



International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2001

Saturday, December 15 - Monday, December 17, 2001

ナイトセッション
2001年12月16日(日)

Night Session
Sunday, December 16, 2001

トキシコジェノミクス

Toxico-Genomics

機能ゲノム科学—生命メカニズムの理解にむけて—

小原 雄治

国立遺伝学研究所

最近のゲノム解析のインパクトは甚大である。多数の微生物ゲノムの配列決定がおこなわれたが、その結果は微生物のゲノム構造が非常にダイナミックに変化していることを示し、そもそも微生物における「種」とは何であるかを考え直させることになった。実験生物の線虫、ハエ、植物、さらにはヒトそのもののゲノムシーケンシングも進んだが、これらの結果から、進化の中でいかにして生物が発展してきたか、その生命の戦略（これは生命のメカニズムに直結する）の糸口が得られつつある。このことは基礎科学だけでなく応用科学にとっても非常に重要である。例えば、今後のトキシコゲノミクスを進める上で必須の知識を与えるからである。

気の遠くなるほど長い進化の歴史の中で、多細胞生物は遺伝子の重複と変化によって生まれてきたと考えられている。われわれ人間を含む脊椎動物は、それに加え、その祖先からゲノムの重複によって生まれてきたと考えられている。遺伝子の数を見てみると、バクテリアなど(原核生物という)では1,000から4,000の遺伝子からなる。これは部品の数のようなものである。細胞核をもつ生物になると7,000程度の遺伝子になる。これが線虫やハエのような多細胞生物になると遺伝子数は10,000から20,000にはね上がる。複雑になるのだから当然といえるが、ここで驚くべき事実がわかった。目もあり、飛ぶこともできるハエが、ずっと小さく単純な構造の線虫より遺伝子数は少なかったのである。ヒトゲノムの概要が明らかになってもっと驚くべきことがわかった。ヒトの遺伝子数は40,000程度なのである。これはハエや線虫のたった2-3倍である。さらに、脊椎動物はヒトから最下等のサカナまで実に多くの生物がいるが、サカナとヒトでは遺伝子数はあまり変わらないことが予想されるのである。一体、生命は同じ数の遺伝子でどうやって違った形の種を創り出すのだろうか？いろいろなメカニズムが考えられている。例えば、選択的スプライシング、遺伝子の使い方(場所、時間)の違い、インプリンティングといわれるような現象、体細胞でのゲノムの再編成、などなどである。遺伝子自体の変化とこれらのメカニズムによる遺伝子の使い方によって様々な生物ができると予想されているが、これがまさに生命のメカニズムである。無脊椎動物のゲノムはヒトゲノムの原型といえるし、サカナゲノムはヒトの親戚である。これらの構造比較、使われ方の比較を進めることによって、このメカニズムの理解ができると考えられる。ポストシーケンスの最大の課題である。

ここでは線虫における機能ゲノム科学の現状を紹介する。線虫は動物としての基本的体制を持ちながら、体細胞数約1,000個ととてもシンプルである。かつ、その分裂・分化パターンの全貌が明らかにされており、ゲノム機能の解析を全生涯にわたり個々の細胞レベルでおこなえるすぐれた系である。多細胞生物の最も下等な部類ではあるが、遺伝子はヒトと驚くほど似ているものが多く、互換性のある遺伝子も知られている。上述のようにヒト遺伝子システムの原型が線虫にあるといっても過言ではない。われわれは、「ゲノムから個体」がいかにしてできるか、その全貌を遺伝子ネットワークを中心とする遺伝子システムとして理解するために、線虫の一種*C. elegans*を材料にして、ゲノムの構造・発現・機能・進化研究をいわば四位一体で進めてきた。これらの結果を統合して発生の遺伝子システムの解明をめざすとともに、初期発生過程について計算機モデル化を試みている。ここでの多くのデータはNEXTDB (Nematode Expression Pattern DB) として以下のサイトで公開している。

<<http://helix.genes.nig.ac.jp/db/>>

汚染物質の魚類への影響評価におけるトキシコジェノミクスとその将来性

T. D. ウィリアムズ、S. D. ミンチン、K. ゲンズベルグ、J. K. チップマン

バーミンガム大学

トキシコジェノミクスとは、ゲノム科学（ゲノミクス）と生物情報学（バイオインフォマティクス）の情報と材料を統合し、既知の毒性物質もしくは毒性懸念物質の毒性メカニズムの同定・特性解明を行なう分野である。この研究分野の重要性は、医薬品候補物質といった新規化学物質の毒性の有無をスクリーニングし、それら毒性物質の作用メカニズム研究の端緒を開くことにある。現在、人工汚染物質の影響を評価するために、こうした技術を、前哨生物を用いた環境モニタリングに応用することが始まっている。

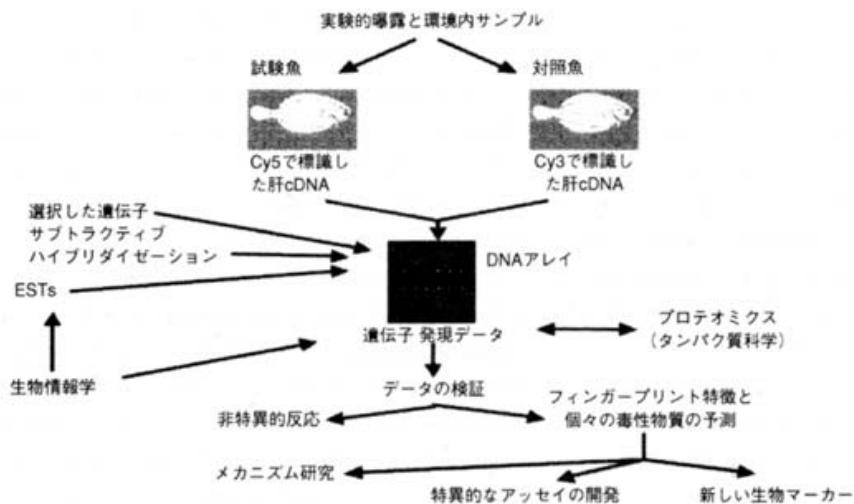
海洋環境は、外来性エストロゲン類、重金属類、多環式芳香族炭化水素類（PAH類）、ダイオキシン類などの多岐にわたる毒性物質で汚染されており、これらの物質は複雑な混合物として存在するのが通常である。こうした汚染物質の影響を検出する前哨生物としては、魚類がよく用いられる。我々のところでは、ヨーロッパヌマガレイ（*Platichthys flesus*）の研究を行なった。ヨーロッパヌマガレイは西ヨーロッパの汽水域に棲息するカレイの1種であり、水底にいる無脊椎動物を餌とするために、汚染物質に曝露している。この種は、ヒラメ（*Paralichthys olivaceus*）の近縁種である。これらの生物は、棲息環境が研究の対象として適切ではあるが、そのゲノム解析がまだ行なわれていないことから、利用が難しい。現在ゲノム解析が進められているトラフグ（*Takifugu rubripes*）とゼブラフィッシュ（*Brachydanio rerio*）は、この環境のモニタリングには不適切であるが、我々の調査の助けになる魚類遺伝子に関して有益な情報を提供してくれる。しかし、モデル外の生物種にトキシコジェノミクスを適用する技術はすでに可能になっている。

遺伝子発現の変化を、汚染物質による影響の「早期警告のマーカー」とすることは可能である。我々は、遺伝子発現の研究にDNAマイクロアレイを用いた。この方法は、何千種類もの遺伝子の発現を同時にモニタリングすることが可能であり、それゆえに、異なる制御を受ける遺伝子群を同定するのに極めて強力な手法となる。この技術は、環境モニタリングに日常的に使用するものとしてはまだ十分に成熟していない。我々の目標は、個々の汚染物質および混合物に対する反応の特性を解明し、生体への有害性の指標となる反応と、その他の環境影響に基づく反応との区別をつけることである。このアプローチが、やがて反応に関する新しい生物マーカーの同定につながり、それをリポーター遺伝子アッセイやELISAに組み込むことで、汚染物質に対するもっとも再現性の高い反応を示す遺伝子を用いた、より特異的なアレイが得られるものと、我々は期待している（図を参照）。

マイクロアレイの実行に向けた第1段階は、遺伝子断片の分離である。アレイ用の遺伝子ターゲットは、cDNAライブラリから無作為に拾い上げることも可能だが、ストレスに曝露した魚から作成する方が望ましい。こうして得たターゲットは、産生する発現遺伝子断片（EST）の配列を決定することで特徴づけられ、アレイに直接用いることができる。別の方法としては、SAGE法、デイフェレンシャルディスプレイ法、サブトラクティブハイブリダイゼーション法などを用いて、異なる制御を受ける遺伝子群（ストレス下でのアップレギュレートとダウンレギュレートの両方）を分離するというものがある。もう一つの選択肢は、異なる種から得たオルソログス遺伝子の相同領域に合致するように作成したプライマーを用いて、毒性学的興味の対象となる特定遺伝子のクローン断片を得ることである。

我々はこの3番目の方法に従って最初の実験を行なった。毒性学的興味の対象となる遺伝子の120断片を分離し、ミニアレイを作成した。次に、遺伝子ターゲットの入力は、汚染域であるタイン川汽水域（英国）と参照域であるアルデ川汽水域（英国）の魚を用いて、サブトラクティブハイブリダイゼーション（Clontech社のPCR-Select）によって行なった。我々は、ヨーロッパヌマガレイのEST配列の解析作業を開始したところであり、今後の発現実験用に1万種類におよぶターゲットを得る予定である。

我々は、バーミンガム大学ゲノム科学研究室において、高精度のロボットによってスライドガラス上に配置したcDNAターゲットを用いた（学内助成金BBSRC grant 6/JIF13209）。カレイの肝臓から採取したcDNAを、フルオロフォアのCy3とCy5による二重標識を施した（例えば、汚染域=Cy5、参照域=Cy3）。アレイをハイブリダイゼーションした後、スライドを走査した。この時の各フルオロフォアの相対量は、各サンプル対における遺伝子発現の相対量を示している。最初は、汚染域と参照域の野生魚の肝臓を比較した。続いて研究対象を拡張して、実験室において個々の化学物質ないしは混合物に曝露させた魚を含めた。



環境内サンプルから得た我々のデータによれば、多数の遺伝子がそれぞれ固有の制御を受けていることが明らかになった。汚染域の魚においてアップレギュレートを受ける遺伝子としては、メタロチオネイン（重金属汚染の存在を示す）、NADP-メナジオン酸化還元酵素（NMO）（広範囲の有機毒性物質に反応）、透明帯タンパク質C（ZPC）に相同な転写産物、卵子膜タンパク質（魚類ではZRPと呼ばれることが多い）などがあつた。ZPCは、エストロゲン受容体によって制御されることから、魚類における外来性エストロゲン曝露の生物マーカーとしてすでに利用されている。我々は、ヒューズ博士（バーミンガム大学女性病院）との協力の下で、この遺伝子ファミリーのうちカレイにおいて発現する遺伝子がいくつあるのか、また、それら遺伝子と哺乳類のZP遺伝子との進化的近縁性を解明しようとしている。また、こうした遺伝子群の肝臓における発現および、多量のZPC発現の部位である卵巣へのタンパク質輸送の可能性についても関心を持っている。今回の講演では、外来性エストロゲン類といった個々の毒性物質クラスに対する反応における個々のシステムの関わり方に注目した研究に、マイクロアレイのデータがどのように利用できるかを示す。今回の研究は、NERCと欧州連合から助成を受けて行なわれている。

メダカゲノミクスの進展

成瀬 清

東京大学 大学院

メダカは日本、韓国、中国に分布する小型の淡水魚で遺伝学、発生学、生理学等の多くの生物学分野で実験材料として用いられてきた。毒性学の分野でもメダカは標準動物のひとつとして世界的に用いられている。ヒトゲノムの塩基配列決定に前後して小型魚類の世界にもゲノム解析研究の波が押し寄せてきている。ゲノムシーケンスを含むゲノム解析がゼブラフィッシュ、フグなどでおこなわれており、トラフグではすでにゲノム配列のドラフトシーケンスが発表されている。メダカでもフランス、ドイツ、日本においてEST (express sequence tag) 解析を中心としたゲノム情報 (cDNA情報) が集まってきており、現在DDBJ/Genbank/EMBLデータベースには13000あまりの遺伝子配列が登録されている。メダカEST解析として我々は8000以上のcDNAクローンの塩基配列を決定し、それらの配列についてクラスター解析とブラストサーチによる相同性解析をおこなった。その結果8000の塩基配列は4000のクラスターに分かれた。そのうち約2000クラスターは他の種で得られたcDNA配列と有意な相同性を示した。メダカEST解析は今後も精力的に続けられることから1年以内には数万のEST配列が明らかになると期待される。我々はもう一つのゲノム解析として他種との間で有意な相同性を示したEST配列を中心に、PCR-RFLP多型をもちいてESTマーカーのマッピングをおこなった。その結果現在までに400以上のESTマーカーをマッピングすることができた。この遺伝子地図はメダカの染色体数とおなじ24の連鎖群に分かれている。メダカとヒトの遺伝子地図を相互に比較したところ40あまりのシンテニー保存領域を特定することができた。この結果はメダカとヒトのゲノム構造にかなりにかよった部分があることを示している。

1953年、山本時男はメダカに性ステロイドを餌とともに与えることで遺伝的性とは異なる方向へ人為的に性転換をすることに成功した。これは脊椎動物における初めての完全な性転換実験の成功例であった。この実験を今日的視点で見ると、まさに内分泌攪乱現象そのものである。山本はこの実験にヒメダカとシロメダカを用いたが、これは南日本集団と呼ばれるサブグループ属する。一方日本に分布するもう一つのサブグループである北日本集団のメダカではエストラジオール処理による雌方向への性転換がきわめて起こりにくいことがわかってきた。もし山本が北日本集団由来のメダカを実験にもちいていたら、性転換実験には成功しなかったと考えられる。南北両集団のメダカは自由に交配できることから、これらの集団はあきらかに同じ種に属する。この例から明らかのように個体の化学物質に対する反応は個体間の遺伝的な違いにより異なる。

メダカとヒトのゲノム構造の類似性はヒトのモデルとしての魚類 (メダカ) という視点を明らかに支持する。また一方でほとんど同じゲノム構造をもつ2つの集団が、あきらかに化学物質に対し異なった反応性を示す。このことは、内分泌攪乱現象のような集団に対するリスクを解析する必要がある研究においては対象となる生物の (遺伝的な) 多様性を十分に把握する事が正しい結論を導く際にきわめて重要であることを示唆している。

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*/*Xenopus tropicalis*) を用いたマイクロアレイの現況

ブルース ブルンバーグ、ブリジット リッグズ、エイミー ペイテル、ロン ニウ
カリフォルニア大学

Xenopus laevis は、発生初期の胚、細胞生物学、毒性学を含む脊椎動物生物学の重要分野にとって他に類のないリソースである。*Xenopus laevis*は、初期の運命決定機序の同定および基本的な脊椎動物の体の形成と初期の器官形成のパターン解明を導いている。細胞生物学と生化学における貢献には、染色体複製に関する精液研究、染色質と核の構造、細胞周期のコントロール、細胞骨格力学の*in vitro*での再構築、および信号伝達経路が含まれる。このような豊富な知識は、毒性物質が作用する機序を理解するために設計された毒性ゲノム研究を促進することになるであろう。

現在、*Xenopus laevis*と*Xenopus tropicalis*に関するESTプロジェクトが進行中である。*Xenopus laevis*では約12万のEST (12,000の固有遺伝子)、*Xenopus tropicalis*では更に7000のESTが得られている。世界中の数多くの研究室が同定されたcDNAクローンに基づいたマイクロアレイの開発に従事している。これらのマイクロアレイの現状と利用状況、およびこの分野で予測される今後の進歩の展望について報告する。

内分泌攪乱化学物質のトキシコジェノミクス評価

ティモシー リチャード ザカロフスキー

ミシガン州立大学

人工および天然の内分泌攪乱化学物質への慢性ないしは亜慢性曝露による影響を詳細に評価するためには、分子、細胞、組織の各レベルの理解を、生体全体、ゲノム、タンパク質との関わりの中でより深く進めることが必要である。いろいろなゲノム計画の急速な進歩によって、多様な生物の多数の遺伝子に関して、完全もしくは部分的なデータが得られるようになってきている。現在では、外来性物質への曝露に続くこれら遺伝子の反応を分析し、起こりうる転帰を推測することが可能になっている。生命情報科学 (bioinformatics) と遺伝学の大きな力を毒性学に統合することで登場したトキシコジェノミクス (toxicogenomics) という分野が、人工および天然の内分泌攪乱化学物質の毒性のスクリーニングと、それら物質のメカニズムに関する情報を得るのに役立つと言われるようになってきた。今回の講演では、内分泌攪乱化学物質の評価に用いられるトキシコジェノミクスの戦略の全体像と、この手法を活用して利点を十分に引き出すために必要なインフラストラクチャについて述べる。トキシコジェノミクス研究を支えるリレーショナルデータベース (dbZACH) の開発、モデルに特異的なアレイの構築、試験開発上の問題点とデータ分析の戦略について、次の3つの実験に関係づけながら考察する。すなわち、1) 精巣遺伝子の増強cDNAアレイを用いての、マウスの精子の質、*in vitro*での受精能、精巣の遺伝子発現に対するジエチルスチルベストロール (DES) 妊娠期曝露と授乳期曝露の影響、2) 特製のSVG-cDNAアレイを用いての、cAMPで誘導されるヒトのSVG星状膠細胞の分化における全遺伝子発現に対する人工および天然の内分泌攪乱化学物質の影響、3) Affymetrix MullKsubA GeneChipを用いての、マウス子宮の全遺伝子発現に対するエチニルエストラジオールの影響、である。それぞれの実験の詳細は、以下の通りである。

実験1: cDNAマイクロアレイとリアルタイムPCRを用いての、精巣の遺伝子発現に対するジエチルスチルベストロール (DES) 妊娠期曝露と授乳期曝露の影響

発生期でのエストロゲン様物質曝露による精子の質への有害作用の基礎となる分子レベルの現象を探究するために、cDNAマイクロアレイを作成し、B6D2F1マウスの妊娠第12日から生後第21日までの期間に、胃管を用いてジエチルスチルベストロール (DES) 10 μ g/kgに曝露させ、その子個体における精巣の遺伝子発現を調べた。3、15、45週齢の雄の子個体における複製遺伝子の発現パターンについて調べ、遺伝子発現への影響が、上述の精巣重量、精子数、精子受精能の長期にわたる低下に並行しているかどうかを判定した。約1948個の遺伝子を含むマウスcDNAマイクロアレイを作成し、精巣遺伝子発現について、DES曝露マウスおよび溶媒曝露マウスの子個体を比較した。遺伝子発現におけるDESによる変化を、対t検定に独立参照法を組み合わせで判定した ($p < 0.05$)。補正後p値に基づくと、3週齢において有意に変化したのはただ1個の遺伝子 (20Sプロテアソームのコンポーネント) であった。15週齢においては、46個の遺伝子の発現に有意な変化があった。45週齢においては、有意な変化はなかった。確認のために選択する遺伝子の優先順位は、未補正p値と機能を参考にして決めた。リアルタイムPCRを用いて、遺伝子発現における週齢変化および用量依存性変化を調べた。3週齢においては、ER α のmRNAの発現に有意 ($p < 0.01$)

な低下が見られ、15週齢と45週齢においては、mRNAの発現は検出限界未満であった。確認のために選択した遺伝子はその他にインヒピン、オーファン受容体のTR2と、シナプトネマ複合体の構成要素であるXmrがある。以上の結果により、精子の受精能に対する有害作用は、精巣におけるER α の発現の変化によるものであると考えられるが、その他の遺伝子が関与している可能性もある。

実験2：cAMPで誘導されるヒトSVG星状膠細胞分化に対するレチノイン酸による攪乱：形態および全遺伝子発現への影響

ヒトSVG細胞を、5 μ Mのフォルスコリン (F) と200 μ Mの3-イソブチル-1-メチルキサンチン (iBMX) で処理すると、cAMP濃度が上昇し、分化が起こり、形態が顕著に変化することが、これまでの研究で示されている。我々は、0.5 μ Mのレチノイン酸 (RA) で併せて処置することで、こうした形態変化が増強され、隣接細胞に接触する突起総数が増加し (p=0.03)、突起の長さ (LPT) が増大する (p<0.01) することを明らかにした。36時間後においては、RAによってLPTの退行が抑制され (p=0.02)、平均長 (p=0.04) および最大長突起の長さ (p<0.01) が伸張した。特製のSVG特異的cDNAマイクロアレイ (遺伝子2,990個) を用いて、cAMPで分化が誘導される時の遺伝子発現における一過性変化を調べた。遺伝子発現の変化の検出には、2種類の予備的フィルタリング法を採用した。その1つ目は、不完全ブロック法と個々の遺伝子を混成したモデルによるANOVAで分析し、続いて、多重比較のためステップダウン・ボンフェローニ補正を用いて、t検定をした。この混成モデルには、固定効果として、処置法、処置時間、染色法、処置回数があり、ランダム効果としてスポットが含まれる。分化時期の発現に有意な変化があった遺伝子を同定するために、処理細胞のF/iBMXの最小自乗平均と、時間をマッチさせた溶媒対照とをt検定を用いて比較した。比較には、処置細胞、溶媒対照細胞、未処置/0時間処置の細胞から得られた標準化マイクロアレイデータをシャノン・エントロピー・フィルタリングする2つ目の手法を用いた。フィルタリングしたデータは、続いて主成分分析 (PCA) を用いて分析し、遺伝子間の時間-作用相関を調べた。2つの異なる手法で得られた結果はよく似たものであり、遺伝子発現に対する時間効果と処置効果が見つかったが、若干の違いも観察された。

実験3：マウス子宮の全遺伝子発現に対するエチニルエストラジオールの一過性作用

エストロゲン類は従来の分類によれば、子宮に対して増殖作用を誘導することができる化学物質である。この生理的变化は、エストロゲン反応性遺伝子の発現における変化に関係しているが、一連の分子レベル事象については不明であった。今回の実験では、人工エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE) の、子宮の全遺伝子発現に対する作用を卵巣切除した幼若C57BL/6マウスを用いて調べた。マウスに、胃管経路で0.1mg/kgのEE、もしくは溶媒を投与し、0、2、8、12、24時間後に子宮を採取した。子宮全体としては、0~24時間において処置群と対照群との間に子宮重量に差はなかった (p=0.296)。しかし、MullKsubA Affymetrix GeneChipsを用いると、この時期の全遺伝子発現のレベルには、有意な変化が見られた。各処置群と、時間をマッチさせた溶媒処置 (対照) 群の動物2個体の子宮組織において、6000個以上の遺伝子の相対発現レベルを調べた。データは、t検定とクラスカル-ウォリス検定を用いてふるい分けし、対照群の正常変動範囲を超えた遺伝子発現の変化を同定した。両手法の処置群の値を、i) 対照群の所見は実験の間を通じて有意な変化はしないと仮定した全対照群、もしくは、ii) 特定の時間で

マッチさせた対照群の平均値のみ、と比較した。これらの方法により異なる結果が得られ、時間でマッチさせた対照群との比較では、検出される活性遺伝指数が常に少なくなった。発現が有意に変化した遺伝子の数は、処置後24時間の子宮がもっとも多かった。こうした変化の経時推移の特性を、時間関連性作用の一般的な形状に基づいたパラメトリックモデルを用いて記述した。重要なこととして、溶媒処置群の遺伝子の多くも発現の有意な変化を一過性に示しており、時間でマッチさせた対照群をこの実験計画に組み込むことの重要性が浮き彫りにされた。

ラットにおける非遺伝子傷害性肝発がん物質投与による 発現遺伝子群のカタログ化

渋谷 淳、有村 卓朗、広瀬 雅雄

国立医薬品食品衛生研究所

各種の遺伝毒性試験は化学物質の発がん性予測に用いられ、遺伝毒性を有する化合物の検出に効力を発揮してきているが、げっ歯類を用いた生涯試験により発がん性を示した化合物のうち約60%で明らかな遺伝毒性を証明できていない。このような明確な遺伝毒性を示さない発がん物質（非遺伝子傷害性発がん物質）については、現在までに信頼性のある短期検出法が確立されていないのが現状である。発がん物質によって引き起こされる初期の反応は個々の化学物質により様々であると考えられるが、物質間で共通の発がんの鍵となる分子機構が介在していることが予想される。このような分子機構の解明、ひいては発がん性検出の短期指標を得るための1つの試みとして、発現遺伝子のプロファイリングが注目されてきている。本研究では、この検出指標探索の試みとして、肝臓に発がん性を有する代表的な非遺伝子傷害性発がん物質の発がん用量をラットに28日間反復投与した時に、発現の変動する遺伝子群をgene chipを用いて解析し、個々の化学物質で特異的に変動する遺伝子ないし共通して変動する遺伝子を検索した。動物は6週齢のSD:IGS/DuCrjラットを用い、非遺伝子傷害性肝発がん物質である、phenobarbital (PB)、thioacetamide (TAA)、diethylhexyl phthalate (DEHP)を各々、600ppm、600ppm、20,000ppmの用量で混餌投与を行った。また、無処置対照群（基礎食群）の他、発がんの陰性対照として、肝毒性物質であるが肝発がん作用を示さないacetaminophen (APAP)の10,000ppm混餌投与群を設定した。投与開始後28日目に動物を屠殺し、各群3匹について肝臓よりtotal RNAを抽出し、duplicateでGeneChip® Rat Genome U34A Array (Affymetrix Inc.)による発現遺伝子の網羅的比較解析を行った。その結果、基礎食群ラットの肝臓においてはGeneChipに搭載されている8000個の遺伝子のうち約3000個の遺伝子の発現が確認された。各投与群で対照群と比較して2倍以上の発現の上昇あるいは減少を示すものは、それぞれ58個と90個（PB群）、566個と368個（TAA群）、230個と290個（DEHP群）、50個と79個（APAP群）であり、発現量の変化を示す遺伝子数は各化学物質によって大きく異なっていた。その内訳として、発現が上昇するものの多くが細胞内代謝に関わる遺伝子群であり、減少するものの多くはシグナル伝達、細胞内代謝、免疫反応に関わる遺伝子群であった。以上のことはどの化学物質においても共通した所見であった。しかしながら、発現の減少する遺伝子群の詳細な内訳は各化学物質間で異なっていたため、これらの差異が各化学物質による生物作用の相違の要因となっている可能性が示唆された。また、本解析によりAPAP投与群ではその発現量は変化しないが、非遺伝子傷害性発がん物質に共通して発現量の変化する遺伝子が複数個同定された。これらの遺伝子は肝発がん物質の短期検索生体内指標として利用できる可能性があり、今後投与開始1年ないし2年後の各群の肝臓における発現について検索していく予定である。

内分泌攪乱化学物質に対する胎仔の転写プロファイル

ジョージ P. ダストン、ホルヘ ナシフ、M. リン ジャンプ、ゲーリー オーバーマン、
スザンヌ トロンタリ、ジェイ ティーズマン
プロクターアンドギャンブル社

内分泌攪乱化学物質への発生期曝露は、機能に対して長期的な影響をもたらす可能性があるが、こうした影響は成熟するまで検知できないことがある。影響が発現するまでに長い潜伏期があることが、内分泌攪乱作用について環境内化学物質をスクリーニングする際の障害となっている。この結果、発生段階が内分泌攪乱に最も高い感受性を示す可能性があることが一般に認められているにもかかわらず、胚や胎仔におけるスクリーニング法は開発されていない。

我々は、エストロゲン物質、抗アンドロゲン物質、または甲状腺毒性物質への出生前曝露により、機能発達の変調の前兆となる遺伝子発現（転写プロファイル）において定型化されたパターンが生じると仮定している。これが事実であるならば、この転写プロファイルはホルモン作用の分子的指紋として用いることが可能といえる。我々は、既知のエストロゲン物質、抗アンドロゲン物質、または甲状腺毒性物質の効力を様々に変え、妊娠したラットに曝露させる試験を行い、在胎期間中の胎仔の敏感な組織における転写プロファイルについて調査している。感受性の高い組織とは、エストロゲン物質に対しては子宮、卵巣と精巣、抗アンドロゲン物質に対しては精巣と精巣上体、甲状腺毒性物質に対しては肺と脳である。エストロゲン物質に対する転写プロファイルは完成しており、実験の手順と結果の概要を以下に示す。

妊娠中のSprague Dawleyラットに強力なエストロゲン物質の1つである17- α -エチニルエストラジオール（EE）、中等度の効力を有するエストロゲン物質の1つであるゲニステイン、または弱い効力を有するエストロゲン物質の1つであるビスフェノールA（BPA）を妊娠第11～20日に毎日皮下投与した。用量は、EEでは0.5、1、または10 μ g/kg/日、ゲニステインでは0.1、10、または100mg/kg/日、BPAでは5、50、または400mg/kg/日とした。それぞれの試験の同時対照には媒体のみを投与した。最終投与の2時間後に、胎仔の子宮と卵巣または流出管が付いた状態の精巣を採取し、mRNAを抽出した（試料は同腹仔ごとでプールしておいた）。遺伝子発現プロファイルは、約8000のラット遺伝子またはEST類を評価するAffymetrix GeneChipシステムを使用して調査した。プローブした遺伝子の約1%の発現は、エストロゲン投与群の資料では変化しており、高投与量のEE投与群とBPA投与群では同等の結果を示している。遺伝子の大部分で明瞭な用量反応パターンが検出された。アップレギュレーションが生じた遺伝子には、プロゲステロンレセプター、ステロイド代謝酵素、成長因子、および種々のキナーゼとホスファターゼが含まれる。このようなプロファイルを示す遺伝子の多くは、成熟した組織でエストロゲンにより制御されていることが既に分かっているが、このプロファイルでは、これまでにはエストロゲンと関連付けられていなかった遺伝子やEST類の特性が評価されている。

以上の結果は、エストロゲンへの出生前曝露が再現可能な遺伝子発現上の指紋を生じさせているという考えを裏付けている。この転写プロファイルは、エストロゲンスクリーニングの基礎としての役割を果たすと考えられる。抗アンドロゲン物質および甲状腺毒性物質で得られた結果はここではふれないが、

いずれもこれらの作用機序を示す特徴的な転写プロファイルを発現するという考えと一致している。投与期間と屠殺時間はセグメントⅡプロトコルと整合性があり、内分泌攪乱化学物質スクリーニングをセグメントⅡ試験に加えることや、独立した試験として実施することができるであろう。