安全センター  
秦野研究所所長  
本間正充 国立医薬品食品衛生研究所  
変異遺伝部室長

#### A. 研究目的

本トキシコゲノミクス研究は、化学物質リスク評価の基盤整備として、網羅的な遺伝子発現変化解析法を毒性学に適用するものであり、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質トキシコゲノミクスデータベースを構築することにより、インフォマティクス技術

を活用した化学物質の安全性評価の為の、より迅速、正確且つ安価な評価システムを構築することを目的とする。これにより、従来、人への外挿の際に採用してきた LD<sub>50</sub> や安全係数(不確実係数)の概念が持つ不確実性を補い、毒性発現メカニズムに基づいた、より正確な毒性評価システムの作成を目指す。

#### B. 方法

本研究の目的のために約 100 化学物質を選択し、3年間の研究期間に於いて小型実験動物(マウスを主体とする)を用いた暴露実験を行い、肝を主標的として発現プロファイルを可能な限り多数の遺伝子について採取する。これらのデータを逐次、電子ファイリングし、遺伝子プロファイルデータベースを構築する(データベース生成研究)。平行して基盤研究を実施し、既存知識と基盤研究により得られる知識を合わせたインフォマティクスを構築し、既知機能クラスタを基にした予測システムを形成する。また、同時にインフォマティクス情報から未知機能クラスタを抽出し、その機能を検討しデータベースに還元する事で、その機能と精度を継続的に向上させて行く。

## データベース生成研究：

小型実験動物暴露：化学物質は原則的に経口投与とし、初期設定値として、単回投与(2、4、8、24時間後検体採取)実験を主体として、必要に応じて反復投与実験を追加しつつ実施する。投与用量は4段階を設定する(16群構成、各群3匹、1実験48匹規模)。mRNAは個体ごとに採取し、原則的に個体別に遺伝子発現プロファイルを得る(群ごとには行わない)。インフォマティクスの検討を進めた段階で、群数及び使用動物数を段階的に絞り込み、遺伝子プロファイルデータベースの構築を効率化する。今年度は30化合物を目標に単回投与のデータベース構築を行った。

化学物質の選択：化審法既存化学物質等約2万物質の内、製造量、暴露量、暴露形態等を加味して、毒性メカニズムに関する既知情報からカテゴリー化が可能な物質群については、その代表的物質を優先的に選択する。3年間で約100化合物を選択する。

評価システムの構築：4用量、4時点からの遺伝子発現情報を絶対量表示による標準化手法(Perccellome)により数値表示し、測定全遺伝子から成る多層データ(いわゆる“mille-feuille”データ)を得る。ここでは、主任研究者らの開発した絶対量表示による標準化手法により、発現値を線形表示(ゼロ点を含む)することが出来るため、遺伝子欠失マウスのデータが無理なく表示、解析可能となる長所がある。また、絶対量表示と同時に標準化(絶対標準化)が行われるため、複数の実験間での遺伝子発現値の直接比較が可能であるという大きな利点がある。それらについて、ア

ンスーパーバイズド(教師無し)クラスタリング解析を主体に生体反応のクラスタ解析を行う。今年度はクラスタ解析に必要なソフトウェアの開発を行う。

## 評価システム開発の基盤となるアルゴリズム開

発：毒性評価システムを開発するにあたり、その基盤となるアルゴリズム開発に必要なハードウェア整備を行う。

## 遺伝子発現プロファイル生成方法：ゲノムの全遺伝

子発現解析を目標とするが、(1)最も安定して(再現性)、(2)感度よく(SN比)用量相関性をもって、(3)可能な限り多数の遺伝子の発現プロファイルが獲得できる技術を採用する。現段階では、DNAマイクロアレイ技術が最適と考えられ、具体的にはAffymetrix社のGeneChipシステムを用いる。アレイ間のばらつき及び定量性に対する監視機構として、定量的PCR(いわゆるTaqMan PCR)による検討を実施する。定量的PCRに関しては、300種類の遺伝子発現測定を可能とすることを目標とし、今年度は最適なprimerの設計に目処をつけることとした。

基盤研究(探索的研究)：以下の各個別研究を実施し、基盤研究とする。

- ・ ジブチル錫生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析(江馬)
- ・ サリドマイドによる血管新生、TNF- $\alpha$ 産生修飾を指標とした発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析(北嶋)
- ・ 造血毒性の発現メカニズム研究(井上)
- ・ ASK1ノックアウトマウスに於けるストレス応答

#### シグナル系の解析研究(漆谷)

- ・ アリル炭化水素受容体及びグルココルチコイド受容体を介する胸腺毒性に関わる分子メカニズム研究(山中)
- ・ T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究(北川)
- ・ ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究(矢守)
- ・ 系統差に主眼を置いたマウス培養細胞による毒性メカニズム研究(小野)
- ・ 典型的な遺伝毒性物質(ジエチルニトロサミン、ジプロピルニトロサミン、エチルニトロソウレアを含む数化合物)に関する、多臓器での遺伝子発現データを蓄積しつつ実験手技を含めた標準的プロトコールの検討を行う(本間)

#### (倫理面への配慮)

本研究では、①ヒトの臨床検体、②相手方の同意、協力や社会的コンセンサスを必要とする研究課題又はアンケート調査等を行う研究課題、③生命倫理・安全対策に関して留意すべき研究、を含んでいない。実験動物の飼育・屠殺にあたっては、各々の研究者の所属する機関の内規定に則り適切に行った

### C. 結果

#### データベース生成研究

##### 小型実験動物暴露

初年度に実施した安定したデータの出る暴露システム及び遺伝子発現プロファイル生成システム構築を更に進めた。暴露システムのポイントとして重視している、実験マウスの搬入飼育、化学物質投与溶液調製、サンプリング位置に加え、肝以外の臓器(肺、精巣等)の適切な取り扱いを検討し、

RNA 分解防止溶液の肺注入を始めとする詳細且つ厳密なプロトコールを完成するに至った。その結果、例えばサーカディアンリズムに則って発現変動する遺伝子について実験間での相違の無い極めて質の高いデータを得ることが出来るようになっていく。遺伝子発現プロファイル生成システムとしては、我々の開発した絶対量化システムを用いた品質管理システムを完成するに至り、発現値のばらつきが個体差を反映するものか、データの質の低さによるものかを判定することが可能となった結果、質に問題があるデータは発現データ測定をやり直すことで全体として高品質のデータを得ることが可能となっている。本年度実施し、データが得られた化合物は、30種類であり、2年間で55種類となっている。

#### 化学物質の選択

本研究で目標としている予測システムの構築に当たり、我々は、マウス肝臓を標的臓器に定めている。そこで、肝臓に対する作用を有する物質を中心に化学物質の選択を行った。第一候補物質として100種類以上の化学物質を選び、今年度は核内受容体作用物質等、体内に特異的な標的分子が存在することが明らかな物質を中心としてデータの蓄積を行った。

#### 評価システムの構築と基盤となるアルゴリズム開発

H16 年度に開発したアンスーパーバイズド(教師無し)クラスタリング解析を実際のトキシコゲノクス実験データに適用し、同様の発現パターンを呈する遺伝子群(クラスタ)を多数抽出し、その詳細を評価した。その結果、生体の日内変動リズム



(概日リズム)を司る遺伝子群が同一クラスタに集まるなど、アルゴリズムの高い性能が実証されたが、一方で生物ノイズと考えられるランダムな発現パターンを示す遺伝子が多い実験の場合には、約4万もの全遺伝子を一気にクラスタリング解析に投入すると、生物ノイズが糊(共通要因)となって本来関係のないクラスタ同士を結合させてしまう危険があることが判明した。このため、絶対値化データの利点を生かし、細胞1個当たり1コピー以下相当の発現量しか示していない遺伝子データを予め除外しクラスタリング解析を行うこととし、より偽クラスタの少ない解析結果を得ることに成功した。また、クラスタリング前に除外されてしまう遺伝子の中にもノイズではなく有意な発現を示すものが多数存在するが、これらはクラスタリング計算後に、個々のクラスタの特徴パターンとの類似度を算出し、閾値以上の類似性を有する場合は該当クラスタに追加することで、偽陰性を回避できることも確認した。

クラスタリング解析結果は、1クラスタが幾つかの遺伝子を含む1つのリストとして得られ、通常、肝臓において約1,000クラスタ、すなわち約1,000のリストとして得られるが、これらを1つずつ閲覧し意味付けするとなると、長大な時間を要する事から、クラスタリング解析結果を評価するためのアルゴリズム及びアプリケーションソフトウェアを開発することとした。開発方針としては、1)遺伝子の既存情報との結合、及び2)映像化(グラフ化)を試みた。

#### 1) 遺伝子の既存情報との結合

Gene Ontology Project (<http://www.geneontology.org/>)等のキーワードや既存知識情報を取り込み、得られたクラスタ(遺伝子リスト)との論理積をとって自動

集計するアプリケーションソフトウェアを作成した。これにより、個々のクラスタがどのような機能遺伝子をいくつ含んでいるかといった概略情報が簡便に得られるようになった。

#### 2) 映像化(グラフ化)

従来使われている主成分解析等により疑似的な2次元もしくは3次元空間に各遺伝子やクラスタを表示するなどの検討を行ったが、遺伝子やクラスタを意味する光点はそれなりに分かれるものの、グラフ数値軸の意味づけが間接的なものになるため、単なるデモンストレーション以上の意味が見出せなかった。そこでクラスタリングに用いた類似度に着目し、XYZの各軸に特徴的な発現パターンを割り当て(例えば早期発現、晩期発現、概日変動など)、それらとの類似度を座標値とすることで、各クラスタが分離して図示させる方法を採用した。その結果、グラフ空間内での位置が生物学的な意味を持つため、発現パターンの特徴を視覚的に把握できるようになった。

今後のデータ増に伴う解析の効率化に関する開発の方向性が定まりつつあり、また、データのインターネット上での公開に向けた基本構想についても展望が得られる段階に達した。

### 遺伝子発現プロファイル生成方法

ゲノムの全遺伝子発現解析を目標とし、Affymetrix社のGeneChipシステムを用いたPercellome手法を前年度までに開発し、一貫したデータ品質検定を進め、データ蓄積を行った。得られたデータは、順次絶対値化し、データベースとして保管すると共に、解析を進めた。アレイ間のばらつきに対する監視機構として開発を始めた定量的PCR(いわゆるTaqMan PCR)については、測定対

象とする遺伝子を約300種類選び、測定用の primer の最適化を開始し、100 種類について最適化に成功し、Perccellome 手法を取り入れた独自の定量的 RT-PCR システムとして完成させるに至った。尚、GeneChip によるデータと、定量 RT-PCR によるデータの一致率が9割程度と高いことが明らかとなった。

### 基盤研究

生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析(江馬):ラットでしか検討されていない DBTCI による着床阻害効果のマウスの実験系への適用性を前年度に検討し、決定した条件(3.8mg/kg を妊娠あるいは偽妊娠 4 日目に単回投与し、6 時間後の子宮をサンプルとする)を用い、網羅的遺伝子発現解析を実施した。黄体の確認できる妊娠 4 日の DBTCI 単回投与 6 時間後の子宮より RNA を調整し、遺伝子発現解析を行った。また、DBTCI による着床阻害効果の子宮側因子の解析のために、偽妊娠動物を作製し、DBTCI の子宮単独に与える影響についても同時に検討した。

その結果、着床時にその遺伝子発現が著しく誘導される遺伝子のうち、免疫寛容や細胞外マトリクスタンパク、胎児発生に関連するキナーゼなどのいくつかの遺伝子誘発を DBTCI が阻害している可能性が示唆された。

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析(北嶋):マウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験技術基盤整備を行い、モデル遺伝子改変マウス胚を用いたマイクロアレイ解析の妥当性検討等を行った。すなわち、マウス胎生 7.5-9.5 日のステージに焦点を絞り、1)各ステージの胚 1 匹当たりの DNA 量、total RNA 量の算出、2)遺伝子発現量の絶対値化に必要な

spike factor の決定、3)モデル遺伝子改変マウス胚を用いた、そのマイクロアレイ解析の妥当性の検討、4)各ステージの各遺伝子の網羅的な経時変化のデータを得ること、を目的に検討した。

上記全ての項目は基本的には成功し、催奇形性物質の投与によるマウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験に向けた技術基盤は整備できたものと考えられた。

造血毒性の発現メカニズム研究(井上):ベンゼン暴露マウスの造血器系で発現する造血前駆細胞特異的プロファイリングに注目し、これらの中からバイオマーカーとしての robustness のある候補遺伝子の組合せの試行的な抽出を行った。また、それらの遺伝子の p53 欠失(p53-KO)マウスに於ける発現態様についても比較検討した。酸化ストレス消去系としてのチオレドキシシン(Trx)遺伝子の遺伝子改変動物における遺伝子発現背景については基礎的検討を終了した。

ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関する研究(漆谷):酸化ストレス応答の鍵となる分子である ASK1 欠損マウスを用いて酸化ストレスシグナルを解析し、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、肝臓及び脳において ASK1 欠損マウスと野生型マウスの間に発現の差のある遺伝子群を抽出した。また、MPTP 投与による実験的 Parkinson 病の感受性が ASK1 欠損マウスと野生型マウスの間で異なる可能性が見出され、この現象と関連する遺伝子候補を抽出した。

胸腺毒性に関わる分子メカニズムの研究(山中):免疫毒性を有するといわれているダイオキシシン等の

影響解析を中心として、*in vivo* 投与による胸腺細胞への影響と併せて、*in vitro* におけるリンパ球T細胞への影響を調べ、*in vivo* 投与影響については網羅的遺伝子発現解析も実施した。

マウスへのダイオキシシン 5  $\mu$ g/kg 及び 20  $\mu$ g/kg、あるいは塩化第二水銀 100  $\mu$ g/kg の単回腹腔内投与で胸腺の萎縮がみられ、特に 20  $\mu$ g/kg 投与では 10 日目に顕著な萎縮を認め、組織像でも皮質のリンパ球に変性や消失がみられた。また免疫染色でも皮質のリンパ球や髄質の一部の幼弱リンパ球で CD-4 及び CD-8 alpha の陽性細胞の増加がみられた。さらに胸腺の GeneChip 解析でもダイオキシシン投与で Ahrr, Cyp1a1, Cyp1b1 などの遺伝子発現に変化があった。一方、正常リンパT細胞やヒト急性リンパ芽球性白血病T細胞の MOLT-3 を用いた *in vitro* の検索では、水銀との接触で CD-25(インターロイキン-2 レセプター(IL-2 $\cdot$ R))陽性細胞の増加や、ダイオキシシンとの接触で CD-8 陽性細胞の増加がみられた。またダイオキシシンの低濃度・長期接触後に水銀と接触で水銀の影響が増強されるなどダイオキシシンの免疫機能への影響や修飾作用を示唆する結果を得た。

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究(北川):コルチコステロイドの陽性対照としての影響解析を開始した。T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析するための手掛かりとして、胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているコルチコステロイドの影響を検討した。薬剤はマウスに *in vivo* 腹腔内投与し、投与マウスの胸腺細胞における遺伝子発現プロファイルの投与後早期における変化を経時的に解析した。T 細胞機能の低下が宿主個体に与える全体的影響

をみる指標として、リステリア感染に対する宿主反応についても検討した。

ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究(矢守):本年度は、毒性作用メカニズムが明らかではない ziram が、がん細胞パネルを用いた検討で活性酸素発生作用を持つことが示唆され、今後網羅的遺伝子発現解析を実施する対象として取り上げることとした。また、内分泌かく乱性が指摘されている TBT (Tributyltin)による遺伝子発現変化を前立腺癌細胞株 PC-3 を用いて Percellome 手法により網羅的に評価し、TBT により変動する遺伝子群の候補を抽出することに成功した。

マウス培養細胞による毒性メカニズム研究(小野):マウスの系統による遺伝子発現応答の違いについて検討するために、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を材料とすることとし、*in vivo* における Cd<sup>2+</sup>による毒性作用の違いが、*in vitro* である MEF においても再現されるかどうか検討し、細胞増殖阻害の IC<sub>50</sub> 値が、C3H/He マウス細胞では 4.1 $\mu$ M、DBA マウス細胞では 5.7 $\mu$ M となることを明らかとした。

変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究(本間):アルキル化剤及び多環芳香族化合物などの遺伝子傷害性物質7化合物、非遺伝子傷害性物質としてフェノバルビタールとエタノールをマウスに投与し、肝臓における遺伝子発現変化を経時的に GeneChip を用いて解析した。遺伝子傷害性物質にのみ共通して発現変化する遺伝子群を絞り込み、約 30 種類の遺伝子を抽出することができた。これらは、遺伝子傷害性をスクリーニングするための候補遺伝子としての有用性が期待される。

## D. 考 察

### データベース生成研究

本年度は、本研究で目標としている 100 化合物のうち、30 化合物についてデータ取得を終了し、前年度とあわせ、55 化合物のデータを蓄積することに成功した。これに加え、データ品質管理システムの構築、データ解析を可能とするソフトウェア、ハードウェアの整備を更に進め、アンスーパーバイズド(教師無し)クラスタリング解析を実現するインフォマティクスシステムの開発に目処をつけた。今後更にデータの蓄積を進めると共に、アンスーパーバイズドクラスタリング解析を基本に据えたデータ解析を進め、毒性予測精度を向上させていく予定である。

### 基盤研究

基盤研究は上記データベース生成研究により得られる未知の遺伝子発現プロファイルの検証に寄与すべく実施しているものである。前年度は、各研究の網羅的遺伝子発現解析への適用性の検討を主眼に置いて進め、今年度はその結果を受けて、網羅的遺伝子発現解析データの蓄積を始めた。今後、得られたデータの解析を進めると共に、更にデータ蓄積を進め、データベース生成研究による毒性予測精度向上に役立てる予定である。

## E. 結 論

本研究の目的である化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスデータベース構築に向けて、今年度はデータベース生成研究に於いて、更なる実験データの蓄積とインフォマティクスの改善に注力し、さらに 30 種類の化学物質についてのデ

ータを蓄積した。評価システムの構築と基盤となるアルゴリズム開発に於いては、アンスーパーバイズド(教師無し)クラスタリング解析を実現するインフォマティクスシステムの開発及び実装に成功した。アレイ間のばらつきに対する監視機構として開発を始めた定量的 PCR(いわゆる TaqMan PCR)については、測定対象とする遺伝子を約 300 種類選び、測定用の primer の最適化を開始し、100 種類について最適化に成功し、Percellome 手法を取り入れた独自の定量的 RT-PCR システムとして完成させるに至った。平行して進めた基盤研究に於いては、前年度に設定した各分担研究に於ける網羅的遺伝子発現解析に最適な実験条件に基づいて発現解析を行い、発生影響を有する物質の投与によるマウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験に向けた技術基盤の整備に成功するなどの成果が上がった。以上、研究期間2年目の今年度は、順調なデータ蓄積が進んだと同時に、蓄積されたデータを活用した毒性評価システム開発に向けた大きな進捗が得られたと判断している。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

原著

Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. Mech Dev. 2004

Dec;121(12):1443-53.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T. Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol.* 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:12-6.

Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Jul;91(3):121-9.

Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jun;229(6):494-502.

Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol.* 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.

Asano, K., Ono, A, Hashimoto, S, Inoue, T, and Kanno, J (2004) Screening of endocrine

disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor.

*Anal Sci.* 2004 20, 611-616

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology.* 2004 Jan 15;195(1):19-29.

#### 総説 単行本等

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol.23 No.6 2004685-693、株式会社秀潤社

菅野 純:医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、月刊薬事、2004年5月, Vol.46, No.6 株式会社じほう

菅野 純:化学物質の毒性 化学と教育 52巻 5号『化学物質とリスク評価』2004年 302-305 (社)日本化学会

## 2. 学会発表

Jun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

Jun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

菅野 純 「前向き」Toxicogenomics、第88次日本法医学会総会、2004年6月2~4日、旭川

高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕美子、「Notchリガンド D113は Mesp2の欠損による体節形成と前後パターン形成の異常を回復する」、日本発生生物学会第37回大会、2004年6月4~6日、名古屋

平林容子、壺井 功、菅野 純、井上 達、「造血器における細胞間ギャップ結合の病理-コネクシン欠失による造血障害と実験白血病高甘感受性について-」、第93回日本病理学会総会、2004年6月9~11日、札幌

J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu, Y Kodama, K Igarashi ,  
PHENOTYPE-INDEPENDENT

TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME” AND “MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会(特別講演)、2004年7月6~8日、大阪

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、「日内変動遺伝子群プロファイルの解析」第31回日本トキシコロジー学会学術年会(口演)、2004年7月6~8日、大阪

J Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi ,  
TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME” AND “MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM, 10<sup>th</sup> International Congress of Toxicology, 11-15 July, 2004; Tampere, Finland

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日~10月1日、福岡

菅野 純、藤井寿一、菅野 仁、相崎健一、「解糖系障害で誘導される赤芽球アポトーシスと p53 の関連、p53 involvement in

glycolysis disorder-induced apoptosis of erythroid cell」第 63 回日本癌学会学術総会、2004 年 9 月 29 日～10 月 1 日、福岡

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama  
"Percellome" Analysis of Hormonally Active Compounds. Toxicogenomics International Forum 2004, 12-13 October, 2004

五十嵐勝秀、高橋芳樹、菅野 純、内分泌かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対する作用、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

中津則之、相崎健一、小野 敦、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野 純、マウス肝臓におけるダイオキシン類による遺伝子発現変動解析、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛真友、菅野純、吉川裕之、加藤茂明、アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

高橋芳樹、五十嵐勝秀、菅野 純、マウス胎児神経幹細胞の維持における DNA メチル化の役割、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年

12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

渡辺裕介、小久保博樹、宮川-富田幸子、五十嵐勝秀、菅野純、相賀裕美子、マウス心臓における Notch1 シグナリングの機能解析、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama,  
"Percellome" method application to the analysis of hormonally active compounds and its possible contribution to the ecotoxicogenomics. 環境ホルモン学会第 7 回研究発表会、2004 年 12 月 15 日、名古屋

菅野 純、相崎健一、小野 敦、中津則之、児玉幸夫、五十嵐勝秀、Percellome 手法を用いたトキシコゲノミクス研究、日本薬学会関東支部第 29 回学術講演会、2005 年 1 月 18 日、つくば

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)

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名:化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究  
分担研究課題名:生殖毒性に関わる毒性発現メカニズムの解析

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長  
研究協力者 広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

### 研究要旨

本研究は、生殖障害を引き起こす物質のスクリーニングや毒性予測のための因子同定の足がかりとすることを目的としており、平成 16 年は、ジブチルスズ(DBTCl)による着床阻害に於ける母体側の要因としての子宮の機能低下の発現機序を明らかにすることを計画した。そこで、DBTCl によるマウス着床時期の子宮の遺伝子発現状況を検討するため、黄体の確認できる妊娠 4 日に於ける DBTCl 単回投与 6 時間後の子宮より RNA を調整し、遺伝子発現解析を行った。また、DBTCl による着床阻害効果の子宮側因子の解析のために、偽妊娠動物を作成し、DBTCl の子宮単独に与える影響についても同時に検討した。その結果、着床時にその遺伝子発現が著しく誘導される遺伝子のうち、免疫寛容や細胞外マトリクスタンパク、胎児発生に関連するキナーゼなどのいくつかの遺伝子誘発を DBTCl が阻害している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

生殖毒性を示す環境化学物質の中でも、有機スズ化合物はプラスチック等の可塑剤として大量に生産されており、ジブチルスズ(DBTCl)はそのなかで最も多く使用されている化合物であり、巻き貝にインボセックスを惹起するトリブチルスズの主要な代謝物としても知られている。ジブチルスズは巻き貝のインボセックスは惹起しないが、ラットに対しては強い生殖発生毒性を示す。我々は、ジブチルスズをラットの妊娠中期に投与したときには胎児奇形を誘発し、また、ラットの妊娠初期に投与したときには着床阻害を起こすことを報告した。また、ラットに於けるジブチルスズによる着床阻害は子宮の機能の低下、すなわち、子宮の脱落膜形成の抑制によって起こることを示唆した。

本研究に於いては、このような典型的な生殖毒性を示す物質としてジブチルスズを選択し、ジブチルスズによる着床阻害に於ける母体側の要因としての子

宮の機能低下の発現機序を明らかにすると共に、生殖障害を引き起こす物質のスクリーニングや毒性予測のための因子同定の足がかりとすることを目的とする。

### B. 研究方法

ラットでしか検討されていない DBTCl による着床阻害効果のマウスの実験系への適用性に関して検討するため、C57BL/6Cr マウスの着床時期に DBTCl を投与し、子宮の遺伝子発現解析を行った。

被験物質:Dibutyltin dichloride (DBTCl)(東京化成工業株式会社, D 0223, Di-n-butyltin Dichloride, ロット GG01)を用いた。

使用動物:マウス(C57BL/6Cr Slc: 日本エスエルシー)を、雄は 9 週齢、雌は 7 週齢で入手し、入手日を含め 7 日間の検疫を行った後に使用した。

投与:



被験物質の調製:調製は投与当日に行った。溶解を容易にするため、秤量前に乳鉢で細粒化した。秤量可能な適量を量り取り、J媒体(オリーブ油, 和光純薬工業株式会社、150-00276、ロット WAE5371、PKL4490)に溶解して、いったん高濃度液を作製した後、さらに媒体で希釈して所定濃度の溶液を作製した。使用ロットの純度(99.5%)から、実質のDBTCl量が所定濃度となるように換算した。

投与経路及び投与方法:投与経路は経口投与とし、1 mLのガラス製注射筒及びマウス用経口ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は10 mL/kgとし、個体別に投与日の体重に基づいて算出した。

試験及び観察方法:雌を、雄と1対1で夜間に同居させ、翌朝膈栓あるいは膈垢中に精子が認められた場合に交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。妊娠あるいは偽妊娠4日目にDBTCLを3.8 mg/kgあるいは媒体のみを投与した。各群は各々4例ずつを確保し、子宮の摘出及びRNAの分離に供した。

#### 群構成

| 群   | 投与量(mg/kg) | 妊娠状態 |
|-----|------------|------|
| I   | 0          | 妊娠   |
| II  | 3.8        | 妊娠   |
| III | 0          | 偽妊娠  |
| IV  | 3.8        | 偽妊娠  |

#### RNAの分離精製:

投与6時間後、黄体の有無を確認し、確認された動物の右子宮を分離後すみやかにRNAlater (Ambion社)に浸漬し、RNaseを不活化した。4℃、一晩静置した後、RNA抽出操作まで-80℃にて保存した。RNAlaterを除いた後、RNeasy kit(キアゲン社)添付のRLT bufferを用いて組織破碎液を調製し、DNA定量用蛍光試薬であるPicogreenを用いて、破碎液中のDNA量を測定した。DNA量に応じて、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5種類のmix)を添加し、TRIzolを用いて粗抽出した液をRNeasy kitを用いて全RNA精製した。得た全RNAの0.2 µgを電気泳動し品質を確認した。

#### GeneChip解析:

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全RNA 4~5 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を調製した。得たcDNAをもとに第二鎖を合成し、二本鎖DNAとした。次にT7 RNAポリメラーゼ(ENZO社)を用い、ピオチン化CTP, UTPを共存させつつcRNAを合成した。二本鎖DNA及びcRNA精製にはアフィメトリクス社のGeneChip sample cleanup moduleキットを用いた。得られたcRNAを300~500bpとなるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加しGeneChipターゲット液とした。GeneChipはMOE430 2.0を用いた。ハイブリダイゼーションは45℃にて18時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。

データ解析に際しては、Spike RNAのシグナル値を元に、各遺伝子のシグナル値をDNA当たりの値に変換した値を用い解析を行った。データ解析に用いたソフトウェアはGeneSpring (Silicon Genetics社)を主に用いた。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用しないしは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。

#### C. 研究結果

各群の4例から得られたデータセット全体を群内でクロスバリデーションを行い、最適な3つのデータセットを解析に用いた。

DBT投与により有意(t検定;P<0.05)に1.5倍以上発現誘導が見られた遺伝子を表1に示した。妊娠マウスによる場合と偽妊娠マウスによる場合でそれぞれ約20の遺伝子が1.5以上誘導された。機能の知られたものとしては、妊娠マウスの場合は、adipsin、carbon anhydrase3, Fatty acid protein4, cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1などが、偽妊娠の場合はXPA binding protein 1等が2倍以上

誘導された。しかし、妊娠及び偽妊娠で共通して誘導された遺伝子は、unknown のものも含めて存在しなかった。

次に、DBT 投与により有意(t検定;  $P < 0.05$ )に1.5倍以上発現が抑制された遺伝子を表2に示した。妊娠では約120遺伝子、偽妊娠では約60遺伝子の発現抑制が認められた。50%以下に発現抑制の見られた遺伝子で機能の知られたものとしては、妊娠で RAB14 (member RAS oncogene family)、kinesin 2、偽妊娠で aminolevulinic acid synthase 1 が認められた。妊娠及び偽妊娠で共通に抑制された遺伝子としては、kinesin family member 20A 及び一つの unknown 遺伝子 (UniGene コード: Mm.214504: Translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog a (yeast) (Timm8a)) の2つであった。

次に、着床時期のDBTの影響をより明確にするために、まず対照群の妊娠子宮(I群)と偽妊娠子宮(II群)の遺伝子発現を比較した。その結果、偽妊娠に対して妊娠の子宮のDNAあたりの遺伝子発現量は全体で約1.5倍(中央値でも1.56倍)増加していることが判明した。これは、妊娠4日の子宮採取時には、受精卵の着床刺激による子宮内膜の脱落膜や胎盤形成など着床準備がすでに始まりつつあることを示唆していると考えられ、この時期には子宮側の遺伝子発現パターンが、妊娠と偽妊娠で大きく異なっていると考えられた。そこでDBTの着床阻害に対する影響を検討するために、偽妊娠に対して妊娠状態で変動している遺伝子のうち、DBT増加投与により逆方向に作用する遺伝子の検索を試みた。

偽妊娠に比べて、妊娠により遺伝子発現の全体がすでに1.5倍増加しているため、妊娠により大きく変動している遺伝子の抽出を行った。その結果、妊娠で10倍以上誘導している遺伝子は約260遺伝子あった。そのうち、DBTにより妊娠状態で1.5分の1(約66%以下)にその発現が抑制される遺伝子は、約30遺伝子あった(表3)。そのうち機能の知られているものとしては、tryptophan 2,3-dioxygenase、insulin-like growth factor binding protein 2、tenascin-C、Kinesin family member 20A、maternal embryonic leucine zipper kinase 等が認められた。反

対に偽妊娠に対して妊娠で1.5分の1以下に抑制された遺伝子、約30のうち、DBT投与により誘導(1.5倍以上)されている遺伝子は1つあったが、この遺伝子は unknown 遺伝子 (UniGene コード: Mm.173292) で発現量も極めて低いものであった。

#### D. 考察

当初は、受精卵の有無にかかわらず、DBTによる着床阻害作用を示す子宮側の因子の解析を目的に、妊娠及び偽妊娠ラットに於けるDBTによる子宮の遺伝子発現への影響の解析を行ったが、両者で共通して有意に誘導された遺伝子はなく、抑制された遺伝子も Unknown を含めて2つしかなかった。しかし、妊娠4日の子宮採取時の遺伝子発現は偽妊娠と妊娠で大きく異なっており、すでに着床に向けた準備が始まっていることが判明した。そこで、この着床準備に対して変動している遺伝子のうち、着床阻害に対する影響因子の抽出のためには、DBT投与により逆方向に変動する遺伝子の解析を行うこととした。その結果、tryptophan 2,3-dioxygenase、insulin-like growth factor binding protein 2、tenascin-C、Kinesin family member 20A、maternal embryonic leucine zipper kinase 等の遺伝子が、DBT投与により着床準備を阻害する遺伝子の候補として抽出された。tryptophan 2,3-dioxygenase は、別名 Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) でもあり、胎盤組織中に強発現しており、トリプトファン (Trp) からキヌレニンへの代謝により、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T cell 及びナチュラルキラー (NK) 細胞の増殖を抑制し免疫寛容状態を作り出すと考えられている他、このIDOの阻害剤である1-メチル・トリプトファンを、CBA(♀)とC57BL/6(♂)の異系間交配の妊娠マウスに投与することにより、胎盤周辺の炎症及び流産を誘導することが知られている。また、インスリン様増殖因子(IGF)は、性ステロイドと協調して子宮内膜の細胞増殖に作用している。その他、tenascin-C は、tenascin-R 等とともに細胞外マトリックス蛋白の一つである他、Kinesin family member 20A は Ras associated protein である RAB6A と相互作用して細胞増殖や維持にかかわるとされ、maternal embryonic leucine zipper kinase は

着床前の胚の発達に重要な役割をしていることが指摘されている。

以上の結果は、DBT は、着床準備のための免疫寛容や内膜細胞の増殖作用、着床前胎児発生にかかわる遺伝子を抑制することにより、着床阻害を引き起こしている可能性を示唆したものと考えられた。しかし、依然この作用が、DBT 等により直接引き起こされたものか、あるいは偽妊娠ラットでの脱落膜形成阻害と共に示された血清プロゲステロン量の抑制による二次的なものであるかは今後の課題である。

## E. 結論

ジブチルスズ(DBTCI)による着床阻害に於ける母体側の要因としての子宮の機能低下の発現機序を明らかにすることを目的として、DBTCI によるマウス着床時期の子宮の遺伝子発現状況を検討した結果、着床時にその遺伝子発現が著しく誘導される遺伝子のうち、免疫寛容や細胞外マトリクスタンパク、胎児発生に関連するキナーゼなどのいくつかの遺伝子誘発をDBTCI が阻害している可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Emm, 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

Emm, 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.

Fukuda, N., Ito, Y., Yamaguchi, M., Mitsumori, K., Koizumi, M., Hasegawa, R., Kamata, E. and Emm, M. (2004) Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn

rats. Toxicol. Lett., 150, 145-150.

Fukui Y, Emm 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. (Kyoto), 44,172-177.

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M and Emm 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, Emm M. (2004) Comparative toxicity study of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in newborn and young rats. Cong. Anom. (Kyoto). 44, 204-214.

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、国立医薬品食品衛生研究所報告 122: 56-61

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

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6報)－第14回 OECD  
高生産量化学物質初期評価会議(2002年パ  
リ)、*化学生物総合管理学会誌*、1, 46-55.

## 2. 学会発表

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. "Developmental toxicity study of ultraviolet light absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-benzotriazole in rats." *25th Annual Meeting of The American College of Toxicology, Palmsprings CA U.S.A.*, November 7-10, 2004.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J, Ema M. "Review of reproductive and developmental toxicity induced by organotins in aquatic organisms and experimental animals." *24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs.* Berlin, September 6-10, 2004

Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hayashi Y. "Development of genotoxicity predicting QSAR system for registered and exiting industrial chemicals in Japan." *11th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland*, July 11-15, 2004.

Ema M" 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.* Iran, September, 2004

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. "Developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy." *The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, U.S.A.*, March 6-11,

2005.

Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A, Ema M, Tokunaga H, Nishimura T. "Evaluation for the additive toxic influence of organophosphorus pesticides." *The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, U.S.A.*, March 6-11, 2005.

江馬 眞、原園 景、藤井咲子、川島邦夫 "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*、長崎、7月15-17日、2004

広瀬明彦、鎌田栄一、高橋美加、江馬 眞 "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*、名古屋、12月14-15日、2004.

## G. 知的所有権の取得状況

なし