

200501154A

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

2005（平成17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 18 年（2006） 3 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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 18 (2006) 年 3 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 真	----- 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 真/高木 篤也	----- 17
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	隅田 寛	----- 25
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	----- 37
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	----- 41
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	----- 45
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	----- 51
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	----- 57
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	----- 69
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	----- 77
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	----- 85
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	----- 91
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 99
IV. 研究成果の刊行物・別冊		----- 103

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

内分泌かく乱化学物質（EDCs）（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し、その作用機序の解析を推進することによりリスクアセスメントの向上に資することを目的として、本研究班を4つの構成（【奇形発生】【発がん】【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】【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】）に分けて研究を推進した。その結果、胎児影響解析の技術基盤の確立、AhRの生体に於ける機能に関する新たな知見の取得、TCDD口蓋裂1/部位に於ける既知の標的遺伝子（CYP1A1、Ahrr等）の発現増加の確認、口蓋裂関与遺伝子群の抽出、TCDD胎内暴露アカゲザル児での臼歯と精巣の異常の確認、マウスES細胞分化過程でのAhR発現パターン情報の取得、Tg.AcをC57Bl/6に7世代戻し交配したマウスに於けるTCDD低用量投与による胸腺リンパ腫の発生増加、ヒト培養細胞パネルでのEDCsのクラスター形成確認、AhR欠失マウスでの大腸腫瘍発生、PAHによるLXRa標的遺伝子発現抑制に於けるCYP1A1関与、前立腺に於けるテストステロン応答遺伝子のメチルコランズレン抑制、PCB投与による血中T₄の減少に対する血中から肝臓への移行による影響、及びリスクの質と先進科学の普及に関する考察を行うと共にTCDD類のTEF設定の問題等に関する最新情報収集などが成果として挙げられる。

分担研究者

江馬真（国立医薬品食品衛生研究所）

隅田寛（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は注意深く検討する必要がある。具体的には、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並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（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児の発育に与える影響を調べ、耐容一日摂取量の妥当性を検討する（隅田）。胎生期暴露影響の基礎研究として ES 細胞分化に対する TCDD 等の影響について遺伝子発現、シグナル伝達への影響を明らかにする（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物質の口蓋裂誘導の分子機構を明らかにするため、12.5日齢のC57BL/6妊娠マウスに2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を20 μ g/kgの用量で単回強制経口投与後、13.5、14.5、15.5日齢の胎児を摘出し、口蓋部位を小型のハサミで採取、RNAをRNAeasy（キアゲン社）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を用いて遺伝子発現解析を行った。（江馬、高木）。

妊娠20日のアカゲザルに2,3,7,8-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5歳まで、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。また、初産児（F1a）の離乳後、期間をおいて母体を再度交配、妊娠させ、F1a実験で、妊娠20日にTCDD 20 ng/kg（低暴露量群）または200 ng/kg（高暴露量群）を皮下投与した。その後はF1a実験と同様にTCDDを投与して第

二産児（F1b）を得た。F1bを生後約850日で剖検し、精巣と精巣上体の組織所見を中心にTCDDの影響を検討した（隅田、安田）。

TCDDのES細胞及びその浮遊培養により形成される胚様体(EB)の分化への影響を遺伝子レベルで解析するため、ダイオキシンの受容体であるAryl-hydrocarbon receptor (AhR)、Arntを含むES細胞及びEBの分化過程で変動する各種遺伝子の正常な発現パターンについてマイクロアレイを用いて、経時的に解析を行った。実験は、フィーダー細胞上で培養したマウスES細胞(TT2)をLIFを除いたES培地で7日間浮遊培養した。その間に形成されるEBの培養開始1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7日後と0.5日ごとにEBを採取してプールし、アフィメトリクス社のGene Chip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発したPercellome手法（細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る遺伝子発現解析手法）を用いた（高木）。

発癌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をC57BL/6に7世代戻し交配した雌雄マウス（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3ヶ月間経口投与した。対照群にはコーン油を投与した、投与終了後、病理組織学的検査を実施し、

生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析し、その用量反応性の非単調性を確認した(菅野)。

ダイオキシン類を含む種々の内分泌攪乱化学物質、核内受容体アゴニストを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)評価を行った。また、ヒト癌細胞に対する化学物質曝露の影響を、遺伝子発現プロファイルの変化によって調べた。また、濃度時間依存的な変動を GeneChip を用いて調べた(矢守)。

AhR 欠失マウス及び野性型マウスを用いて、マクロファージあるいは、腸組織について遺伝子発現変化、形態学的変化などを、DNA マイクロアレイ、RT-PCR、抗体染色法や分子生物学的手法を用いて解析した(藤井)。多環芳香族炭化水素(PAHs)が LXR シグナル伝達経路を抑制する機構を検討した。TK プロモータに 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、CYP1A1 によって代謝される PAHs (MC, B[a]P) および CYP1A1 によって代謝されない HAHs (TCDD, PCB) の LXR 転写活性に及ぼす影響を検討した。また、CYP1A1 の阻害剤である α -ナフトフラボン (ANF) が MC による LXR 転写活性の抑制に与える影響を HepG2 細胞を用いて検討した。

CYP1A1 の発現を抑制する siRNA (siCYP1A1) が MC による LXR 転写活性および LXR 標的遺伝子の発現の抑制効果に与える影響を HepG2 細胞を用いて検討した。(鎌滝)。

マウス前立腺に対する内分泌かく乱物質曝露の作用を検討するため、11 週齢の

C57BL マウスを用いた。Testosterone propionate (T), 5mg/kg, 17 β -estradiol (E2) 50 μ g/kg, 3-methylcholanthrene (3MC) 10 mg/kg を i.p. 投与した。新生仔マウスは、PND 6 でホルモン投与を行った。成熟動物は、10 週齢動物を去勢して一週間おいた後にホルモン投与をおこなった。前立腺組織については、腹葉(V)、背側葉(DL)、前葉(AP)を解剖学的に区別して保存した。PND6 マウスの前立腺を解剖学的に切り出し、MC フィルター上に置いて培養した。また、前立腺組織 (VP, DLP, AP) 蛋白の二次元目録動を行った。Sypro Ruby 染色により定量的にスポットを検出し、各スポットを MALDI-TOF 質量分析機によりマススペクトルを測定した。これに peptide mass fingerprinting 法および MS/MS 解析を適用してタンパク質を同定した。また、各組織より全 RNA を抽出した後、Affymetrix 社 GeneChip mouse シリーズにより変動遺伝子を検出した(藤本)。

PCB の血中サイロキシン(T_4)濃度低下作用機構を解明することを目的として、Wistar 系ラット及び UGT1A ファミリー酵素を欠損したラット(Gunn ラット)に KC500 10 mg/kg を 10 日間連続腹腔内投与し、最終投与後 4 日に血清中甲状腺ホルモン濃度、肝ミクロソームにおける抱合活性及び UGT 分子種の発現量を測定した。また、両ラットに KC500 を連続投与し、最終投与後 4 日に $[^{125}I]T_4$ を静脈内投与し、 $[^{125}I]T_4$ の血清クリアランス、血清タンパクとの結合率及び組織分布量を測定した。さらに、ラットに KC500 (100 mg/kg)を単回投与後 4 日に、肝実質細胞

への $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の取り込み量を測定した(加藤)。

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、生体の機構研究の進展とリスクコミュニケーションの最近の三つの論点について検討した(井上)。

海外における最新の内分泌かく乱化学物質(ダイオキシン類を含む)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、C57BL/6 妊娠マウスに TCDD を $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回強制経口投与後、13.5、14.5、15.5 日齢の胎児口蓋部位を対象にマイクロアレイ解析を行った。その結果、3 倍以上に有意に増加した遺伝子(0.5 コピー以上発現しているもの)は、13.5 日齢胎児で約 700 遺伝子、14.5 日齢胎児で約 140 遺伝子、15.5 日齢胎児で約 330 遺伝子であった。一方、3 倍以下に有意に減少した遺伝子(減少前に 0.5 コピー以上発現しているもの)は 13.5 日齢胎児で 0 遺伝子、14.5 日齢胎児で約 60 遺伝子、15.5 日齢胎児で約 20 遺伝子であった。それらの中で、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp)等の TCDD により誘導されることが知られている遺伝子が対照群に比較して顕著に増加し、胎児口蓋が TCDD の標的部位であることが形態のみならず、遺伝子レベルでも確認された。その他、数多くの遺伝子の発現量の変化が確認された。その中には、CDK インヒビターの増加も確認され、口蓋裂との関連が強く示唆された(江馬、高木)。

妊娠アカゲザルに 2,3,7,8-TCDD を 30 または 300ng/kg 皮下投与し、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。その結果、300 ng/kg 負荷群の 8 例中少なくとも 2 例に第 3 大臼歯の欠如が発見された。対照群および 30 ng/kg 負荷群では明らかな第 3 大臼歯欠如は発見されなかった。また、F1a 実験と同様に TCDD を投与して得られた第二産児(F1b)を生後約 850 日で剖検し、精巣と精巣上体の組織所見を中心に TCDD の影響を検討

し、児の精巣と精巣上体に変化を認めた。以上の結果、TCDD は妊娠および授乳期母体への暴露において、霊長類においても児の歯、精子形成および精子成熟に影響をおよぼす可能性が示唆された（隅田、安田）。

ES 細胞および EB の分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析した。その結果、多くの遺伝子発現の変動が見られた。その中で、ダイオキシンの受容体として知られている AhR を始め、関連する遺伝子として、AhRR、Arnt、ER(エストロゲン受容体) α 、 β 、Cyp1a1、Cyp1b1 遺伝子の発現パターンについて解析した。その結果、ES 細胞において AhR 遺伝子の発現が認められ、分化の開始によりその発現は増加し、分化開始後、2 日目に発現はピークとなり、その後減少するパターンを示すことが明らかとなった。また、AhR とヘテロダイマーを構成し、ダイオキシンの毒性発現に関与することが知られている Arnt 遺伝子は AhR 遺伝子と同様に ES 細胞に発現し、分化開始後、1-2 日でピークに達した後、減少するという AhR 遺伝子に良く似た発現パターンを示すことが明らかとなった。その他の AhRR、ER- α 、 β 、Cyp1a1、Cyp1b1 の AhR 関連遺伝子においても、AhR に似た発現パターンが見られ、AhR およびその関連遺伝子の変化を定量的に明らかにした（高木）。

【発がん】

Tg.AC を C57B1/6 に 7 世代戻し交配した雌雄マウス（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 3 ヶ月間経口投与した。投与

終了時の 0, 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 群の生存率はそれぞれ、100, 62.5, 100, 75, 100, 100%、雌では 0, 1, 30, 100ng/kg 群に死亡が見られ、投与終了時の 0, 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 群の生存率はそれぞれ、87.5, 75, 100, 100, 87.5, 75%であった。体重及び摂餌量、臓器重量には差は認められなかった。外見として口唇周囲の乳頭腫がいずれの群とも散発性に認められたが、TCDD による影響は見られなかった。剖検による肉眼所見では、前胃の乳頭腫が対照群を含む各群でほとんどのマウスで見られたが、TCDD 投与による影響は明らかでなかった。一方、胸腺の肥大あるいは腫瘍が対照群を除く各投与群で低頻度ながら見られ、雄と雌を合わせて計算すると 1ng/kg 群で有意に増加し、組織学的には胸腺リンパ腫（thymic lymphoma）であることが確認され、本試験系が TCDD 投与の低用量影響の検出系としての有用性が示唆された（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】

ダイオキシソ類を含む種々の内分泌攪乱化学物質、核内受容体アゴニストを「Cancer Cell Informatics」により、検討を行った。得られたフィンガープリントを解析した結果、レチノイン酸アゴニストの 9-cis, all-trans retinoic acid, TTNPB が強固なクラスターを形成した。また、エストロゲンアゴニスト estradiol, dieldrin や PPAR アゴニストである Bis (2-ethylhexy) phthalate, troglitazone もそれぞれクラスターを形成した。また、Tributyltin が各種の内分泌かく乱化学物

質と比較して、高い感受性を示した。ヒト前立腺癌培養細胞株 PC-3 おいて、Tributyltin 曝露による遺伝子発現変動を検討した結果、濃度、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 処理後時間依存的に発現レベルの上昇が見られた遺伝子は IL1 下流の遺伝子群や MAPK 系などさまざま観察された (矢守)。

AhR 欠失マウスは、15 週令を過ぎると脱肛が顕著に認められるようになる。AhR 欠失マウスについて、特に大腸、小腸に癌化病変が見られるか検討を加えたところ、マウスの 11 週令を過ぎると殆どすべてのマウスについて癌化病変が認められることが分かった。これらの事柄は AhR が癌抑制因子として働いていることを示している。この時に腸に好中球、マクロファージなどの炎症性の浸潤が認められた。チオグリコール酸処理の腹腔浸出液中のマクロファージを LPS 処理すると AhR の発現が誘導され、6 時間と 24 時間にピークを持つ 2 相性の発現が観察された。この時に TNF α 、IL6、CXCL10、IFN γ などの多くのサイトカインやケモカインが大体 6 時間をピークに誘導され、この時に MMP8、Sca1 や AhRR が AhR 依存的に誘導されることが分かった。AhR の誘導の 2 相性の中、遅い誘導は他のサイトカインの生成による 2 次的誘導の可能性が考えられた。AhR は IFN γ や TNF α によって誘導されるが、興味あることは、AhR に強く依存している AhRR の発現は IFN γ や TNF α によっても誘導されるが AhR 欠失マクロファージでは誘

導されなかった。また CYP1A1 は 3MC によって AhR に依存して誘導的に発現されるが、LPS や IFN γ あるいは TNF α によって CYP1A1 の発現誘導はひきおこされないことが分かった。このように AhR はサイトカインや 3MC によって活性化され、標的遺伝子の発現が活性化されるが AhR の活性化の仕方によって標的遺伝子に違いがある可能性があることが分かった (藤井)。

HepG2 細胞を CYP1A1 によって代謝される PAHs である MC および B[a]P で処置した場合、LXR を介した転写活性はコントロール群と比較して 40~50% まで低下した。しかしながら、CYP1A1 によって代謝を受けない HAHs である TCDD および PCB では LXR を介した転写活性は抑制されなかった。さらに CYP1A1 の阻害剤である ANF を MC と共処置した場合、MC による LXR を介した転写活性の抑制は解除された。CYP1A1 の発現を抑制する siRNA である siCYP1A1 を一過的に発現させた HepG2 細胞では MC による LXR を介した転写活性の抑制および LXR 標的遺伝子の発現の抑制は認められなかった。このことから PAHs による LXR シグナル伝達経路の抑制には CYP1A1 が重要となることが明らかとなった。PAHs は CYP1A1 によって代謝的に活性化を受け、LXR シグナル伝達経路を抑制し、その結果、アテローム性の動脈硬化を誘発する可能性が示唆された (鎌滝)。

マウス前立腺に対する内分泌かく乱物質暴露の作用を検討するため、前立腺のプロテオーム解析により分泌タンパク質を同定した結果、IgGBPLK、EAPA 2、

peroxiredoxin 6、GRP78 等が新規に同定された。同定したタンパク質は、成体においては全て T 応答性転写活性を示したが、その程度はタンパク質種と前立腺部位（葉）により異なっていた。さらに分泌タンパク質のうち SBP、SPI-KT3、probasin、PSP94 は、新生仔期においても、T 応答性ターゲット遺伝子であることが示された。また既知の増殖因子、受容体遺伝子について検索した結果、PND 6 での T 応答性遺伝子として IGF-1、KGF が同定された。より直接のアプローチとして、T 投与後の新生仔前立腺を材料に GeneChip 解析をおこない、T 応答遺伝子として estrogen sulfo-transferase および defensin β 1 等が同定された（藤本）。

PCB の血中サイロキシン (T_4) 濃度低下作用機構を解明することを目的として、Wistar 系ラット及び UGT1A ファミリー酵素を欠損したラット (Gunn ラット) に KC500 10 mg/kg を 10 日間連続腹腔内投与した。その結果、血清中 total T_4 および free T_4 濃度は両ラットにおいていずれも有意に低下した。また、KC500 を連続投与した Wistar 系ラットでは、UGT1A の発現量及び T_4 -UDP-GT 活性は著しく増加したが、Gunn ラットでは、それらは全く変化しなかった。KC500 を連続投与した Wistar 系ラット及び Gunn ラットの血中から $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の消失は、両ラットとも著しく亢進した。また、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の全身クリアランス及び分布容積も、両ラットにおいて有意に増加した。 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の血清-肝臓間分配係数 (K_p 値) 及び $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の肝臓への分布量は、KC500 を連続投与した両ラットにおいて有意に増加した。一方、肝臓単位重量当たりの

分布量は、KC500 連続投与により、Wistar 系ラットにおいて有意に増加したが、Gunn ラットでは変化しなかった。また、KC500 連続投与により、両ラットの $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ と T_4 輸送タンパクであるトランスサイレチン (TTR) との結合率は有意に減少し、アルブミンとの結合率が増加した。KC500 を投与したラット肝実質細胞への $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の取り込み量は有意に増加したが、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の輸送の半飽和濃度 (K_m)、最大輸送速度 (V_m) および輸送活性 (V_m/K_m) は変化しなかった。PCB による血中 T_4 濃度の低下は、主に肝臓の T_4 -UDP-GT の誘導が主因とされてきたが、本研究結果から、本酵素誘導は、単にひとつの要因であるに過ぎないことが明らかになり、 T_4 の血中から肝臓への移行が重要な役割を果たしていることが明確に示された。また、その T_4 の移行量の増加には肝肥大とともに、血中の T_4 と TTR との結合阻害が関与していることが示唆された（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、生体の機構研究の進展とリスクコミュニケーションについて検討した（井上）。

2005 年 8 月にトロントで行われた第 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' 2005」に参加し、最新の内分泌かく乱物質および、ダイオキシン類の毒性評価上重要な TEF 評価およ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) およ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. TCDD 投与マウス胎児口蓋のマイクロアレイ解析を実施した結果、新たな TCDD の標的遺伝子及び口蓋裂誘導の候補遺伝子を得た。TCDD のアカゲザル胎生期・授乳期暴露は児の第 3 大臼歯の形成を阻害した。また、胎生・授乳期のアカゲザルに、TCDD をラット実験から得られている最小毒性量の 1/3 量と 3 倍量 (体内負荷量換算) を暴露したところ、児の精巣と精巣上体に変化が認められ、TCDD は妊娠および授乳期母体への暴露において、霊長類においても児の精子形成および精子成熟に影響をおよぼす可能性が示唆された。ES 細胞および EB のマイクロアレイによる解析法を確立し、AhR、Arnt を含む種々の発現遺伝子の変動パターンを明らかにした。
2. 発がんプロモーター高感受性マウスである Tg.AC を C57B1/6 と 7 世代戻し交配して得られた雌雄マウスに、2,3,7,8-TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回で 3 ヶ月間の経口投与実験を実施した結果、低用量群で胸腺リンパ腫が有意に増加し、TCDD 投与の低濃度影響の検出系としての有用性が示唆された。
3. Cancer Cell Informatics による解析の結果、核内受容体アゴニストの特徴ごとにいくつかのクラスターを形成することを明らかにした。また、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使えることが示唆された。
4. AhR 欠失マウスの組織を詳細に調べると腸に癌性変化が発見され、11 週令を過ぎると殆どすべての AhR 欠失マウスに癌性変化が認められることが分かった。また、AhR 欠失マウスは 10 週令を過ぎると脾臓の肥大が認められ、腸に炎症が起こっていることが確かめられた。PAHs による LXR を介した転写活性化に対する抑制効果は CYP1A1 の阻害剤との共処置および siCYP1A1 を発現させることで解除された。また siCYP1A1 が発現する細胞では PAHs は LXR 標的遺伝子の発現を抑制しなかった。以上のことから PAHs が誘発するアテローム性の動脈硬化の発症機構の一つと考えられる LXR シグナル伝達経路の抑制には CYP1A1 が重要となることが明らかとなった。
5. 新生仔期マウス前立腺における、アンドロゲン応答性遺伝子群を明らかにした。これらの T 依存性遺伝子発現は、3MC により抑制されることから、新生仔前立腺におけるダイオキシン作用は、アンドロゲン応答性転写の直接的な抑制であると考えられた。これまで、PCB

による血中 T_4 濃度の低下は、主に肝臓の T_4 -UDP-GT の誘導が主因とされてきたが、本酵素誘導は、単にひとつの要因であるに過ぎないことが明らかになり、 T_4 の血中から肝臓への移行が重要な役割を果たしていることが明確に示された。また、その T_4 の移行量の増加には肝肥大とともに、血中の T_4 と TTR との結合阻害が関与していることが示唆された。

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、その考え方を考究した。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' 2005」に参加し、最新の国際動向について情報収集した。

以上、平成 17 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, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 30-36, 2006.

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol* (in press)

Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and 4-ethylphenol compared with that in young rats. *Congenit Anom Kyoto* (in press)

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向（第 8 報）—第 16 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議（2003 年パリ）、化学生物総合管理学会誌

松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第 18 回初期評価会議までの概要、化学生物総合管理学会誌

Ema M, Hirose A. Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. Golub MS, Ed. *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity*, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 23-64.

Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi

M, Morita T, Ema M. In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. Mutat Res, 588, 129-135, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Hamamura M, Furukawa H, Fukuda N, Ito Y, Wako Y, Yamashita K, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-tert-butylphenol and 2,4-di-tert-butyl phenol toxicity. Congenit Anom Kyoto, 45, 146-153, 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi, M., Takahashi M, Kamata E, Ema M. Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. Congenit Anom Kyoto, 45, 137-145, 2005.

松本真理子、鈴木理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第 20 回初期評価会議概要，化学生物総合管理学会誌 1, 445-453, 2005.

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、OECD 化学物質対策の動向（第 7 報）－第 15 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議（2002 年ボストン）、衛研報告、123, 46-52, 2005.

松本真理子、田中里依、川原和三、菅谷

芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第 19 回初期評価会議概要，化学生物総合管理学会誌 1, 280-288, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Nishimura, N., Enami, T., Wada, H., Ogata, H., Yamamoto, Y., Ito, Y., Kamata, E., Ema, M. and Hasegawa, R. Susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats. J. Toxicol. Sci., 30, 29-42, 2005.

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

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、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, 2005.

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、OECD 化学物質対策の動向（第 5 報）衛研報告、122, 37-42, 2004.

広瀬明彦、江馬 眞、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, 2004.

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M, Ema M. 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, 2004.

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

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, Tanimura T. 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). Congenit Anom Kyoto, 44, 172-177, 2004.

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

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

Ema M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. Reprod Toxicol, 17, 407-412, 2003.

広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一、ビスフェノール A の内分泌かく乱作用のヒトへの影響評価、日本食品化学会誌, 10, 1-12, 2003.

Ema M, Harazono A, Hirose A and Kamata E: Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. Toxicol Lett, 143: 233-238, 2003.

Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. J Toxicol Sci, 28, 59-70, 2003.

Harazono A, Ema M. Suppression of decidual cell response induced by dibutyltin in pseudopregnant rats as a cause of early embryonic loss. Reprod

Toxicol, 17: 393-399, 2003.

2. 学会発表

江馬 眞、OECD 発生神経毒性試験ガイドラインについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005.

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、有機スズ化合物の生殖発生毒性：ジブチルスズのマウスにおける胚致死作用、第 7 回環境ホルモン学会研究会、2005.

Ena M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-*o*-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ena M. Susceptibility of newborn rats to six chemicals, compared with young rats. EUROTOX 2005

Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Ena M. DNA micro-array analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantatio. The 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、紫外線吸収剤 2-(3,5-di-*tert*-butyl -2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラットにおける発

生毒性、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

平田睦子、楠岡 修、西村信雄、和田 肇、緒方英博、福田苗美、伊藤義彦、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、化学物質に対する新生児の感受性に関する研究：1,3-ジブプロモプロパン及び 1,1,2,2-テトラブプロモエタン、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、ブタノールのラットにおける発生毒性の検討、第 45 回日本先天異常学会学術集会、2005.

江馬 眞、OECD 神経発生毒性試験ガイドライン 426 (ドラフト) の進捗状況、第 45 回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジウム、2005.

Ena 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, 2005.

Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A, Ena M, Tokunaga H, Nishimura T. Evaluation for the additive toxic influence of organophosphorus pesticides The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.

Ena M, Fukunishi K, Nagata R, Matsumoto M, Hirose A, Kamato E. 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, 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、2004

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J, Ema M. 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, Harazono A, Fujii S, Kawashima K. Developmental toxicity of -thujaplicin (TP) in rats. The 43th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2004.

Hirata-Koizumu M, Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, Mitsumori K, Hasegawa R, Kamata E, Ema M. Unzpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. 10th International Congress of Toxicology, 2004.

Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M,

Hayashi M. Development of genotoxicity prediction QSAR system for registered and existing industrial chemicals in Japan. 10th International Congress of Toxicology, 2004.

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

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、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, 2004.

江馬 眞、可塑剤フタル酸エステルのラット次世代の発生に及ぼす影響、第5回生殖・発生毒性東京セミナー、2003.

江馬 眞、宮脇英美子、広瀬明彦、鎌田栄一、モノブチルフタレートによるラット雄胎児における肛門生殖突起間距離の短縮及び精巣下降不全、第43回日本先天異常学会学術年会 2003.

江馬 眞、原園 景、広瀬明彦、鎌田栄一、ジブチルスズによるラットにおける着床阻害に対するプロゲステロンの効果、第30回日本トキシコロジー学会学術年会、2003.

原園 景、江馬 眞、ラット妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズの着床阻害作用、第30回日本トキシコロジー学会学術年会、2003.

広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一、ビスフェノールAによる内分泌かく乱作用のリスクアセスメント、第30回日本トキシコロジー学会学術年会、2003.

本田久美子、緒方英博、古川浩美、和泉宏幸、小泉睦子、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、2-クロロフェノールの新生児および若齢ラットにおける発現毒性と無毒性量の比較検討、第30回日本トキシコロジー学会学術年会 2003.

西村信雄、池谷政道、石田 茂、小泉睦子、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、3-エチルフェノールの新生児反復投与毒性および若齢動物毒性試験との比較、第30回日本トキシコロジー学会学術年会 2003.

Takagi A., Hirose A, Hirabayashi Y, Kaneko T, Ema M, Kannno J. Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus. 23rd International Symposium on Halogenated

Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

Sekizawa J, Miyairi S, Ema M. Possible modification of dioxin risk in the presence of endogenous ligands for arylhydrocarbonyl receptor. 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

Ema M, Miyawaki E. Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) during pregnancy. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.

Koizumi M, Nishida N, Enami T, Sunaga M, Horikawa H, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.

Hasegawa R, Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Ema M. Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.

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

3. その他

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

4317031、特願 2004-
219285）

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 江馬真

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TCDDを投与した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、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp)等のTCDDにより誘導されることが知られている遺伝子が対照群に比較して顕著に増加し、胎児口蓋がTCDDの標的部位であることが遺伝子レベルでも確認された。その他、数多くの遺伝子の発現量の変化が確認出来た。

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：12.5日齢のC57BL/6妊娠マウスに2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を20 μ g/kgの用量で単回強制経口投与後、13.5、14.5、15.5日齢の胎児を摘出し、口蓋部位を小型のハサミで採取、

RNAをRNAeasy（キアゲン社）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3-4匹、15.5日齢では各2-3匹のプールサンプルを使用した。データ取り扱いは細胞1個当たりのmRNAのコピー数で表すことが出来る

“Percellome”法を用いた。

（倫理面への配慮）