

Table 9-3 Relative organ weight in male rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection	CCA		CCA	
				1	6	10	6
Pituitary	(mg/100gBW)		3.23±0.67	3.02±1.12	3.10±0.61		
Thyroid-R	(mg/100gBW)		3.28±0.86	2.82±0.79	3.25±0.72		
Thyroid-L	(mg/100gBW)		2.52±0.63	2.60±0.58	3.30±0.72		
Thyroid-R&L	(mg/100gBW)		5.78±0.83	5.40±1.05	6.53±1.40		
Adrenal-R	(mg/100gBW)		8.80±1.58	9.20±1.10	9.10±0.65		
Adrenal-L	(mg/100gBW)		9.50±1.74	9.62±1.07	9.87±0.98		
Adrenal-R&L	(mg/100gBW)		18.27±3.32	18.80±2.02	18.97±1.52		
Testis-R	(mg/100gBW)		462.3±61.6	452.3±45.8	470.7±60.5		
Testis-L	(mg/100gBW)		466.3±64.9	458.0±44.6	476.3±58.0		
Testis-R&L	(mg/100gBW)		928.8±126.3	910.2±90.7	947.3±118.1		
Thymus	(mg/100gBW)		119.7±23.8	126.0±23.8	138.5±30.9		
Submand.-R	(mg/100gBW)		92.3±11.3	92.8±7.4	92.7±7.1		
Submand.-L	(mg/100gBW)		92.5±10.9	93.0±6.4	92.8±8.1		
Submand.-R&L	(mg/100gBW)		184.8±21.7	186.0±13.3	185.2±14.3		
Spleen	(mg/100gBW)		198.5±10.8	196.7±29.4	221.3±39.3		
Brain	(mg/100gBW)		596.7±53.5	596.3±65.5	608.3±36.9		
Heart	(mg/100gBW)		387.7±24.3	368.3±34.5	380.3±30.8		
Lung	(mg/100gBW)		340.3±19.5	356.3±46.2	355.2±22.1		
Liver	(g/100gBW)		3.193±0.180	3.107±0.169	3.132±0.150		
Kidney-R	(mg/100gBW)		431.8±17.2	424.2±49.1	437.2±24.2		
Kidney-L	(mg/100gBW)		426.7±8.2	429.2±42.7	440.2±24.2		
Kidney-R&L	(mg/100gBW)		858.3±19.0	853.0±90.4	877.2±46.7		
Epididy.-R	(mg/100gBW)		124.0±18.1	125.3±19.4	124.3±15.1		
Epididy.-L	(mg/100gBW)		121.2±17.9	120.3±17.2	124.0±15.0		
Epididy.-R&L	(mg/100gBW)		245.0±34.7	245.3±35.4	248.3±30.5		
Sem. Vesic.	(mg/100gBW)		322.0±43.2	307.2±55.4	343.8±40.1		
Prostate	(mg/100gBW)		277.2±40.5	257.2±30.4	282.3±26.1		

Values are expressed as the mean ± S.D.

Not significantly different from Water for injection.

Table 9-4 Relative organ weight in female rats

Group	Dose(mg/kg)	Water for injection	CCA		CCA	
			1	6	10	6
Pituitary	(mg/100gBW)	5.80±0.94	6.58±1.22	6.65±1.09		
Thyroid-R	(mg/100gBW)	3.80±1.41	3.43±0.50	3.53±0.73		
Thyroid-L	(mg/100gBW)	3.27±0.59	3.32±0.56	3.15±0.63		
Thyroid-R&L	(mg/100gBW)	7.07±1.80	6.77±0.98	6.68±1.35		
Adrenal-R	(mg/100gBW)	16.88±1.63	16.15±1.73	17.83±1.73		
Adrenal-L	(mg/100gBW)	17.47±1.65	17.17±1.28	20.02±2.50		
Adrenal-R&L	(mg/100gBW)	34.35±3.04	33.37±2.89	37.87±4.19		
Ovary-R	(mg/100gBW)	17.17±2.60	20.22±3.36	18.40±2.31		
Ovary-L	(mg/100gBW)	19.65±2.93	19.55±3.39	18.30±3.25		
Ovary-R&L	(mg/100gBW)	36.83±4.62	39.77±6.45	36.72±4.88		
Thymus	(mg/100gBW)	192.0±26.1	173.7±12.8	175.7±33.3		
Submand.-R	(mg/100gBW)	97.3±7.0	101.0±9.7	102.7±7.6		
Submand.-L	(mg/100gBW)	93.7±6.3	99.3±8.7	99.3±7.6		
Submand.-R&L	(mg/100gBW)	191.2±12.7	200.5±17.8	201.8±15.1		
Spleen	(mg/100gBW)	234.2±33.8	224.7±16.6	218.2±14.2		
Brain	(mg/100gBW)	889.3±61.6	874.5±72.3	913.5±80.5		
Heart	(mg/100gBW)	396.5±19.4	424.3±40.5	411.2±32.2		
Lung	(mg/100gBW)	477.8±14.9	477.8±29.4	462.3±19.8		
Liver	(g/100gBW)	3.142±0.145	3.245±0.217	3.182±0.181		
Kidney-R	(mg/100gBW)	439.5±41.3	433.0±48.3	450.3±30.5		
Kidney-L	(mg/100gBW)	433.5±35.0	424.5±47.6	439.5±33.3		
Kidney-R&L	(mg/100gBW)	872.8±70.6	857.5±94.7	890.2±60.6		
Uterus	(mg/100gBW)	185.5±43.9	167.2±30.6	220.0±69.1		

Values are expressed as the mean \pm S.D.
Not significantly different from Water for injection.

Table 10 - 1 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	10
	No. of animals examined	6	6	6
Application site(dorsal skin) :	[N=]	6	0 a	6
Erosion/ulcer		0	-	3
Hyperplasia, epidermis		0	-	1
Heart :	[N=]	6	0 a	6
Myocarditis		1	-	0
Kidney :	[N=]	6	0 a	6
Luminal dilatation, proximal tubule, pars convoluta		1	-	0
Epididymis :	[N=]	6	1 a	6
Sperm granuloma		1	1	0
Eye :	[N=]	6	0 a	6
Atrophy, retina		0	-	1
Skin(abdominal) :	[N=]	6	0 a	6
Bone marrow(sternum) :	[N=]	6	0 a	6
Bone marrow(femur) :	[N=]	6	0 a	6
Spleen :	[N=]	6	0 a	6
Thymus :	[N=]	6	0 a	6
Lymph node(cervical) :	[N=]	6	0 a	6
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	6	0 a	6
Bone(sternum) :	[N=]	6	0 a	6
Bone(femur) :	[N=]	6	0 a	6
Muscle(m. quadriceps femoris) :	[N=]	6	0 a	6
Trachea :	[N=]	6	0 a	6
Lung :	[N=]	6	0 a	6
Artery(aorta) :	[N=]	6	0 a	6
Tongue :	[N=]	6	0 a	6
Sublingual gland :	[N=]	6	0 a	6
Submandibular gland :	[N=]	6	0 a	6
Esophagus :	[N=]	6	0 a	6
Forestomach :	[N=]	6	0 a	6
Glandular stomach :	[N=]	6	0 a	6
Duodenum :	[N=]	6	0 a	6
Jejunum :	[N=]	6	0 a	6
Ileum :	[N=]	6	0 a	6
Cecum :	[N=]	6	0 a	6
Colon :	[N=]	6	0 a	6
Rectum :	[N=]	6	0 a	6
Liver :	[N=]	6	0 a	6
Pancreas :	[N=]	6	0 a	6
Urinary bladder :	[N=]	6	0 a	6
Testis :	[N=]	6	0 a	6
Seminal vesicle :	[N=]	6	0 a	6
Prostate :	[N=]	6	0 a	6
Pituitary :	[N=]	6	0 a	6
Thyroid :	[N=]	6	0 a	6
Parathyroid :	[N=]	6	0 a	6

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

Table 10 - 2 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	10
	No. of animals examined	6	6	6
<Continued from previous page>				
Adrenal :	[N=]	6	0 a	6
Cerebrum :	[N=]	6	0 a	6
Cerebellum :	[N=]	6	0 a	6
Pons :	[N=]	6	0 a	6
Medulla oblongata :	[N=]	6	0 a	6
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	6	0 a	6
Nerve(sciatic) :	[N=]	6	0 a	6
Lacrimal gland :	[N=]	6	0 a	6
Harderian gland :	[N=]	6	0 a	6

[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

Table 10 - 3 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	10
	No. of animals examined	6	6	6
Application site(dorsal skin) :	[N=]	6	0 a	6
Erosion/ulcer		0	-	6 **
Skin(abdominal) :	[N=]	6	0 a	6
Mammary gland :	[N=]	6	0 a	6
Bone marrow(sternum) :	[N=]	6	0 a	6
Bone marrow(femur) :	[N=]	6	0 a	6
Spleen :	[N=]	6	0 a	6
Thymus :	[N=]	6	0 a	6
Lymph node(cervical) :	[N=]	6	0 a	6
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	6	0 a	6
Bone(sternum) :	[N=]	6	0 a	6
Bone(femur) :	[N=]	6	0 a	6
Muscle(m. quadriceps femoris) :	[N=]	6	0 a	6
Trachea :	[N=]	6	0 a	6
Lung :	[N=]	6	0 a	6
Heart :	[N=]	6	0 a	6
Artery(aorta) :	[N=]	6	0 a	6
Tongue :	[N=]	6	0 a	6
Sublingual gland :	[N=]	6	0 a	6
Submandibular gland :	[N=]	6	0 a	6
Esophagus :	[N=]	6	0 a	6
Forestomach :	[N=]	6	0 a	6
Glandular stomach :	[N=]	6	0 a	6
Duodenum :	[N=]	6	0 a	6
Jejunum :	[N=]	6	0 a	6
Ileum :	[N=]	6	0 a	6
Cecum :	[N=]	6	0 a	6
Colon :	[N=]	6	0 a	6
Rectum :	[N=]	6	0 a	6
Liver :	[N=]	6	0 a	6
Pancreas :	[N=]	6	0 a	6
Kidney :	[N=]	6	0 a	6
Urinary bladder :	[N=]	6	0 a	6
Ovary :	[N=]	6	0 a	6
Uterus :	[N=]	6	0 a	6
Vagina :	[N=]	6	0 a	6
Pituitary :	[N=]	6	0 a	6
Thyroid :	[N=]	6	0 a	6
Parathyroid :	[N=]	6	0 a	6
Adrenal :	[N=]	6	0 a	6
Cerebrum :	[N=]	6	0 a	6
Cerebellum :	[N=]	6	0 a	6
Pons :	[N=]	6	0 a	6
Medulla oblongata :	[N=]	6	0 a	6
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	6	0 a	6

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 10 - 4 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	10
	No. of animals examined	6	6	6
<Continued from previous page>				
Nerve(sciatic) :	[N=]	6	0 a	6
Eye :	[N=]	6	0 a	6
Lacrimal gland :	[N=]	6	0 a	6
Harderian gland :	[N=]	6	0 a	6

[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

16. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける反復経口・経皮投与毒性
試験：肝メタロチオネインの遺伝子解析

分担研究者 原田 孝則 （財）残留農薬研究所 毒性部長
協力研究者 武田眞記夫 （財）残留農薬研究所 毒性部分子毒性研究室長
大塚 亮一 （財）残留農薬研究所 毒性部分子毒性研究室研究員

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットを用いた反復経口・経皮投与試験における肝メタロチオネインの遺伝子発現の曝露経路差を検索するため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析及び real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析を実施した。加えて、反復経口投与試験で認められた metallothionein 1 の遺伝子発現抑制（平成 16 年度報告）のメカニズムを検索するため免疫沈降法による DNA プロモーター領域のメチル化の解析を実施した。その結果、肝臓の網羅的遺伝子解析では、経口・経皮の両経路で共通した遺伝子発現は alpha-1-acid glycoprotein のみで、CCA 曝露に起因する遺伝子発現は曝露経路によりかなり異なることが示唆された。また、経口曝露ではグルタチオン関連遺伝子の発現亢進が認められ、CCA による肝グルタチオン枯渇の可能性が示唆された。経口曝露による肝遺伝子発現の定量解析では、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）関連遺伝子の発現亢進及び DNA のメチル化維持に関与する遺伝子の発現抑制が認められた。一方、メタロチオネインの DNA プロモーター領域のメチル化解析では、CCA の高用量経口投与群において Histone H3K4 のメチル化が対照群に比べ約 7 倍低い値を示した。このことから、CCA の経口曝露では DNA プロモーター領域の Histone H3K4 が脱メチル化され、その結果としてメタロチオネインの発現が抑制（down-regulation）される可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、平成 16 年度に実施したクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットを用いた反復経口・経皮投与毒性試験^{1,2)}において認められた肝メタロチオネインの遺伝子発現の曝露経路による差異（経口経路では抑制、経皮経路では亢進）

の原因を明らかにすることを目的に実施された。

B. 研究方法

CCA の反復経口・経皮曝露ラットの肝臓におけるメタロチオネインの遺伝子発現の経路差を検索する目的で、マイクロアレイ

による網羅的遺伝子解析ならびに real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析を実施した。加えて、反復経口投与試験で認められた metallothionein 1 の遺伝子発現抑制（平成 16 年度報告）¹⁾ のメカニズムを検索するため免疫沈降法による DNA プロモーター領域のメチル化の解析を実施した。以下に材料及び方法を示す。

1. マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

平成 16 年度に実施したラットにおける CCA の反復経口投与毒性試験 (IET04-0095)¹⁾ および反復経皮投与毒性試験 (SBL94-83)²⁾ から得られた肝サンプルを用いてマイクロアレイによる網羅的解析を実施した。供試サンプルは、両曝露経路とも 4 週間曝露後の高用量群（経口：80 mg/kg、経皮：100 mg/kg）及び対照群の雌性ラットの肝臓から抽出した total RNA サンプルを使用した。各曝露経路の各群あたり 3 枚のアレイスライド (IntelliGene、タカラバイオ株式会社、滋賀県) を用いた。スライド間の誤差を補正するために、リファレンスとして対照群のサンプルをプールし、Cy3 色素で標識した。また、サンプルとして高用量群および対照群から各 3 種類の mixed sample を作製し、Cy5 色素で標識した¹⁾。Cy3 標識リファレンスおよび Cy5 標識サンプルを混合し、アレイスライドでハイブリダイゼーションさせた後、ScanArray lite (Perkin-Elmer Bioscience Japan、東京都) で解析し、2 倍以上もしくは 0.5 倍以下の差を採用した。

2. Real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析

前項 1. のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析結果から、CCA の経口曝露による肝臓への影響として glutathione の枯渇の可能性が示唆されたので、反復経口投与毒性試験¹⁾ の各用量群の雌性ラットの肝 total RNA サンプルに関して、Real-time PCR 法を用いグルタチオンの枯渇および低メチル化 (CCA の構成成分であるヒ素の影響の可能性が高い) に関連する以下の遺伝子の定量解析を実施した。

① Glutathione-S-transferase, type Yb (accession No.; X78847)

Forward primer:

GGACCCAGGCATTGTGGA

Reverse primer:

CAGGCTGAAGAACTTCTTCACTGT

TaqMan probe:

TTCCTCTGCTAAAGGCCCTGAGAACC

② Glutathione-S-transferase, alpha type 2 (accession No.; NM_017013)

Forward primer:

TTTGATGAGAAGTTTATACAGAGTCCAGA

Reverse primer:

ACCATGGGCACTTGGTCAA

TaqMan probe:

TGGAAAAGCTAAAGAAAAGACGGGAATTTGA

③ Glutathione-S-transferase pi1 (accession No.; NM_012577)

Forward primer:

TTCACCAGATCTCGGAATGGA

Reverse primer:

ACACAGCCCTGGGCACAT

TaqMan probe:

CTCCAGCTCCTGCGGCTGCAA

④11-zinc finger protein CCCTC-binding factor (accession No.; NM_031824)

Forward primer:

GTCCCCACTGTGACACTGTCA

Reverse primer:

ACACAGCATCACAGTAGCGACAT

TaqMan probe:

AGTGATTTGGGTGTCCACTTGAGAAAGCA

⑤DNA Methyltransferase 1 (accession No.; NW_053354)

Forward primer:

ACCAGGCAGACCACCATCA

Reverse primer:

TGCGTTTCCCTTTTCAGAGTCT

TaqMan probe:

TCACTTCAAGGGTCCCGCTAAACGG

⑥DNA Methyltransferase 2 (accession No.; NW_001031643)

Forward primer:

AGAAATTGCAAATCTCCTGGGAT

Reverse primer:

CAGCCGGTAACGCTGCTT

TaqMan probe:

TCCTCCAGAAATTTGGGTTTCTGAGAAGA

(1)スタンダードの調製

各プライマーセットを用い、それぞれの遺伝子に対応する定量解析用のスタンダードを作製した。肝臓から抽出した total RNA を 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製し、0.5 μg を 50 μL 反応系で TaqMan RT reagents (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)を用い逆転写した。それぞれの遺伝子ごとに、cDNA、上記プライマーセット、AmpliTaq Gold PCR Master Mix に Pyrogard 水 (ミ

リポア株式会社、東京都) を加え 50 μL に調製し、PCR サーマルサイクラー (タカラバイオ株式会社、東京都) を用い PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を QIAGEN Quick PCR Purification Kit (株式会社キアゲン) を用い精製し、濃度確認後、終濃度 10 nM に調製し、使用時まで -70°C 以下で凍結保存した。

(2)逆転写反応

定量解析用の cDNA として、肝臓から抽出した total RNA を 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製し、0.4 μg を 40 μL 反応系で TaqMan RT reagents を用い逆転写し、使用時まで -70°C 以下で凍結保存した。

(3)定量的 PCR 反応 (

スタンダードの 10 段階希釈系列を作製し、連続する 5 点を用いた。スタンダード系列もしくは cDNA にプローブ・プライマーセット、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)、Pyrogard 水を加え 25 μL に調製し、PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用い定量的 PCR 反応を実施した。

3. メタルチオネインの DNA プロモーター領域のメチル化解析

CCA の反復経口投与毒性試験¹⁾の高用量群 (80 mg/kg) と対照群の雌性ラットの肝臓について、metallothionein 1 の遺伝子発現抑制 (平成 16 年度報告書) メカニズムを検索するために、免疫沈降法によるプロモーター解析を実施した。

(1)メチル化 DNA の免疫沈降

肝臓から抽出した DNA をサンプルとして用い、Methylated DNA Capture Kit (Epigentek Group Incorporation, NY, USA)によりメチル化 DNA の免疫沈降を実施した。Bioruptor (コズモバイオ、東京都)を用い、2 µg の DNA を、power : high、on : 20 秒、off : 1 分間、7 サイクルの条件で超音波切断した。切断 DNA の一部を input DNA とし、残りにキット付属の抗メチル化シトシン抗体を加え、免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルおよび input DNA サンプルからキット付属のスピンカラムを用い DNA を精製した。

(2)メチル化 histone H3/K4 の免疫沈降

凍結肝臓サンプル (最高用量群および対照群) を用い、Tissue Methyl-Histone H3/K4 CHIP Kit (Epigentek Group Incorporation, NY, USA)によりメチル化 histone H3/K4 の免疫沈降を実施した。20 mg の肝組織をホルムアルデヒド (和光、東京都) で 10 分間クロスリンクし、Bioruptor (コズモバイオ、東京都)を用い、クロスリンクしたサンプルを、power : middle、on : 30 秒、off : 1 分間、6 サイクルの条件で超音波切断した。切断サンプルの一部を input DNA とし、残りにキット付属の抗メチル化 histone H3/K4 抗体を加え、免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルおよび input DNA サンプルからキット付属のスピンカラムを用い DNA を精製した。

(3)定量的 PCR

図 1 に示すように、ラット metallothionein 1 のプロモーターからエクソン 1 を含む領域に CpG island が存在し、

TaqMan probe をその中に一つ (TaqMan probe 2)、さらに、その 5' 側に一つ (TaqMan probe 1) 以下の配列で設計した。

①TaqMan probe 1

Forward primer:

GGCATAATCATCATATCGCACAGT

Reverse primer:

CATTGGTTTCACGCGTACTCAGA

TaqMan probe:

AGGTCCTATAACAGTTAAGC

②TaqMan probe 2

Forward primer:

GAGAGCAGACTGTCCGCTAAGC

Reverse primer:

GTGAATCTGGAGCAACGGTGTA

TaqMan probe:

CATCCCGACTTCAGC

(4)スタンダードの調製

各プライマーセットを用い、それぞれの DNA 領域に対応する定量解析用のスタンダードを作製した。肝臓から抽出した DNA を 0.1 µg / µL に調製し、上記プライマーセット、AmpliTaq Gold PCR Master Mix に Pyrogard 水 (ミリポア株式会社、東京都) を加え 50 µL に調製し、PCR サーマルサイクラー (タカラバイオ株式会社、東京都) を用い PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を QIAGEN Quick PCR Purification Kit (株式会社キアゲン) を用い精製し、濃度確認後、終濃度 10 nM に調製し、使用時まで -70°C 以下で凍結保存した。

(5)定量的 PCR 反応

スタンダードの 10 段階希釈系列を作製

し、連続する 5 点を用いた。スタンダード系列もしくはサンプル DNA にプローブ・プライマーセット、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)、Pyrogard 水を加え 25 μ L に調製し、PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用いて定量的 PCR 反応を実施した。メチル化の頻度は、免疫沈降サンプル中の標的 DNA 量と input DNA サンプル中の標的 DNA 量との割合 (%) で算出した。

4. 有意差検定

遺伝子の定量的解析結果について、先ず Bartlett の等分散検定を行なった。その後、等分散の場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett の多重比較法により対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて平均順位の有義差の有無を判定した。なお、2 群間の比較においては Student's t-test を用いて解析した。

対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の判定は、危険率 5% および 1% レベルで行った。

C. 研究結果

1. マイクロアレイによる肝臓の網羅的遺伝子解析 (表 1、2)

反復経口・経皮曝露ラットの肝臓から抽出

した total RNA サンプルを用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を実施した結果、表 1 及び 2 に示すように、両経路で共通した遺伝子発現は肝障害マーカーのひとつである alpha-1-acid glycoprotein のみであった。メタロチオネインの遺伝子発現に関しては、経口曝露では抑制傾向 (down-regulation) を、経皮曝露では軽微ながら up-regulation の傾向を示した。その他、経口曝露では Glutathione-S-transferase, alpha_type と Glutathione-S-transferase, mu_type_2 (Yb2) の発現亢進が認められ、CCA 曝露による肝グルタチオン枯渇の可能性が示唆された。

2. Real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析 (表 3)

前項 1. のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析結果から、CCA の経口曝露による肝臓への影響として glutathione の枯渇の可能性が示唆されたので、反復経口投与毒性試験¹⁾の各用量群の雌性ラットの肝 total RNA サンプルに関して、Real-time PCR 法を用いてグルタチオンの枯渇および低メチル化 (CCA の構成成分であるヒ素による影響の可能性が高い) に関連する遺伝子の定量解析を実施した。

その結果、表 3 に示すようにグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) ファミリーに属する遺伝子 (GSTP1、GSTYb、GSTa2) の発現亢進 (up-regulation) 及び DNA のメチル化維持に関与する遺伝子 (Dnmt 1、Dnmt 2、CTCF) の発現抑制 (down-regulation) が中・高用量群において認められた。

3. メタルチオネインの DNA プロモーター領域のメチル化解析 (表 4)

メタルチオネインの DNA プロモーター領域には全長 600 bp 以上の CpG island が存在し、それより上流部位を認識する TagMan probe set (MT-1) ならびに CpG island に含まれる部位を認識する TagMan probe set (MT-2) を用い、メチル化の解析を実施した。その結果、表 4 に示すように対照群及び高用量群 (80 mg/kg) とともに、この領域におけるメチル化は低いことが判明した。

そこで、さらにメタルチオネインの DNA プロモーター領域の Histone H3K4 のメチル化をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用い解析した。その結果、同メチル化は対照群 13.4% に対し高用量群 (80 mg/kg) では 2.0% であった。

D. 考察

CCA の反復経口・経皮曝露ラットの肝臓におけるメタルチオネインの遺伝子発現の経路差を検索する目的で、マイクロアレイによる網羅的解析ならびに real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析を実施した。加えて、反復経口投与試験で認められた metallothionein 1 の遺伝子発現抑制 (平成 16 年度報告) のメカニズムを検索するため免疫沈降法による DNA プロモーター領域のメチル化の解析を実施した。

マイクロアレイによる肝 total RNA サンプルの網羅的遺伝子解析では、反復経口・経皮の両経路で共通した遺伝子発現は肝障害マーカーのひとつである alpha-1-acid glycoprotein のみであった。このことは、CCA 曝露に起因する肝臓の遺伝子発現は基本的に曝露経路 (経口 vs 経皮) により大き

く異なることを示唆しているものと解釈された。一方、メタルチオネインの遺伝子発現に関しては、経口曝露では抑制傾向 (down-regulation) を、経皮曝露では軽微ながら亢進傾向 (up-regulation) を示し、平成 16 年度の研究結果^{1,2)}と一致した。その他、経口曝露では Glutathione-S-transferase, alpha_type と Glutathione-S-transferase, mu_type_2 (Yb2) の発現亢進が認められ、CCA 曝露による肝グルタチオン枯渇の可能性が示唆された。

Real-time PCR 法による反復経口曝露ラットの肝遺伝子発現の定量解析では、グルタチオンの枯渇および低メチル化 (CCA の構成成分であるヒ素による影響の可能性が高い) に関連する遺伝子の定量解析を実施した。その結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) ファミリーに属する遺伝子 (GSTP1、GSTYb、GSTa2) の発現亢進 (up-regulation) 及び DNA のメチル化維持に参与する遺伝子 (Dnmt 1、Dnmt 2、CTCF) の発現抑制 (down-regulation) が中・高用量群において認められた。CCA の構成成分であるヒ素は、SH 基切断によりグルタチオンの枯渇あるいはメチル基との結合による DNA の低メチル化を招来することが知られている^{4,5)}。従って、上記の GST 及びメチル化関連遺伝子発現はヒ素による影響を反映した変化と考えられた。

メタルチオネインの DNA プロモーター領域の解析では、CpG island より上流部位を認識する TagMan probe set (MT-1) ならびに CpG island に含まれる部位を認識する TagMan probe set (MT-2) を用い、メチル化の解析を実施した。その結果、対照群及び高用量群 (80 mg/kg) とともに、この領域

におけるメチル化は低いことが判明した。一方、Histone H3K4 のメチル化をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用い解析した結果、同メチル化は対照群 13.4% に対し高用量群 (80 mg/kg) では 2.0% であった。このことから、CCA の経口投与により DNA プロモーター領域の Histone H3K4 が脱メチル化され、その結果としてメタルチオネインの発現が抑制 (down-regulation) された可能性が推察された。

E. 結論

CCA 曝露による肝臓メタルチオネイン発現の経路差 (経口で抑制、経皮で亢進) に関しては、メタルチオネインの DNA プロモーター領域の Histone H3K4 のメチル化が関与している可能性が示唆された。

F. 引用文献

- 1) 原田孝則: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける反復経口投与毒性試験、「木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究」、厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業、平成 16 年度総括・分担研究報告書、pp.9-70、2005 年 3 月
- 2) 原田孝則: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける反復経皮投与毒性試験、「木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究」、厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業、平成 16 年度総括・分担研究報告書、pp.71-144、2005 年 3 月

- 3) Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, and Speed TP: Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acid Research* 30(4): 2-10, 2002
- 4) Gwaltney-Brant SM: Heavy metals. In: *Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, eds.), Academic Press, San Diego, pp. 701-733, 2002.
- 5) Goyer RA and Clarkson TW: Toxic effects of metals. In: *Casarett & Doull's Toxicology* (Klaassen CD, ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 811-867, 2001.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. ラット・メタロチオネイン1のプロモーターおよびエクソン1領域の模式

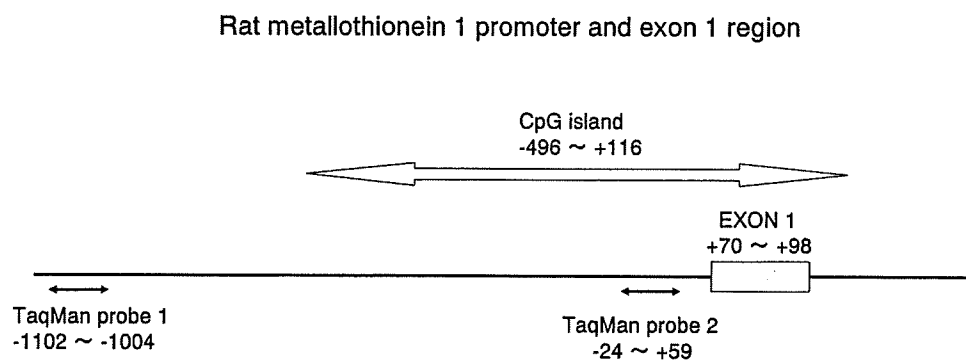


Table 1. Microarray analysis of gene expression in the liver from a repeated oral dose study of CCA in rats
 Females at 80 mg/kg/day after 4 weeks of treatment

Gene name	location	GenBank	Mixed sample 1	Mixed sample 2	Mixed sample 3	Average
Glutathione-S-transferase_alpha_type	3	X78847	0.636	0.474	0.504	0.538
Metallothionein	8	J00750	0.636	0.474	0.504	0.538
Glutamate-cysteine_ligase_(gamma-glutamylcysteine_synthetase)_regulatory	57	L22191	1.981	1.784	1.777	1.929
Rat_messenger_encoding_alpha-1-acid_glycoprotein	123	J00696	1.643	1.780	1.625	1.985
Rat_mRNA_for_ribosomal_protein_L35a	183	X03475	1.643	1.780	1.625	1.985
Hypoxanthine_phosphoribosyl_transferase	210	X62085	1.546	1.909	1.625	2.000
Rattus_norvegicus_mRNA_for_NaPi-2_beta_complete_cds	251	AB013454	1.546	1.909	1.625	1.985
R.norvegicus_mRNA_for_ribosomal_protein_L41	267	X82550	1.546	1.909	1.625	1.985
Aldehyde_dehydrogenase_1_(phenobarbital_inducible)	320	AF001898	1.546	1.909	1.625	1.985
Rat_insulin-like_growth_factor_I_(IGF-I)_mRNA_complete_cds	333	M15651	0.541	0.518	0.472	0.511
Lactate_dehydrogenase_A	394	X01964	0.462	0.610	0.489	0.520
Glutathione-S-transferase_mu_type_2_(Yb2)	400	M28241	0.462	0.610	0.489	0.520
R.norvegicus_mRNA_for_pI_6.1_esterase_(ES-10)	464	X51974	0.462	0.610	0.489	0.520
Rattus_norvegicus_ventral_midline_antigen_VEMA_mRNA_complete_cds	487	U63315	0.462	0.610	0.489	0.520
Rattus_norvegicus_cytochrome_P450_3A9_mRNA_complete_cds	540	U46118	0.617	0.499	0.273	0.463
Rattus_norvegicus_epidermal_growth_factor_receptor_(Egfr)_mRNA_complete_cds	552	M37394	0.504	0.460	0.443	0.469
Complement_component_3	555	X52477	0.487	0.506	0.460	0.484

Table 2. Microarray analysis of gene expression in the liver from a repeated dermal dose study of CCA in rats
 Females at 100 mg/kg/day after 4 weeks of treatment

Gene name	location	GenBank	Mixed sample 1	Mixed sample 2	Mixed sample 3	Average
Metallothionein	8	X78847	1.836	1.745	1.991	1.857
Serine_protease_inhibitor	20	M73231	0.430	0.283	0.297	0.337
Rat_microsomal_aldehyde_dehydrogenase_mRNA_complete_cds	55	M73714	0.467	0.581	0.461	0.503
Rat_messenger_encoding_alpha_l-acid_glycoprotein	123	J00696				
Rat_hydroxysteroid_sulfotransferase_mRNA_complete_cds	149	M31363	0.425	0.531	0.357	0.438
Rat_cytochrome_P-450j_mRNA_complete_cds	162	J02627	0.331	0.249	0.236	0.272
Rat_mRNA_for_contrapsin-like_protease_inhibitor_related_protein(CPi-26)	164	X16359				
AcyI_CoA_synthetase_long_chain	175	D90109	0.559	0.424	0.342	0.441
Rattus_norvegicus_mRNA_for_hydroxysteroid_sulfotransferase_subunit_complete_cds	263	D14989	0.403	0.616	0.392	0.470
Fibrinogen_gamma_polypeptide	435	J00734				
Superoxide_dimutase_2_mitochondrial	553	X56600	1.735684		1.987	

Table 3. Absolute values of gene expression level in the liver - Group mean values in female rats after 28 days of treatment (f mol / g RNA)

Dose		GSTP1	GSTYb	GSTa2	Dnmt1	Dnmt2	CTCF
0	Mean	574.49	321.54	5876.77	71.36	16.46	144.88
	SD	186.25	143.17	1787.63	10.59	2.88	16.72
8	Mean	643.76	490.43	7429.02	56.85	15.50	132.44
	SD	187.15	211.82	1772.60	19.04	3.29	22.79
40	Mean	766.61	1248.59 **	16427.19 **	41.65 **	15.66	109.24 **
	SD	274.41	294.76	3769.07	10.23	2.96	22.08
80	Mean	2096.23 **	1702.54 **	19860.79 **	23.64 **	11.50 **	72.44 **
	SD	1397.37	627.01	10727.92	6.58	3.78	15.75

Table 4. Ratio of DNA methylation level in the liver - Group mean values in female rats after 28 days of treatment (%)

Dose		MT-1	MT-2
0	Mean	0.059	0.045
	SD	0.030	0.024
80	Mean	0.044	0.030
	SD	0.034	0.026

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

17. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）処理木材からの有効成分の
土壌汚染状況調査

分担研究者 原田孝則（財）残留農薬研究所 毒性部長

研究要旨

CCA 処理木材からの環境汚染状況を把握するため、処理木材の設置から 20 年以上経過した鉄道沿線（枕木）、公園の遊具直下、民家の庭（鉄道の枕木をガーデニングに再利用）の土壌を採取し、有効成分の銅、クロム、ヒ素について定量分析を行った。その結果、土壌（乾燥土壌）中の濃度（mg/kg）は、鉄道沿線で銅 2.6、クロム 0.29、ヒ素 0.01 以下、公園では銅 3.3、クロム 0.14、ヒ素 0.04、民家で銅 0.73、クロム 0.29、ヒ素 0.12 であった。これらの値は、概ね土壌環境基準値に合致し、大きく逸脱するものはなく、特に問題は認められなかった。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤であるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）で処理された木材からの有効成分（クロム、銅、ヒ素）の土壌への汚染状況を調査することを目的とした。

採取した土壌サンプルについて、室温で 1 週間放置したものを風乾土とした。

②含水率の測定

風乾土について 105 °C で 2 時間加熱前後の重量を測定し、含水率を算出した。

B. 研究方法

CCA 処理木材の設置から 20 年以上経過した鉄道沿線（枕木）、公園の遊具直下、民家の庭（鉄道の枕木をガーデニングに再利用）の土壌（各場所につき 1 点ずつ）を採取し、有効成分の銅、クロム、ヒ素について定量分析を行った。

③土壌抽出液の調製

風乾土 10 g を 100 ml のポリエチレン製容器に秤量し、0.1 mol/L 塩酸 50 ml を加えて 30 °C で 1 時間振とう抽出し、その抽出液をろ紙（No.5A[東洋濾紙株式会社]）でろ過し、土壌抽出液とした。

1. 土壌の前処理

①風乾土の調製

2. 土壌中のクロム及び銅の定量試験

①試料溶液の調製

土壌抽出液を試料溶液とした。

②標準溶液の調製

市販のクロム標準液(Cr100 $\mu\text{g/ml}$)及び銅標準液(Cu100 $\mu\text{g/ml}$)を1%硝酸で希釈してクロムの0.0、0.01、0.05、0.1及び0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溶液並びに銅の0.0、0.05、0.1、0.5及び1.0 $\mu\text{g/ml}$ 溶液を作成し、標準溶液とした。

③誘導結合プラズマ発光分析装置によるクロム及び銅の測定

試料溶液及び標準溶液について、内部標準液としてインジウムを4 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、誘導結合プラズマ発光分析装置により測定を行い、標準溶液の発光強度と各元素の濃度により作成された検量線から試料溶液中の各元素濃度を求め、風乾土及び乾燥重量あたりの各元素の含有量を求めた。

④誘導結合プラズマ発光分析装置操作条件

装置：Optima 5300DV[株式会社 パーキンエルマージャパン]
高周波出力：1,300 W
ガス流量：プラズマガス(アルゴン) 15 L/min
補助ガス(アルゴン) 0.2 L/min
キャリアーガス(アルゴン) 0.70 L/min
試料導入量：1.50 mL/min
ネブライザー：同軸型ネブライザー
プラズマ観測位：軸方向
測定波長：クロム 267.716 nm : 銅 324.752 nm : インジウム 230.606 nm

3. 土壌中の総ヒ素の測定

①試料溶液の調製

土壌抽出液 5~25 ml をケルダールフラスコにとり、硝酸 10 ml を加え、緩やかに加熱した。放冷後、硫酸 5 ml を加え、液が無色~微黄色になるまで加熱し、その後、過塩素酸 2 ml を加え、硫酸の白煙が発生するまで加熱した。放冷後、飽和しゅう酸アンモニウム溶液 15 ml を加え、再び硫酸の白煙が発生するまで加熱した。放冷後、この液を水 20 ml を用いてメスフラスコに移し、40%よう化カリウム溶液 5 ml を加え 30 分間放置した後、10%アスコルビン酸溶液 5 ml 及び水を加えて正確に 50 ml としたものを試験溶液とした。

②標準溶液の調製

市販のヒ素標準液(As100 $\mu\text{g/ml}$)を水で希釈して 0.1 $\mu\text{g/ml}$ のヒ素標準溶液を作成し、その 1.0、2.0、4.0、8.0 及び 16.0 ml をメスフラスコにとり、水 20 ml 及び硫酸 10 ml を加えて室温同様になるまで放冷した後、40%よう化カリウム溶液 10 ml を加え 30 分間放置し、10%アスコルビン酸溶液 10 ml 及び水を加えて正確に 100 ml とし(0.0、1.0、2.0、4.0、8.0 及び 16 ng/ml に相当)、標準溶液とした。

③水素化物発生原子吸光光度法による総ヒ素の測定

試験溶液及び標準溶液について、次の条件で水素化物発生原子吸光光度法により測定を行い、標準溶液の吸光度から作成された検量線から検体のヒ素含有量を求めた。

④水素化物発生原子吸光光度計操作条件

装置：原子吸光光度計；Spectr AA220 [バリエンテクノロジーズジャパンリミテ