

彦、鎌田栄一、伊原敏夫 (2006) カニクイザルにおけるジブチルスズの発生毒性試験、第 46 回日本先天異常学会学術集会 (山形、6/29-30)

江馬 眞、松山隆史、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2006) 紫外線吸収剤 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラット新生児における毒性、第 46 回日本先天異常学会学術集会 (山形、6/29-30)

江馬 眞 (2006) 生殖毒性、第 7 回日本トキシコロジー学会生涯教育講習会 (名古屋、7/3)

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2006) 加硫促進剤 1,3-di-o-tolylguanidine のラットにおける出生前発生毒性、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (名古屋、7/5)

Hirose A, Aisaki H, Oh K, Matsumoto M, Kamata E, Igarashi K, Kanno J, Ema M. Gene Expression analysis in uterus and ovary of mice treated dibutyltin dichloride during implantation. The 26th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/24).

Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose, Kamata E. Pre- and post implantation embryonic loss induced by dibutyltin given to mice during early pregnancy. The 26th International

Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/21-25, 8/24).

Ema M, Arima A, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. (2006) Prenatal developmental toxicity of dibutyltin in cynomolgus monkeys given on consecutive three days during organogenesis. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/22

Hasegawa R, Hirata-Koizumu M, Dourson M, Hirose A, Nakai S, Kamata E, Ema M. (2006) Comprehensive evaluation on pediatric susceptibility to 18 chemical. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/23

Hirose A, Kamata E, Akiyama H, Takahashi M, Ema M, Hayashi M. (2006) Development in silico genotoxicity predictory system on chromosomal aberration for existing chemicals. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/21

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Teratogenic effects of rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine (DTG), in rats. 27th Annual meeting of American College of Toxicology (10/5-8, Palm Springs)

Ema M. (2006) Introduction of Division of Risk Assessment. NIHS/NCBSR-KFDA/NITR Workshop on Regulatory Science and Information in Toxicological Evaluation

of Potential High Risk Materials. November 29, 2006, Mita Conference Center.

Ema M. (2006) OECD high production volume chemicals programme NIHS/NCBSR-KFDA/NITR Workshop on Regulatory Science and Information in Toxicological Evaluation of Potential High Risk Materials. November 29, 2006, Mita Conference Center.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. International Conference on Food Contamination and Neurodevelopmental Disorders (12/3-5, 2006, Valencia)

Ema M, Matsumoto M, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Hasegawa R, Yamamoto N.
The Contribution of the Japanese Government to the OECD High Production Volume Chemicals Programme: Summary of 1st to 21st SIDS Initial Assessment Meetings. First U.S. Conference on Characterizing Chemicals in Commerce: Using Data on High Production Volume (HPV) Chemicals. (12/12-14, 2006. Radisson Inn, Austin, Texas)

Ema M, Matsuyama T, Matsumoto M, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Kamata, E. (2007) Toxicity study of ultraviolet light

absorber 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) in rats during the pre-weaning period. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology

Fukunishi K, Hirose A, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Kamata E, Ema M. (2007) Combined repeated dose toxicity with the reproductive/developmental toxicity screening test of ultraviolet absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-benzotriazole (DBHCB) in rats. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology.

Hirose A, Yamazoe Y, Ema M, Kawamura Y. (2007) Toxicity testing schema for the initial risk assessment of food contact plastics based on the concept of ttc and usage probabilistic factors. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology.

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得:

特になし

1. 実用新案登録

該当しない

1. その他 (データベース等)

該当しない

2. ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル児の生後発育に及ぼす影響

分担研究者 広島国際大学保健医療学部診療放射線学科 教授 隅田 寛

研究協力者 広島大学原爆放射線医科学研究所放射線再生医学研究部門 助教授 藤本成明

研究協力者 株式会社新日本科学 安全性研究所 有馬昭宏

研究要旨

TCDD の最小毒性量は、おもにラットによる実験を基本にして定められた。この最小毒性量投与によりラット雌仔の生殖器形態異常あるいは雄仔の精子数減少が認められている。そこで、2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（以下 TCDD）が霊長類の児精巣に与える影響を検討する目的で、アカゲザルに妊娠期から授乳期にかけて TCDD を体内負荷量換算で最小毒性量の 1/3 量（低暴露量群）または 3 倍量（高暴露量群）になるように負荷した。また、第一産児（F1a）が親離れした後、再度妊娠（F1b）させ、TCDD を F1a 児の場合と同様に負荷した。今回は F1b 児を生後約 850 日程度で剖検し、精巣上体について組織学的に検討した。その結果、TCDD 暴露群の精巣上体管では、上皮細胞の細胞死の増加や空胞化などの変化が示唆された。精巣組織の変化に明確な TCDD 暴露量依存性は認められなかったが、今回の結果から、霊長類においても TCDD の母体負荷によってその児の精子形成や精子成熟に影響が及ぶ可能性が示された。また、精子数に関しては、高暴露量群に明らかな低下が認められた。AhR の塩基配列についても検討を行い、5'末端の配列が、従来報告されている配列と異なることを見出した。AhR の配列から、アカゲザルはヒトに比較してダイオキシンに対する感受性が高いものと思われた。

A. 研究目的

ダイオキシンの発生毒性について、ヒトでのリスク評価に有用な知見を得ることが本研究の目的である。ダイオキシン類の発生毒性に関しては、齧歯類による実験から、雌雄生殖器異常、口蓋裂、水腎症、免疫異常などが報告されているが、代謝時間あるいは代謝メカニズムの違いから、必ずしもヒトに当てはめて考えることが妥当であるとは言い切れない。事実、ヒト暴露例で暴露世代に生じた毒性は、齧歯類での実験例

とは差が認められる。そこで、胎生期・授乳期を通して 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン（TCDD）の暴露を受けたアカゲザルの児に生じた影響を検証することにより、ヒトでのリスク評価、すなわち現在一日摂取量の根拠となっている最小毒性量（LOEL）の検証を行った。

B. 研究計画

TCDD 30 ng/kg（F1b については 20 ng/kg）または 300 ng/kg（F1b については 200

ng/kg) の母体内負荷量に暴露されたアカゲザル雄児の生殖能を検討するために、精巣、精巣上体を中心としてそれらの発育に与える影響を調べた。投与量はそれぞれ体内負荷量換算で齧歯類での実験で得られた LOAEL の約 1/3 量と約 3 倍量である。サルの交配は平成 11 年度に開始され、平成 18 年度にはその初産児 (F1a) は 6 歳になり、年齢的に平成 18 年冬頃には受精能力の検証が可能となったことから交配試験を開始した。なお、サルは鹿児島の新日本科学株式会社で飼育している。

平成 18 年度には、F1a の雄児の精子形成について検討した。また、児から抽出した RNA を材料に、AhR の塩基配列の相同性を検討し、ヒトとの感受性の差についての検討を継続した。それらの結果を踏まえて、現在基準として考えられている胎生毒性としての LOAEL の妥当性について総合的に評価した。

(倫理面への配慮)

動物は新日本科学(SNBL)のサル実験施設の「動物実験ガイドライン」に従い愛護的に扱い、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

昨年度までに、生後死亡例と F1b のと殺例に、形態的な児の歯および腎臓の異常と精巣の変化が観察されている。このうち、歯の異常と腎臓の異常は 300 ng/kg 投与群のみに認められたことを、昨年度までに発表した。今回、F1b 屠殺例の精巣上体について形態的に調べた結果、20 ng/kg 投与群の児精巣上体に変化が認められた (図

1)。

現時点での生存 F1a 雄児は、対照群 4 匹、30 ng/kg 投与群 6 匹、300 ng/kg 投与群 5 匹である。生後 78 ヶ月時点でのそれぞれの体重 (Kg) は、対照群 $5.23 \text{ kg} \pm 1.11$ 、30 ng/kg 群 $5.79 \text{ Kg} \pm 0.96$ 、300 ng/kg 群 $5.23 \text{ kg} \pm 1.08$ であり、群間に差は認められなかった。しかし、雌雄別に体重を分類すると、雄では対照群 $6.35 \text{ kg} \pm 0.73$ 、30 ng/kg 群 $6.46 \text{ Kg} \pm 0.69$ 、300 ng/kg 群 $5.56 \text{ kg} \pm 1.22$ であり、300 ng/kg 群で有意に体重増加遅延が認められた。

今回、F1b 屠殺例の精巣上体について形態的に調べた結果、20 ng/kg 投与群の児精巣上体に変化が認められた (図 2)。精巣の大きさ (mm) は、各群に有意差は認めなかったが、対照群と 300 ng/kg 群がほぼ同じ値であったに対して、30 ng/kg 群では数値が高い傾向にあった。

陰茎長 (mm) についても、対照群と 300 ng/kg 群ではほぼ同じ数値であったが、30 ng/kg 群では対照群に比較して有意に高い数値であった。

平成 18 年度には、生存 F1a 児の精子数のデータが得られている。精子数は TCDD 容量依存的に低下していた (図 2)。

アカゲザル AhR の塩基配列を決定するために、血液サンプルから RNA を調整して、cDNA を作成した。塩基配列に関しては、最近他の研究機関からデータベースに登録されたが、5'末端の配列については、我々の cDNA サンプルからは再現性が得られなかった (図 3)。データベース上の塩基配列の比較の結果、ヒト AhR との相同性は高かった。

D. 考察

精巣変化と精子形成、成熟の確認

齧歯類での実験で得られている結果では、TCDD の発生毒性における最小毒性は生殖器官異常である。今回、齧歯類での LAOEL より低い 30 ng/kg 暴露量でも精子数に変化が認められたことは、霊長類での詳細な検討の必要性を示している。ヒト例では、妊娠率に有意差は認められていないが、比較的低暴露量群にも性比に有意差が認められるとされる。そのため、TCDD 暴露群の精子形成を検討した結果、対照群に比較して精子数に明らかな差が認められた。このことから、ダイオキシン類の暴露により、次世代の生殖能力に影響が及ぶことが示唆された。

動物種により、TCDD に対する感受性が大きく異なることが知られている。今回アカゲザル AhR の塩基配列の同定を試みたが、研究期間中に他研究機関より塩基配列データベースへの登録がなされた。その配列に比較して、5'末端に配列について、われわれの結果と異なったが、その差がどの程度 AhR の機能に本質的に関連するかは不明である。文献的¹⁾には、ニワトリとアジサシの TCDD に対する感受性の差は、アジサシ AhR の 325 番目のアミノ酸残基と 381 番目のアミノ酸残基がニワトリ AhR と異なることに起因するとのことである。この部に相当するアカゲザルのアミノ酸残基は Ala であり、C57BL マウスやアジサシと同じであるが、ヒトでは Val であり、アカゲザルの TCDD に対する感受性はヒトよりも高いと予想される。

以上のことから、現在の耐容一日摂取量が直ちに具体的なリスクを有しているとは

言えないが、その再検討を行うことが望ましいと考えられる。

E. 結論

霊長類での TCDD の次世代に与える影響を視点として次世代に与えるリスクを評価した結果、TCDD の高暴露量により、児の生殖に影響が認められた。総合的に判断して、現在の耐容一日摂取量は一応妥当であると思われる。現在の例数では明確な結論を提示することは困難であるが、低暴露量によってもある程度の影響が認められるので、今後のデータ蓄積の状況次第では、耐容一日摂取量の再検討が必要となるかも知れない。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tokuda N, Arudchelvan Y, Sawada T, Adachi Y, Fukumoto T, Yasuda M, Sumida H, Shioda S, Fukuda T, Arima A, Kubota S: PACAP receptor (PAC1-R) expression in rat and rhesus monkey thymus. The Annals of the New York Academy of Sciences, 1070: 581-585, 2006.

2. 学会発表

安田峯生、安田以久、隅田寛、有馬昭宏、久保田俊一郎、アカゲザルにおける第3大白歯欠如。第46回日本先天異常学会 要旨集 P136 2006 山形

有馬昭宏、久米村政司、花木紘太郎、西田

善郎、松山隆史、今井統隆、立石大志、久保田俊一郎、隅田寛、安田峯生、伊原敏夫、TCDD 胎生期・授乳期暴露を受けたアカゲザルの性成熟に対する検討。第 46 回日本先天異常学会 要旨集 P137 2006 山形

隅田寛、安田峯生、有馬昭宏、福里利夫、久保田俊一郎、TCDD の胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル児精巣上体の変化。第 46 回日本先天異常学会 要旨集 P137 2006 山形

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得:

特になし

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他 (データベース等)

該当しない

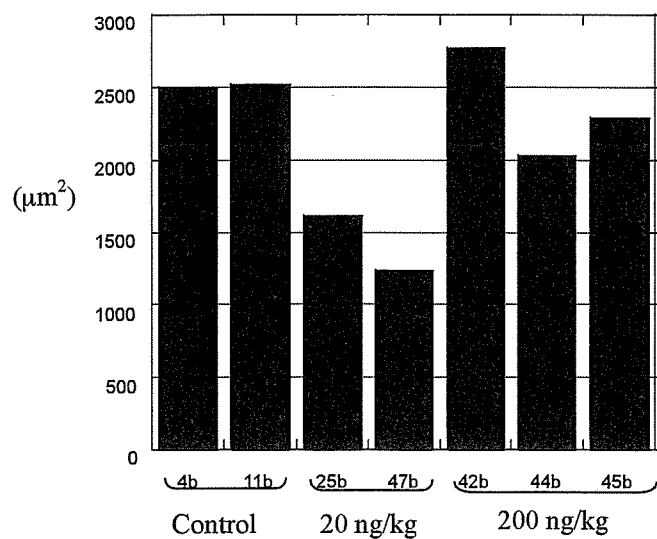


図1 精巣上体単位面積 (10,000 μm^2) あたりの精巣上体管面積

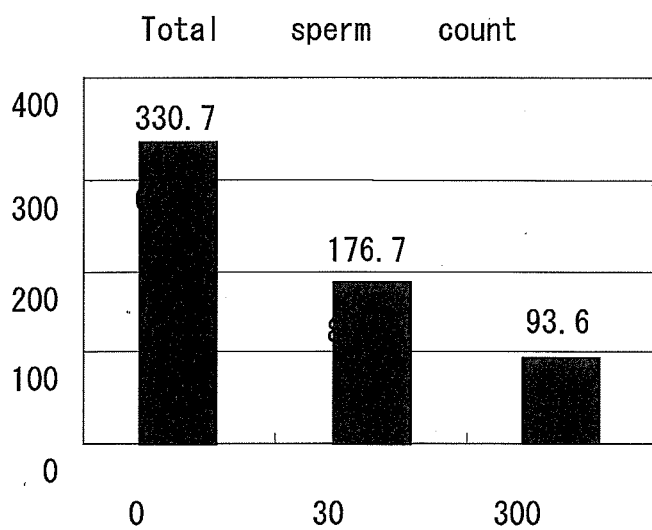


図2 Fl1a 児の精子数

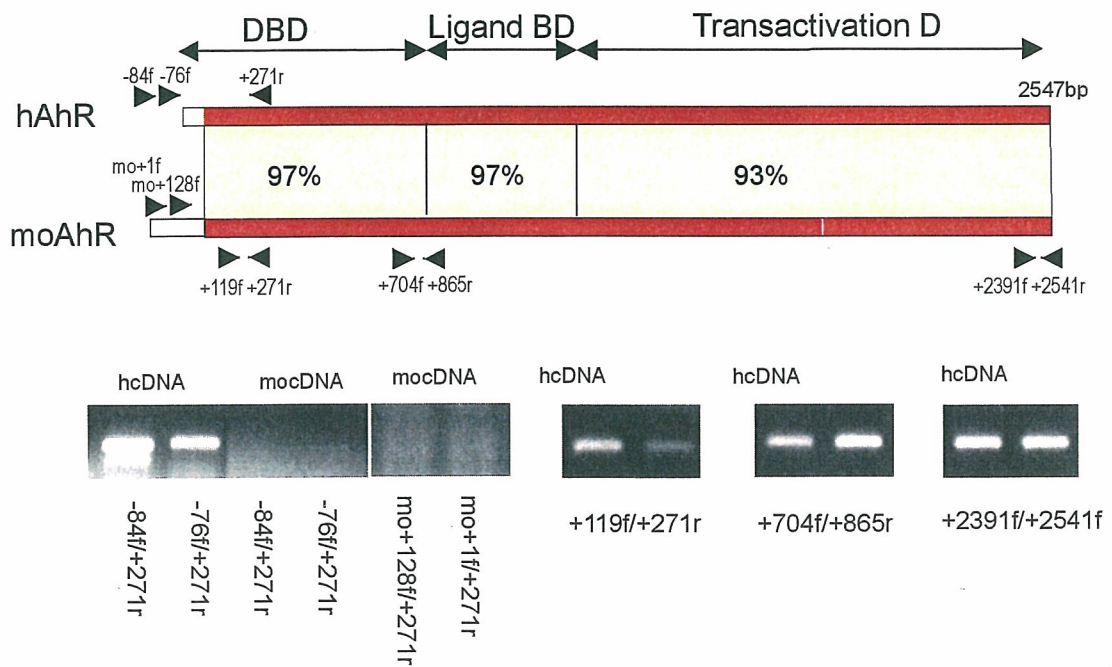


図3 アカゲザル AhR とヒト AhR アミノ酸配列の相同性比較

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

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

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。本年度は胎児毒性予測モデルとしての ES 細胞培養系の有用性を遺伝子レベルで検討するため、ES 細胞と ES 細胞を白血病阻害因子 (LIF) を除いた培地で浮遊培養することにより形成される胚様体 (EB) を対象としたマイクロアレイによる解析法を確立し、ダイオキシンの受容体である AhR 及び関連遺伝子の Arnt を含む種々の遺伝子の経時的な発現パターンを明らかにした。

A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。また、ES 細胞から形成される胚様体 (Embryoid body : EB と略す) は胎児の卵筒胚 (egg cylinder, マウスで 5~7 日胚) に似ており、主に発生学の分野で発生初期胎児に発現する遺伝子の解析等に利用されている。そこで、ダイオキシン類の発生初期への影響を調べる試験系として ES 細胞の有用性を検討することを目的に下記の実験を行った。

B. 研究方法

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、本年度は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。フィーダー細胞上で培養したマウス ES 細胞 (TT2) をトリプシン処理し、細胞培養用 dish 上でさらに 2 時間培養した。この操作によりフィーダー細胞を除去した ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日間は hanging drop 法 (ES 細胞 800 個 / 20 μ l) で、次の 5 日間は浮遊培養法で、計 7 日間培養した。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、及び 7 日後 を採取し、サンプルとした。また、0 日のサンプルとしては上記フィーダー細胞除去後の ES 細胞 (1×10^6 個) を用いた。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、40000 以上の遺伝子発現の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。

(倫理面への配慮)

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. 研究結果

ES 細胞及び 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。多くの遺伝子発現の変動が見られた中で、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、1 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、減少し、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、Arnt2、ER (エストロゲン受容体) - 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た。さらに AhR の発現パターンを、EB の分化マーカーとして知られている遺伝子である内胚葉の分化マーカーの AFP(alpha fetoprotein)、TT (transthyretin)、心臓のマーカーである NKX2.5、cardiac actin、中胚葉マーカーである brachyury、BMP4、神経系のマーカーである MAP2 等と比較したところ、神経堤細胞のマーカーの発現パターンと近

似していた。また、TCDD により肝臓、胎児口蓋で誘導されることが知られている遺伝子の発現パターンを解析したところ、Cyp1a1 と同様に Cbr3(carbonyl reductase 3)と Pmm1(phosphomannomutase1)が分化初期に増加することが明らかとなった。

D. 考察

ES 細胞及び 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するための技術基盤を確立し、AhR を始め、関連遺伝子の発現パターンを明らかにした。その結果、ES 細胞及び EB とも各期を通して AhR 及び関連遺伝子の発現が見られ、特に、TCDD の標的遺伝子 Cbr3 が ES 細胞の分化初期に顕著に増加した。このことから、ES 細胞系を用いた TCDD の影響解析には ES 細胞の分化開始直後への影響を見る必要があると考えられた。

E. 結論

ES 細胞及び EB のマイクロアレイによる解析法を確立し、AhR、Arnt、Cyp1a1 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とともに、ダイオキシン影響の分子メカニズム解析に有用であることが示された。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

書籍

雑誌

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、菅野純、北

嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、
高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、細胞工学、
26、71-77、2007

学会発表

Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分
化系における分化マーカー遺伝子の発現パ
ターンの解析、高木篤也、北嶋聡、中津則
之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 33
回日本トキシコロジー学会学術年会、2006
年 7 月、名古屋

Percellome 手法を用いたマウス胎児にお
ける TCDD 誘導口蓋裂の分子発生機序の解
析、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、相
崎健一、江馬眞、菅野純、第 33 回日本ト
キシコロジー学会学術年会、2006 年 7 月、
名古屋

Global gene expression profiling in
mouse embryonic stem cells and embryoid
bodies. A. TAKAGI, S. KITAJIMA, N.
NAKATSU, K. IGARASHI, K. AISAKI AND J.
KANNO、20th International Congress of
Biochemistry and Molecular Biology, 2006
年 6 月、京都

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：

特になし

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他（データベース等）

該当しない

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

分担研究者 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

短期発がんモデルとして、Tg.AC に C57BL/6 を 10 世代戻し交配して得られた雌雄マウスを用い、2,3,7,8-TCDD を 0.1、1、10ng/kg 体重の用量で週 2 回 3 ヶ月間経口投与した。前胃の乳頭腫が各群とも高頻度で見られたが、TCDD の影響は明らかではなかった。また、胸腺腫の発生についても TCDD による誘発作用は見られなかった。TCDD 単回投与マウス肝のマイクロアレイデータを対象に癌関連遺伝子を検索した結果、癌抑制作用が示唆されている TIP30 を TCDD が顕著に誘導することを明らかにした。

A. 研究目的

p53 ヘテロ欠失マウスを用いた検討で見ら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）の再現性を、短期発がんモデルマウスの Tg.AC マウスを用いて確認すると共に、その発がん用量相関性の分子機構を解析する。これまでの解析で、プロモーター物質高感受性遺伝子改変モデルとして Tg.AC マウスを C57BL/6 マウスに継続して back cross することにより胸腺腫及び前胃の squamous papilloma（乳頭腫）が高頻度に自然発生することを確認した。さらに、2,3,7,8-TCDD を 1、3、10、30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 3 ヶ月間経口投与すると胸腺腫が TCDD 投与群で見られ、1ng/kg 群では有意に増加した。そこで、このマウスを用いて TCDD の 1ng/kg の用量を中心として 3 ヶ月間経口投与実験を行った。肝発がん機構の解明のため、TCDD 単回投与マウス肝で変動する癌関連遺伝子の検索を実施した。

B. 研究方法

プロモーター作用高感受性動物として 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 C57BL/6 マウスに 10 世代戻し交配した雌雄マウス（一群 15 匹）に、2,3,7,8-TCDD を 0.1、1、10ng/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、生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析した。Tg.AC マウスに一定の頻度で出現する nonresponder は、DNA のサザンプロト検査により排除した。TCDD 投与マウス肝臓の遺伝子発現の解析では雄 C57BL/6 マウスに TCDD を 1-30 μ g/kg の用量で単回経口投与し、2、4、8、及び 24 時間後の肝臓のマイクロアレイデータを解析に供した。

（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、国立医薬品食品衛生研究

所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施した。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。動物を扱う委託実験においては、「イナリサーチ動物実験指針」に従って行い、ダイオキシン類の実験は専用特殊実験施設内で、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. 研究結果

Tg.AC に C57BL/6 を 10 世代戻し交配して得られた雌雄マウス (6-7 週齢、1 群 15 匹) に、2, 3, 7, 8-TCDD を 0.1、1、及び 10ng/kg 体重の用量で週 2 回 3 ヶ月間経口投与した。投与終了時まで死亡は見られなかった。体重及び摂餌量、臓器重量には差は認められなかった。外表所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 投与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瘤形成が対照群を除く各投与群で低頻度ながら見られたが、雄では TCDD 投与による増加は見られず、また雌では減少傾向が見られるなど TCDD による胸腺腫誘発は確認出来なかった。TCDD 投与マウス肝の癌関連遺伝子発現解析の結果、癌抑制作用が示唆されている Httatip2 (TIP30) 遺伝子が TCDD 及び、TCDF、メチルコランスレン (MC) により顕著に増加することが新たに確認された。また、この遺伝子の *in silico* プロ

モーター解析の結果 AhR 応答配列が認められた。

D. 考察

プロモーター作用高感受性動物として Tg.AC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のための新たなマウスモデルの樹立のため、Tg.AC マウスの C57BL/6 (TCDD 高感受性マウス) へ戻し交配を行い、これまでに、皮膚乳頭腫誘発感受性が C57BL/6 背景でも保たれることを確認したと共に、前胃の乳頭腫の自然発生が高率に認められることを見出した。さらに、戻し交配により B6 背景が濃くなるに連れて、胸腺腫 (胸腺リンパ腫) の発生が高率となり、歯芽腫及び前胃乳頭腫と近い発生率・発生時期を示すようになった。そこで、このマウスを用いた逆 U 字型用量相関の有無の追試検証を行った結果、前胃の乳頭腫に関しては TCDD 投与の影響は明らかでなかった。また、胸腺腫が低用量群で有意に増加したが、その再現性は見られなかったことから、胸腺への TCDD の腫瘍誘発作用を確認することは出来なかった。Tg.AC マウスに導入されている *v-ha-ras* 遺伝子は胎児期に発現することから、胎児期暴露が発がん高感受性である可能性がある。そこで今後、TCDD を妊娠 Tg.AC マウスに暴露し、児の発がん頻度について検討する。遺伝子発現解析の面から、TCDD 投与マウス肝で TIP30 遺伝子の増加が見られた。In silico プロモーター解析の結果 AhR 応答配列が認められたことからこの遺伝子が AhR を介して誘導されることが示唆された。TIP30 は癌抑制作用、癌転移抑制作用、血管形成阻害作用、エストロゲン受容体のコアクチベーター

との相互作用など種々の作用が報告されており、ダイオキシンによる発がんを抑制する作用として発現誘導がかかっている可能性が示唆された。今後、TCDD の発がん機序を遺伝子レベルでより詳細に検討するため、TCDD をマウスに反復投与し、肝遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行い、癌関連遺伝子発現の変化を検索する。

E. 結論

Tg.AC を C57Bl/6 に 10 世代戻し交配して得られた雌雄マウスに、2, 3, 7, 8-TCDD を 0.1、1、10、30ng/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が、TCDD による腫瘍誘発作用は確認されなかった。TCDD のマウス肝で変動する癌関連遺伝子として新たに TIP30 を見いだした。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H. (2007) Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. Bone

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B.

Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. Mol Endocrinol. 2006 Apr 13 ; 20(9):2141-55 (2006)

Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. Development. 2006 May;133(9):1625-34. Epub 2006 Mar 22[Epub ahead of print]

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 7;103(10):3651-6. Epub 2006 Feb 27

Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H. PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. Pathol. 2006 Apr 25[Epub ahead of print] ; 209(4):522-31 (2006)

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、細胞工学、2007 年 1 月号、株式

会社秀潤社

菅野 純、毒性の高精細解析に向けての
トキシコゲノミクス、医学のあゆみ
Vol.218 No.12 2006.9.16 p1035-6

2. 学会発表

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法の概略と生物研究への応用、九州大学医師研セミナー、2006 年 4 月 17 日、福岡

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールとしての Percellome System、第 95 回日本病理学会総会、2006 年 4 月 30 日-5 月 2 日、東京

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法*の概略と生物研究への応用、第 104 回熊本大学発生研・拠点形成 A セミナー、2006 年 6 月 5 日、熊本

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 15 日、東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年 7 月 3-5 日、名古屋

菅野 純、Percellom トキシコゲノミクス・プロジェクトの概要と基礎生物学への応用、明治薬科大学オープンカレッジ、2006 年 8 月 7 日、東京

菅野 純、中津則之、相崎健一、DEN 初期遺伝子応答から見た好発癌系 (C3H) と嫌発癌系 (B6) マウスの差異、第 65 回日本癌学会総会、2006 年 9 月 28-30 日、横浜

井上 薫、渋谷 淳、禹 桂炯、禹 麻美、富士本仁、高橋美和、菅野 純、五十嵐勝秀、広瀬雅雄、Kojic acid (KA) によるラット甲状腺発がん過程に特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第 65 回日本癌学会総会、2006 年 9 月 28-30 日、横浜

菅野 純、相崎健一、小川幸男、関田清司、北嶋 聡、ヒドロキシクエン酸による精巣毒性のトキシコゲノミクス解析、第 96 回病理学会総会、2007 年 3 月 13-15 日、大阪

Kanno Jun, Aisaki Ken-ichi,
Igarashi Katsuhide, Nakatsu Noriyuki,
Kitajima Satoshi, Kodama Yukio,
"PERCELLOME" TOXICOGENOMICS PROJECT
FOR THE MECHANISM-BASED TOXICOLOGY,
the SOT 46th Annual Meeting March
25-29, 2007

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得:

特になし

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他（データベース等）

該当しない

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

分担研究者 矢守 隆夫

財団法人癌研究会 癌化学療法センター分子薬理部 部長

要旨

ヒトがん細胞パネル JFCR39 を用いた薬剤感受性試験と情報処理を合わせたシステム **Cancer Cell Informatics**、抗がん物質の分子メカニズム予測手段としてその有用性が証明されている。本研究では、**Cancer Cell Informatics** が内分泌かく乱化学物質の評価にも使えるかどうかを検討した。核内受容体アゴニスト、アンタゴニストなど約 30 種について取得した Fingerprint のクラスター解析を行った。ターゲットの核内受容体を同じくする物質同士がクラスターを形成する傾向が見られた。**Cancer Cell Informatics** は、ターゲット既知の内分泌かく乱化学物質をレファレンスとすることによって、内分泌かく乱の分子メカニズム予測、あるいは生理作用未知の化合物のリスク評価に有用と考えられる。

A. 研究目的

新規化学物質の作用メカニズムを予測するシステム「**Cancer Cell Informatics**」を用い、内分泌かく乱化学物質の評価を行う。データベース内の機能既知の化学物質との比較検討を行い、細胞増殖阻害の分子機構解析を通じて内分泌かく乱分子機構の推測を行う。さらに標的依存性とリガンド依存性の両面に関する生物学的意義を明らかにする。

B. 研究方法

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がん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。「**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。

（倫理面への配慮）

本研究は培養細胞株を用いるものなので、倫理的問題が発生することはなかった。

C. 研究結果

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 と TTNPB が一つのクラスターを形成した。エストロゲンアゴニスト estradiol と dieldrin がクラスターを形成し、このクラスターはエストロゲンアンタゴニストの tamoxifen、toremifene が形成するクラスターとは異なっていた。PPAR アゴニストである Bis (2-ethylhexy) phthalate と troglitazone はさらにまた別のクラスターを形成した。スズ化合物も興味あるクラスターを示した。

D. 考察

核内受容体アゴニスト、アンタゴニストなど約 30 種について取得した Fingerprint のクラスター解析を行なった。ターゲットの核内受容体を同じくする物質同士がクラスターを形成する傾向が見られた。ターゲット既知の内分泌かく乱化学物質をレファレンスとすることによりヒトがん細胞パネルは内分泌かく乱化学物質の分子メカニズム予測に使えることが示唆された。さらに多くの核内受容体アゴニストをこの系で評価する必要がある。

E. 結論

Cancer Cell Informatics は、ターゲット既知の内分泌かく乱化学物質をレファレンスとすることに

よって、内分泌かく乱化学物質の分子メカニズム予測、あるいは生理作用未知の化合物のリスク評価に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (2003-06)

1. 論文発表

1) 書籍

矢守隆夫. 分子標的治療薬. クリニカルプラクティス 2007;26(3):231-2.

矢守隆夫. 分子標的治療薬の開発と発展. 日本病院薬剤師会雑誌 2007;43(1):63-7.

矢守隆夫. 分子標的治療法の開発と発展. 血液フロンティア 2006;16(9):1325-32.

矢守隆夫. 分子標的治療薬のオーバービュー. Drug Delivery System 2006;21(1):18-23.

2) 雑誌

Akashi T, Nishimura Y, Wakatabe R, Shiwa M, Yamori T. Proteomics-based identification of biomarkers for predicting sensitivity to a PI3-kinase inhibitor in cancer. Biochem Biophys Res Commun 2007;352(2):514-21.

Kimura H, Katoh T, Kajimoto T, Node M, Hisaki M, Sugimoto Y, Majima T, Uehara Y, Yamori T. Modification of pyrimidine derivatives from antiviral agents to antitumor agents. Anticancer Res 2006;26(1A):91-7.

Yaguchi S, Fukui Y, Koshimizu I, Yoshimi H, Matsuno T, Gouda H, Hirono S, Yamazaki K, Yamori T. Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. J Natl Cancer Inst 2006;98(8):545-56.

Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, Yamori T, Aoki J, Fujimaki T, Arai H. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. J Biol Chem 2006;281(25):17492-500.

Nakamura H, Kuroda H, Saito H, Suzuki R, Yamori T, Maruyama K, Haga T. Synthesis and biological evaluation of boronic acid containing cis-stilbenes as apoptotic tubulin polymerization inhibitors. ChemMedChem 2006;1(7):729-40.

Tanaka R, Wada S, Yamada T, Yamori T. Potent antitumor activity of 3,4-seco-8betaH-Fema-4(23),9(11)-dien-3-oic acid (EC-2) and 3,4-seco-Oleana-4(23),18-dien-3-oic acid (EC-4), evaluated by an in vitro human cancer cell line panel. Planta Med 2006;72(14):1347-9.

2. 学会発表

癌学会

清宮啓之, 村松由紀子, 佐藤重男, 田原栄俊, 矢守隆夫, 鶴尾隆. テロメラザー阻害剤 MST-312 の急性細胞増殖抑制効果. 第 65 回日本癌学会学術総会記事, P256 (O-420), 2006 (横浜)

明石哲行, 西村由美子, 若田部るみ, 志和美重子, 矢守隆夫. プロテオミクスによる薬剤感受性に関与するバイオマーカーの探索. 第 65 回日本癌学会学術総会記事, P282 (O-543), 2006 (横浜)

矢口信一, 吉見直, 高橋雅行, 小清水一郎, 松野俊行, 矢守隆夫. PI3 キナーゼを標的とする新規分子標的治療薬候補 ZSTK474 の薬物動態学/薬力学的検討. 第 65 回日本癌学会学術総会記事, P283 (O-544), 2006 (横浜)

且慎吾, 西村由美子, 矢口信一, 矢守隆夫. 新規 PI3 キナーゼ阻害剤 ZSTK474 による抗腫瘍効果

の分子機構の解析—トランスクリプトームによるアプローチ. 第 65 回日本癌学会学術総会記事, P283 (O-545), 2006 (横浜)

大槻崇, 石橋正己, 矢守隆夫, 林正彦, 小宮山寛幾. TRAIL レセプター誘導作用をもつセスキテルペンニ量体型ショウガ科植物成分(2). 第 65 回日本癌学会学術総会記事, P467 (P-1042), 2006 (横浜)

中村啓之, 且慎吾, 海野倫明, 矢守隆夫. PI3 キナーゼ触媒サブユニットサブタイプの mRNA 発見解析. 第 65 回日本癌学会学術総会記事, P484 (O-1125), 2006 (横浜)

がん分子標的治療研究会

大槻崇, 石橋正己, 矢守隆夫, 林正彦, 小宮山寛幾. TRAIL レセプター誘導作用をもつセスキテルペンニ量体型ショウガ科植物成分. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P99 (P7-4), 2006 (東京)

小島直人, 矢守隆夫. 抗腫瘍活性バンレイシ科アセトゲニン類の全合成と抗腫瘍活性評価. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P107 (P9-4), 2006 (東京)

横須賀章人, 矢守隆夫, 三巻祥造. ブラジル原産マメ科植物 *Atelecia Glazioviana* より単離された新規イソフラボン誘導體 *glaziovianin A* の構造と細胞毒性活性. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P108 (P9-5), 2006 (東京)

清宮啓之, 村松由紀子, 斉藤重男, 矢守隆夫, 鶴尾隆. テロメア維持機構をターゲットとしたがん治療. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P37 (SY4), 2006 (東京)

矢口信一, 山崎佳波, 福井泰久, 矢守隆夫. *Cancer*

Cell Informatics による標的同一法: 新規 PI3 阻害剤 ZSTK474 の認定を例に. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P38 (SY5), 2006 (東京)

青木淳賢, 矢守隆夫. オートタキシンはリゾホスファチジン酸受容体 LPA1 を介したグリオブラストーマ細胞の運動性を亢進する. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P40 (M1-2), 2006 (東京)

馬島哲夫, 矢守隆夫, 鶴尾隆. ヒト癌細胞におけるアポトゾーム経路亢進とこれを標的とした癌選択的細胞死誘導: 癌分子標的としてのアシル CoA シンターゼ. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P41 (M1-4), 2006 (東京)

市川和洋, 矢守隆夫, 鶴尾隆, 内海英雄. 移植癌モデルマウスにおけるレドックス同時画像解析. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P59 (S4-3), 2006 (東京)

山崎佳波, 且慎吾, 矢口信一, 福井泰久, 矢守隆夫. PI3 キナーゼを分子標的とする抗腫瘍化合物 ZSTK474: (1) *Cancer Cell Informatics* によるターゲット予測. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P79 (P2-4), 2006 (東京)

小清水一郎, 矢口信一, 吉見直, 松野俊行, 渡辺哲夫, 矢守隆夫. PI3 キナーゼを分子標的とする抗腫瘍化合物 ZSTK474: (2) PI3 キナーゼ阻害の特異性と阻害経路の解析. 第 10 回がん分子標的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P80 (P2-5), 2006 (東京)

吉見直, 矢口信一, 小清水一郎, 松野俊行, 渡辺哲夫, 矢守隆夫. PI3 キナーゼを分子標的とする抗腫瘍化合物 ZSTK474: (3) *in vivo* 抗がん効果

とその分子メカニズム解析. 第 10 回がん分子標
的治療研究会総会 プログラム・抄録集, P80
(P2-6), 2006 (東京)

日本薬学会

若松猪策無, 中津則之, 山崎佳波, 菅野純, 矢守
隆夫. ヒトがん細胞パネルによる毒性化合物の機
能予測. 日本薬学会第 126 回年会, 2006 (仙台)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得:

特になし

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他 (データベース等)

該当しない