

巻頭言

日頃思うこと

ヒトゲノムの解明の光は、やがて生体の構造と機能の全容を照らし出し、終には理想的かつ自然の疾病対策（予防と治療）を導くであろう、とぼんやり思っている。

サリドマイドやキノホルムを筆頭に、よくもこう次々と問題が発生するものだと慨嘆しつつ時を過ごした。二十世紀は戦いの時代であった、という評価があるが、おそらくその延長上の一環として多くの化学物質が人類共通の相手として登場したのだろう。化学物質によって、生体に何がおこるのだろうか？ どのようにして起こるのだろうか？ 対応策はあるのだろうか？ 現実に生じてしまった災禍に、兎にも角にも何とかしなければならぬ泥縄の対応として、夥しい数の動物を身代わりとして、化学物質と生体との関わりの概要を捉える実験が行われてきた。大出血を起こした時、それが起きた理由よりも止めることが先決である。動物での知見がヒトに当てはまるのか、などという粗い愚問が今も時たま見られるが、殺された動物に浮かぶ瀬があるだろうか。ある論文に研究者はsacrifice（犠牲）などと記述してみずからの罪を軽くしようと誤魔化している、とあったが至言である。

去る6月、10数年ぶりに健康診断を受けた。眼底写真を撮りますと告げられ、固定台に顎をのせると瞬間脳天に突き刺さるような衝撃を受けた。とたんに心拍は上がり暫く収まらない。勿論何物も見えない。落ち着いてみれば眼に入った光であり、まともな視細胞であれば数十秒もすれば回復する。しかし、これはストレス以外のなにものでもない。最近の統計によると、自殺者が急増している、ということに中高年層の上昇が際立っていると報道されている。そこで、ストレス遺伝子の研究が急がれる、などと言う学者の意見が見受けられる。“なんでも遺伝子”の悪乗りの観がしないでもない。自殺の原因は個人によって様々であろうが、最近の世情は誰にとっても悲観の材料になりうる。

医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 顧問
財団法人化学物質評価研究機構 理事
戸部満寿夫



ストレス遺伝子の解明を否定するつもりはないが、その解明を待つ余裕があるのだろうか、考え込んでしまう。殆どストレスも経費もかからない古い眼底検査を知るものにとって、進歩とはなにかと複雑になる。

さて、毒性研究も遺伝子に絡む機構の解明のレベルに到達した。toxicogenomicsの名のもとにこの研究分野が展開しつつある。米国ではいち早くNIEHS（National Institute of Environmental Health Sciences）にNCT（National Center for Toxicogenomics）<http://www.niehs.nih.gov/net/home.htm>参照）を立上げ（2000.June）国内の研究促進を図ろうとしている。NCTは、toxicogenomicsを規定して環境をとり巻く有害物質や薬物のようなストレスサーに対応する特定の遺伝子発現とそれによって生じる蛋白質の同定に関する情報の収集および蓄積と解釈としている。つまり、従来の毒性研究に加えて、生体反応の根底にある遺伝子からみの変化を捉え、新しい視点の対策を探ろうとしている。当然、国内でも同様の研究推進を図る動きが窺えるが、明らかな形として顕われていない。

新しい企ては常に古きを超えていく筈である。しかし、予想を越える問題の発生も否定できない。具体的に何が懸念されるかを提示し得ないので立派なことは言えないが、ゲノム研究の進展に伴う諸々の新技術、殊に生体成分やその修飾物の利用にも、化学物質に潜んでいた複雑な動きが予測できなかったと同じ轍を踏む可能性はないわけではない。言行不一致の甚だしい事例も次々に発生している。自然の道筋から逸脱する度合いと危険度はおそらく平行する。自然への離反こそ単に疾病対策ばかりでなく理想像の実現に障る大きな要因ではなからうか。

CONTENTS

巻頭言

「日頃思うこと」 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 顧問
財団法人化学物質評価研究機構 理事 戸部 満寿夫

本機構の活動から

- ・第9回技術諮問委員会開催
- ・2001分析展
- ・ビジネス交流会

特集1（化学物質安全部門 日田事業所）

- ・はじめに

CERI 財団法人 化学物質評価研究機構

・日田事業所のGLP運用状況

・マウス尾部採血法の改良

・メダカの組織標本の作製について

特集2（安全性評価技術研究所）

・All-trans-retinoic acidの内分泌攪乱作用

・Phytoestrogenを含まない飼料が幼若雌ラットの膈開口日齢に及ぼす影響

・局所リンパ節増殖試験（Local lymph node assay）のNon RI化の試み

東京事業所落成披露

本機構の活動から

第9回技術諮問委員会開催

第9回技術諮問委員会は、平成13年8月7日（火）午後2時から本部大会議室において開催されました。

今回は、お忙しい中にもかかわらず貴重なお時間をいただき、祖父尼俊雄、中西準子、西原力、前川昭彦、安野正之の各技術諮問委員、池田正之理事および宮本純之技術顧問の計7名の先生方にご出席いただきました。また、本機構からは約50名が出席しました。

今回の技術諮問委員会では、平成10年度から経済産業省より受託し、実施してまいりました「内分泌かく乱化学物質」に関わる研究課題について、これまで3年間に得られました成果を取りまとめ報告いたしました。また、これらの成果を踏まえ、内分泌かく乱化学物質のリスク評価を実施するうえでの問題点、課題などを明らかにするとともに、今後、実施する課題や取組みなどについて報告し、諸先生方より、ご意見、ご指導をいただきました。本機構からの発表課題と発表者は次のとおりでした。

内分泌かく乱化学物質に関わる取組み成果の報告

武吉正博

内分泌かく乱化学物質のリスク評価における課題等

美濃部安史

平成13年度以後の実施課題の概要等について

高月峰夫

また、「内分泌かく乱化学物質対策に関わるトピックス」として、当該分野において技術的側面、あるいは社会的・国際的な側面より問題解決に多大な貢献をなされている二人の先生より、次のご講演をいただきました。

一分子蛍光分析法を用いた内分泌かく乱物質スクリーニング手法の開発

祖父尼俊雄技術諮問委員

“内分泌活性物質”に関するSCOPE/IUPAC国際プロジェクトについて

宮本純之技術顧問

発表および講演後の総合討論の場におきまして、活発な討議、意見交換が行われました。

内分泌かく乱化学物質の問題が野生生物への影響という事象から発生したこともあり、環境リスクアセスメントに関わる考え方、方法論などについて討議が行われました。また、内分泌かく乱化学物質に限らず、化学物質に対する総合的なリスク評価を行うためには、このような問題に対しては自然科学的側面からと社会（人文科学）の側面からのアプローチが必要であり、これらを実施できるシステムや体制の構築が重要であるとのこと指摘がありました。

今後、化学物質のリスク評価・管理を総合的・体系的に実施していくための、中長期的な研究計画を策定するうえで大変有用なご意見、ご指導を得ることができました。

（評価研・中川）



技術諮問委員会

2001分析展

毎年恒例となりました社団法人日本分析機器工業会主催の分析展が今年も9月5日から9月7日までの3日間、幕張メッセで経済産業省などの後援により開催されました。

当分析展では分析機器メーカーの出展に加え、「研究機関コーナー」が併設され、様々な研究機関がそれぞれの研究内容を紹介しています。出展に際しては、中立性の高い内容が要求されることもあり、本機構からは化学標準部門の出展となりました。化学標準部門は1996年を初めに1998年からは毎年出展依頼を受け、今回で5回目の参加となりました。出展の内容は、計量法トレーサビリティ制度の解説、産業技術審議会・日本工業標準調査会合同会議の答申に基づく標準物質の整備計画および研究の進捗状況、また、その研究により新たに供給可能となった標準ガス・標準液の種類と校正範囲および校正の不確かさをパネルに

して紹介しました。さらに、「特定標準液」「特定二次標準液」「実用標準液」を陳列したショーケース、受託研究の報告書などを展示しました。



分析展

また、2001分析展から会員以外の会社も展示できるようになったため、本機構も業務紹介のために出展いたしました。出展の内容は、化学物質安全部門、高分子技術部門、環境技術部門およびクロマト技術部門の業務をパネルにして紹介しました。また、液体クロマトグラフ用カラム

(L-column) およびガスクロマトグラフ用カラム (G-column) の展示を行いました。

この出展は、本機構をより多くの方々にご覧いただく良い機会になりました。

(企画・深川)

ビジネス交流会

9月28日(金)～9月29日(土)の2日間、日本工業大学(埼玉県南埼玉郡宮代町)が主催するビジネス交流会に参加し、出展しました。出展の内容は、東京事業所が埼玉県北葛飾郡杉戸町に移転するのに伴い、東京事業所の主な業務(高分子技術部門・環境技術部門・化学標準部門・クロマト技術部門)をパネルにより紹介しました。

本機構のブースには、2日間で140名～150名の来場者があり、大学関係者および一般の方がほとんどでした。

(企画・深川)



ビジネス交流会

特集 1 (化学物質安全部門 日田事業所)

はじめに

化学物質の安全性に係る関心が高まっています。安全で安心できる社会をめざして、化学物質の有害性に関する科学的知見の充実を図ることがますます要求されつつあります。日田事業所では創設以来、19年にわたり化学工業会、製薬工業会等の多くの企業から依頼を受け、人の健康影響に係る安全性試験を実施してまいりました。工業化学物質、医薬品および農薬等の新規化学物質が世の中に出

る前に、GLP基準に基づき各種の安全性試験を正確に実施し、その化学物質に固有の安全性に係る情報を得ることに貢献しております。さらには、各種GLP基準およびテストガイドラインに基づく試験のみならず、依頼者の多彩な要望に対し、種々手法を考案しこれに応えてまいりました。今回は、その成果の一部と行政等によるGLP査察結果を合わせてご紹介いたします。

(藤野 良)

日田事業所のGLP運用状況

1. GLP適合状況

日田事業所では昭和57年設立当初よりGLP対応で試験を実施しており、各GLP調査/査察の実績は以下に示す回数になります。

2. 最近の各GLP調査/査察の実施状況と評価結果

最近では下記のとおり5種類のGLP調査/査察を受けました。評価結果と概要を記します。

GLPの種類	調査/査察回数
医薬品GLP(厚生労働省)	3回
医薬品GLP(医薬品機構)	2回
化学物質(化審法)GLP	6回
化学物質(安衛法)GLP	5回
農薬GLP	6回
動物用医薬品GLP	1回

GLPの種類	最新の調査/査察実施日	評価結果通知	評価結果
医薬品GLP(医薬品機構)	平成12年6月5日～9日	平成12年8月10日	A
化学物質(化審法)GLP		平成12年9月21日	可
化学物質(安衛法)GLP	平成12年7月24日～25日	平成13年2月22日	可
農薬GLP	平成12年10月3日～6日	平成12年11月13日	可
動物用医薬品GLP	平成13年9月18日～19日	未定	未定

1) 医薬品GLP調査

医薬品機構による医薬品GLPの調査を昨年の6月に受けました。調査員は2名で初日に大分県から1名が加わり、実施されました。5日間の日程で調査資料の説明、ラボツアー、スタディオオーディットなど通常実施される内容のものです。その際、自主的検討事項としての指摘を3件いただきました。内容としては計画書に関するものが2件、一時保管場所の表示に関するものが1件でした。

2) 化学物質GLP(化審法)

化審法GLPについては実際の調査/査察は実施されず、医薬品GLPの調査結果をもとに確認申請書が受理されず。昨年の9月に確認申請書を提出し、同月に評価結果をいただいています。

3) 化学物質GLP(安衛法)

厚生労働省(当時労働省)の安衛法GLPの査察を昨年の7月に受けました。査察官は2名で、2日間実施されました。現場での試験操作の確認、ラボツアー、スタディオオーディットなどです。その際の指導事項として3件、管理責任者に関するものが2件、試験物質保管室への入退室に関するものが1件ありました。

4) 農薬GLP

農薬GLPの査察を昨年の10月に受けました。査察員は2名で4日間の日程でした。資料の説明、ラボツアー、スタディオオーディットなど通常実施される内容のものです。改善を要する事項として2件、改善が望ましい事項としては、3件ありました。報告書に関するものが2件、機器管理責任者に関するものが1件、計画書に関するものが1件、保管に関するものが1件です。

5) 動物用医薬品GLP

動物用医薬品のGLP実地調査は農林水産省の動物医薬品検査所から2名来られて、2日間の日程で今年の9月に実施されました。この調査は、19年前に医薬品GLP適用で実施した試験の被験物質が動物用の医薬品として申請されたため行われたものです。当時の施設がどうなっているか、という問題ではなく、現時点で当該試験を実施する場合に使用する施設についてGLPへの適合性を調査するということでした。評価結果はまだ受理していませんが、調査時の最終講評では「指摘なし」であり、良く運営されているとの感想をいただきました。設立当初に実施した試験であり、記録に関するもので不備がみられたりしますが、今はほとんどのものは改善されている内容のものでした。

(白石^註)

マウス尾部採血法の改良

近年、医療技術の進歩は目覚しく、採血用の器材に関しても様々な商品が市販され現場で活用されています。そのほとんどは、ヒトの臨床検査において検査目的の細分化に伴い開発されてきたものであり、患者への苦痛・ストレスを軽減する配慮がなされています。しかし、実験動物を用いた研究においては、未だ過去に確立された画一的な手法に固執しているのが現状です。そのため、使用する動物又は検査項目によっては採血手技に伴う不具合が測定データに大きく影響をおよぼす場合があり、試験系に合わせた採血方法の選択および詳細な事前検討を余儀なくされるケースが多々あります。

そこで、本稿では現在日田事業所で実施している試験において、採血方法を検討した事例を紹介させていただきます。本試験では、遺伝的糖尿病動物であるKK-Ayマウスを用い、血漿中のインスリンおよび血糖値を経時的にスクリーニングすることを目的としていました。しかし、本動物は様々なstressorに対する適応力が低く、実験手技によっては動物にストレスが付加されインスリンおよび血糖値が大きく変動することが報告されています。そのため、従来マウスで用いられている採血方法はいずれもストレスを付加する可能性が高く組織の損傷も激しいことから、経時的採血は不可能と考えられていました(表1)。

そこで、今回stresslessな経時的採血を可能にするため小動物(マウス)専用の採血器具を独自に開発しました。本採血器具は尾静脈からの採血を目的に考案されています。尾静脈内に注射針を刺入後、自然に漏出してくる血液を毛細管現象を利用しヘマトクリット管で採取するシステムで、ヘマトクリット管の末端はプラスチック製のコネクタで注射針に固定されており、採血時の保持が容易になっています。そのため、採血時に動物を拘束する必要がなく、また血管および周囲組織の損傷が少なく止血が容易であることから、動物へのストレス負荷が原理上最小限になるように設計されています。実際にマウスを用いた際の本採血器具のストレス軽減効果並びに他検査への応用性に関する検討結果を以下に示します。

表1. 採血手技の比較

採血部位	方法	問題点
心臓	注射針刺入後、注射筒による吸引	・血液吸引過剰によるショック死 ・拘束ストレス付加
尾静脈	カミソリによる静脈切開	・組織の損傷、壊死 ・止血困難
眼窩静脈叢	ヘマトクリット管刺入後、吸引	・組織の損傷、壊死 ・止血困難 ・拘束ストレス付加

実験 1. ストレス軽減効果に関するモニタリング

採血器具を用いた際のストレス影響をモニタリングするために、KK-Ay マウスより経時的（1週間毎）に血液を採取し、血糖およびインスリンの測定を行い従来のカミソリによる尾静脈採血法（以下、従来法と略す）との比較を行いました。その結果、採血器具を使用した場合には血糖お

よびインスリン値が加齢に伴い増加傾向を示したことから、本動物が正常に糖尿病発現したものと考えられました。しかし、従来法による採血ではインスリン値に変化が見られず、血糖値が減少傾向を示したことから、採血時のストレス負荷による糖尿病発現の抑制が考えられました。（図2）

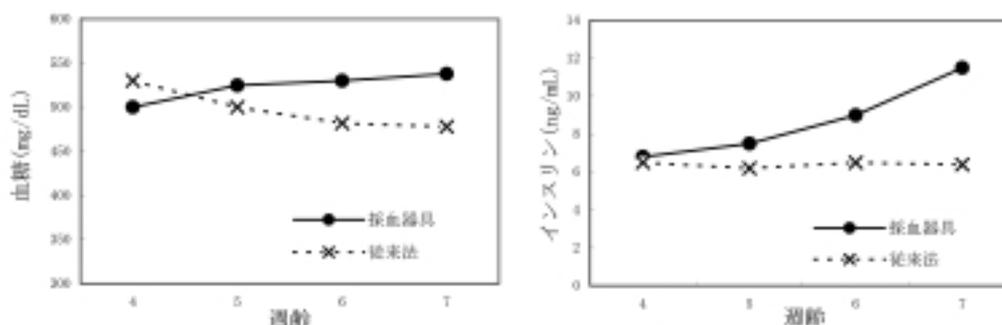


図2 血糖およびインスリン値の推移

実験 2. 血液・血液化学的検査への応用性

従来、マウスを用いた前臨床試験においては採取可能な血液量が少ない等の問題から、血液・血液化学的検査の実施は困難とされていました。しかし、本採血器具を使用した場合、一度に100 μ L以上の血液採取が可能であり、動物の一般状態にもほとんど影響は見られませんでした。また、採取した血液を用い血液・血液化学的検査を行った結

果、医薬品GLP試験で実施している項目のほとんどを測定することができました。また、採血時に組織液混入により測定値が偽高値を示しやすいLDHおよびNEFA（遊離脂肪酸）に関して、全く影響が見られなかったことから、血液採取時のcontaminationも少ないことが確認されました（図3）。

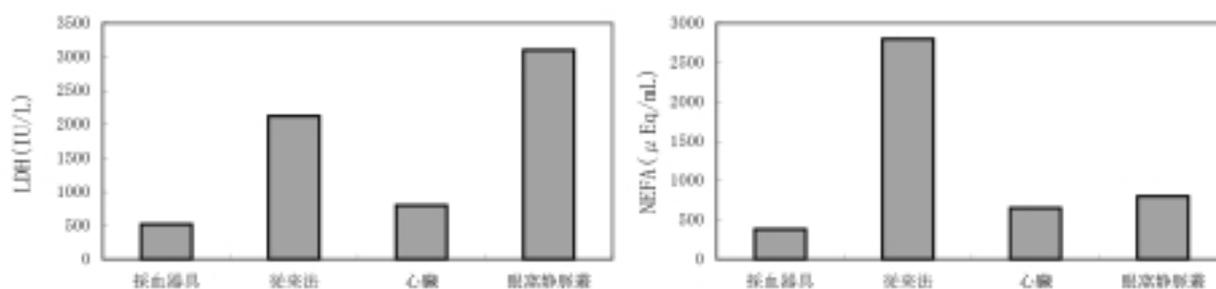


図3 血液化学的検査項目測定結果

まとめ

今回紹介した採血器具は、従来のマウス尾静脈からの採血法に比べ、採血時の動物に対するストレスや血液化学的検査値への影響が少なく、操作も簡便であることから、血液量の少ないマウスに最適の道具であると言えます。また、今回紹介した事例の他に薬物動態試験、他の動物種・採血

部位などへの汎用性についても現在、検討を行っており非常に良好な成果が得られています。今後は、外部への普及性も考え更に改良および検討を加えていくと共に、本採血器具が新しい採血器具として公認されることを期待しています（特許出願中）。（白石[※]）

メダカの組織標本の作製について

前号で掲載しました久留米事業所(化学物質安全部門)で実施しているメダカを用いた内分泌かく乱化学物質の試験方法に、生殖腺組織学的検査という項目があります。日田事業所においては、そのメダカの組織標本作製を行っています。

メダカは内分泌かく乱化学物質を含めて化学物質の生態影響の試験・研究に国際的にも広く用いられていますが、その内部形態や組織像について詳細に掲載された成書は少ないのが現状です。そこで生殖腺組織標本の作製を行うにあたって、生殖腺とその他の器官との位置関係や内部形態の把握を目的として、全身の連続切片標本の作製を行いました。

常法に従って、ブアン液で固定したヒメダカの全身パラフィンブロックを作製し、滑走式のマイクロトームを用いて

縦断面および水平面の連続切片標本作製を行い、光学顕微鏡下で観察しました。

その結果、生殖腺とその他の器官との位置関係や内部形態を把握することができました。写真は、精巣、卵巣、肝臓、腎臓および脳下垂体の組織像の一例を示します(写真1、2、3、4、5)。内分泌系の器官、例えば生殖腺の機能と関連する脳下垂体等の小器官については、薄切時に肉眼での識別が困難であるため顕微鏡下で確認しながらの作製が必須であり、また、生殖腺と主要な器官を1枚のプレパラートに含めるためには、水平面(写真6)より縦断面(写真7)の方が適していることも明らかになりました。これらの検討を踏まえて、今後もより信頼性の高い標本作製に努めていきたいと考えています。（梶原^ひ）



写真1 精巣

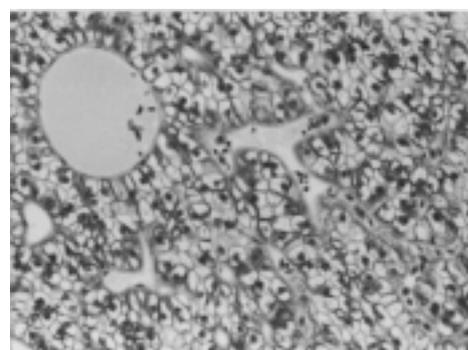


写真3 肝臓

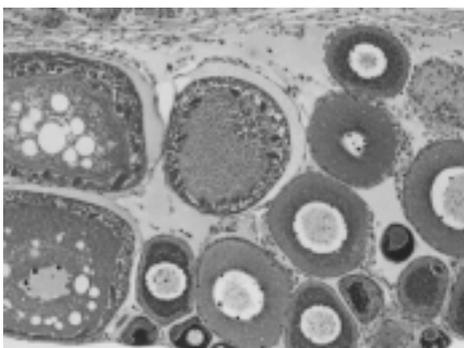


写真2 卵巣

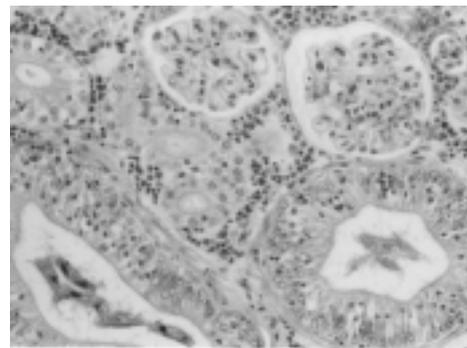


写真4 腎臓

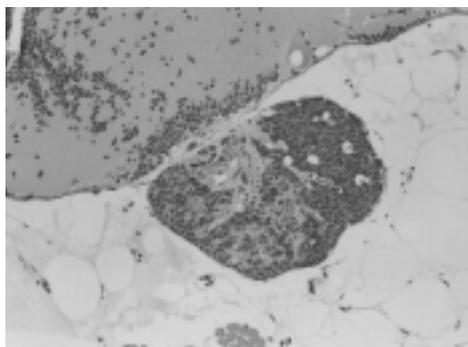


写真5 脳下垂体

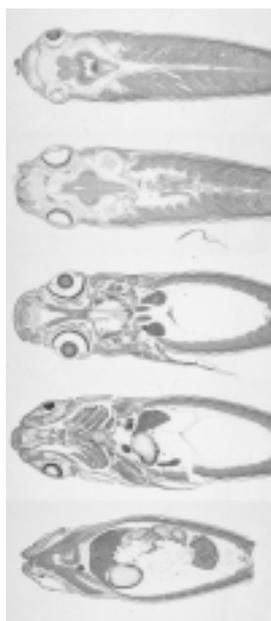


写真6 水平面



写真7 縦断面

特集 2 (安全性評価技術研究所)

All-trans-retinoic acid の内分泌攪乱作用

近年、いくつかの化学物質が生体の内分泌機能を攪乱し、ヒトあるいは野性動物の生活に影響を及ぼす懸念が報告されています。Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) と Endocrine Disrupter Screening and testing Committee (EDSTAC) of the US Environmental Protection Agency は、(抗) エストロゲン作用物質のスクリーニング法として、無細胞系でリガンド-受容体の相互作用を解析する receptor binding assay、ホルモン受容体導入細胞を用い、リガンド依存的な遺伝子の転写活性化機構を利用する reporter gene assay、幼若雌ラットに被験物質を3日間投与し、子宮重量の変動を指標とする uterotrophic assay を提案しています。これらの assay はレセプターを介する内分泌攪乱作用の検出を前提としています。All-trans-retinoic acid (tRA) は、ビタミン A₁ の誘導体であり、胚・胎児の発育において重要な役割を担っている一方、ヒト乳がん由来細胞株である MCF-7 において、抗エストロゲン活性を示し、増殖抑制効果を有することも報告されています。今回我々は、tRA の receptor binding assay、reporter gene assay および uterotrophic assay を実施し、tRA の in vitro、in vivo における内分泌攪乱作用を検討すると共に、これら assay のスクリーニング法としての有効性を検討しました。さらに、tRA の内分泌攪乱作用発現メカニズムの一端を解明する目的で、DNA 断片と転写制御因子が結合すると分子サイズが大きくなり電気泳動における移動度が低下することを利用した gel mobility shift analysis を実施しました。

材料および方法

receptor binding assay

大腸菌によりグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合蛋白として発現させたヒトER を用いて競合結合試験を行いました。

それぞれ10mlの発現ER 溶液、All-trans-retinoic acid (tRA, 1×10^{-12} - 1×10^{-4} M) 溶液と標準リガンド溶液 (5nM [3H]17 -Estradiol) を添加し培養 (25 °C, 1hr) しました。培養後、遊離 [3H]17 -Estradiol (E2) を 0.2% activated charcoal, 0.02% dextran を含む PBS で洗浄、濾過後、上清の放射活性を測定しました。抗エストロゲン作用陽性対照物質には4-hydroxytamoxifen (1×10^{-12} - 1×10^{-6} M) を用いました。

reporter gene assay

ラット前立腺由来ER coding cDNA を組み込んだER 発現プラスミドおよび Estrogen responsive element (ERE) をエンハンサーとして組み込んだ Luciferase reporter plasmid を同時に HeLa 細胞に一過性導入した後、DCC 処理 FCS を 10% 添加した EMEM 培地中で tRA (10mM, 1mM, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM) と共に 48 時間培養 (37 °C, 5% CO₂) しました。誘導された Luciferase 活性は Luciferase assay system (PROMEGA, Cat.# E1483) を用いて測定しました。また、抗エストロゲン作用検出のため上述と同濃度の tRA と共に 1nM の 17 -Estradiol を同時に添加しました。

uterotrophic assay

20日齢の幼若雌Crj:CD(SD) IGSラットにtRA (0, 5, 25 mg/kg/day) を3日間皮下投与、また同用量のtRAとEthinylestradiol (EE, 0.6 µg/kg/day) の同時投与群を設けました。抗エストロゲン陽性対照として50, 100 mg/kg/dayのICI 182,780 (ICI)+EE群を設定、最終投与約24時間後に解剖し、子宮(Wet & Blotted)重量を測定しました。

gel mobility shift analysis

5'末端をFITCで標識したXenopus vitellogenin A由来ERE fragment (32bp) およびER (PANVERA, Madison, WI, USA)を1nM 17 β -Estradiol存在下で培養し、さらに非標識ERE fragment、1 µM tRA又は1 µM 4-hydroxytamoxifenを添加培養後、電気泳動し、EPIPRO IMAGERおよびImage analyzing software (AISIN COSMOS R&D, Ltd., Aichi, Japan)を用いて定量化しました。

結果

receptor binding assay

陽性対照である4-hydroxytamoxifenは用量依存的にE2-ER結合を阻害し、IC₅₀値は 1.05×10^9 Mと推定されましたが、tRAによるE2-ER結合阻害はみられず、tRAはERとの結合親和性を示しませんでした (Figure 1)。

reporter gene assay

tRAのエストロゲンアゴニスト活性は検出されませんでした (Figure 2A) tRAの明らかな抗エストロゲン活性が検出され、IC₅₀値は 1.56×10^8 Mと推定されました (Figure 2B)。

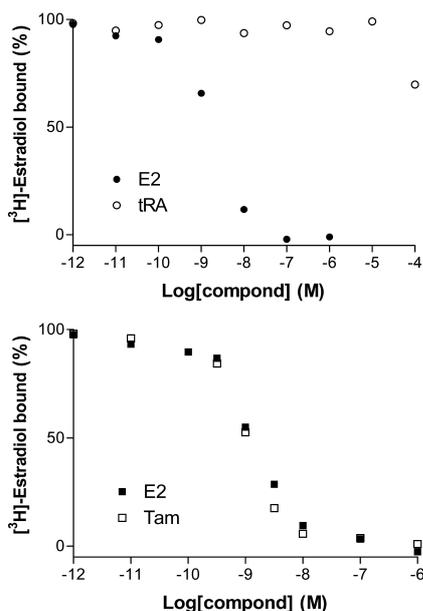


Figure 1. Effects of all-trans retinoic acid (tRA) and 4-hydroxytamoxifen (Tam) on the positive cooperativity of [³H]estradiol binding to the ligand binding domain of human estrogen receptor alpha.

uterotrophic assay

tRA単独投与群では媒体対照群との間に差はみられず、tRAのエストロゲン活性はみられませんでした (Figure 3) 全てのtRA+EE投与群において有意な子宮重量減少がみられ、明らかな抗エストロゲン活性が検出されました (Figure 4)。

gel mobility shift analysis

非標識ERE fragment、および4-hydroxytamoxifen添加した結果、シグナル強度の低下(-30%)がみられましたが、tRA添加によるシグナル強度の低下はみられませんでした (Figure 5)。

考察

tRAはuterotrophic assayおよびreporter gene assayにおいて抗エストロゲン作用を示すことが確認されました。しかし、receptor binding assayにおいてERと結合しないことが明らかになりました。さらにgel mobility shift analysisの結果、tRAはE2-ER複合体がEREへ結合するまでの過程には影響を及ぼさず、それ以降の過程を阻害することにより抗エストロゲン活性を示したものと考えられ、受容体-リガンド結合を阻害しない抗エストロゲン作用発現機序が存在することが明らかになりました。

uterotrophic assayとreporter gene assayは受容体を介する内分泌攪乱作用のみならず、転写を抑制することによって発現する抗エストロゲン作用についても検出できることが示されました。従って、reporter gene assay、uterotrophic assayは内分泌攪乱化学物質をスクリーニングする早期の段階で実施する必要があると考えられます。

(野田)

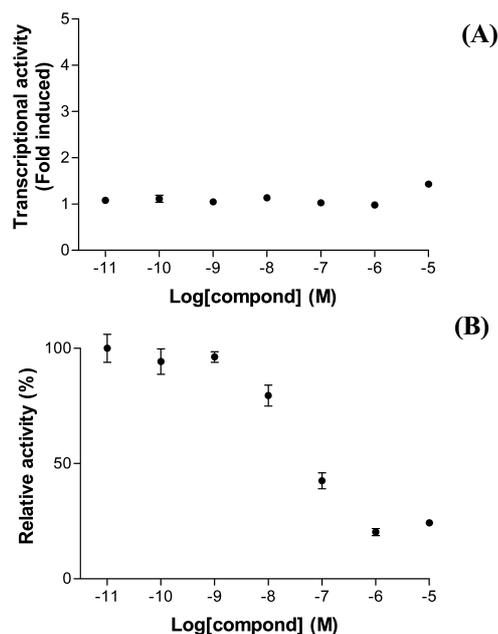


Figure 2. Agonist (A) and antagonist (B) activities of tRA tested with rat ER alpha mediated reporter gene assay.

*Data represents a mean and standard deviation of quadruplicate analysis.

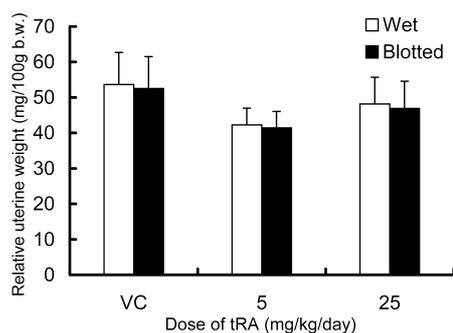


Figure 3. Relative uterus weights of rats injected tRA subcutaneously for three days.

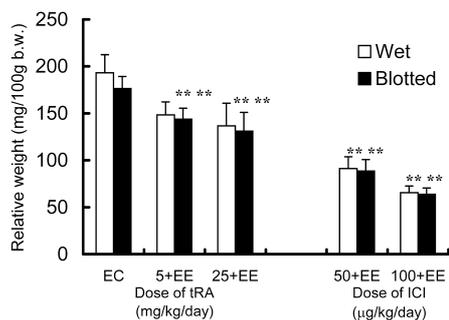


Figure 4. Relative uterus weights of rats injected tRA or ICI with 0.3 mg/kg EE subcutaneously for three days.

**Significantly different from the EE-treated control group (EC) at $p < 0.01$ (Dunnnett's test).

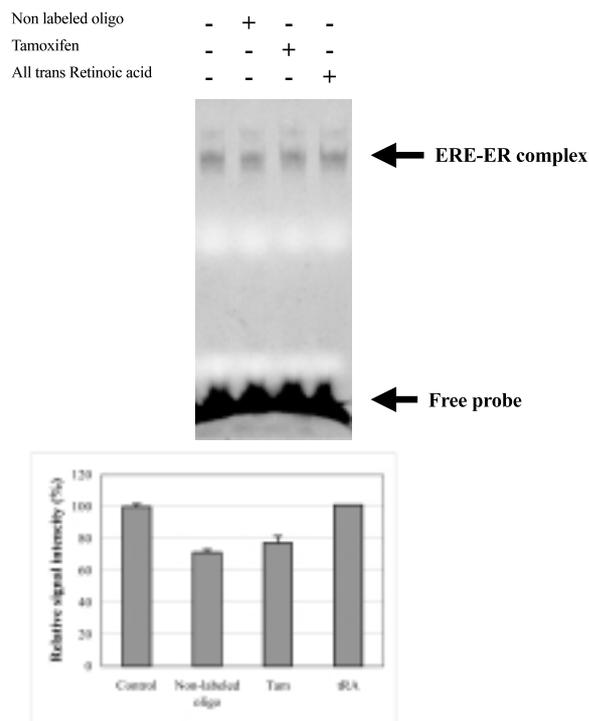


Figure 5. Inhibitory effect of non labeled oligonucleotide probe, 4-hydroxytamoxifen (Tam) and all-*trans*-retinoic acid (tRA) on gel mobility shift assay results of ERE and ER-ligand complex. *Values were represented as a mean and standard deviation of duplicate analysis.

参考文献

M, Takeyoshi., K, Yamasaki., M, Sawaki., M, Nakai., S, Noda. and M, Takatsuki. 2001. The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic

effects downstream of receptor-ligand interactions. Toxicology letters. (in press) .

Phytoestrogen を含まない飼料が幼若雌ラットの腔開口日齢に及ぼす影響

【目的】

EDSTAC は内分泌かく乱化学物質のスクリーニングとして female pubertal assay を提案しています。本 assay の目的は、化学物質が幼若雌ラットの性成熟等に及ぼす影響を検索することであり、そのエンドポイントの一つに腔開口が挙げられています。ヒトと違い、通常ラットの腔口は子供の時は完全に閉じています。ヒトでの性成熟の指標が初潮とすると、ラットでは腔開口がそれに相当し、通常生後30日過ぎにみられます。また、ラットでは乳離れが20日齢前後ですので、ヒトに比べると非常に早く性成熟が訪れることとなります。

飼料中の植物エストロゲン (Phytoestrogen) はラットの性成熟に影響を与えるとの報告があることから、我々は飼料中の Phytoestrogen 含量が性成熟の指標である腔開口日齢に影響をもたらすか否かを検討しました。

【材料と方法】

13日齢の幼若雌Crlj: CD (SD) IGS (SPF) ラットを母

動物と共に購入し、入荷時から通常の飼料と同等量の Phytoestrogen を含む合成食 NIH-07、NIH-07 から Phytoestrogen 含量を極力少なくした NIH-07PLD、通常我々が試験に用いている基礎飼料 MF による各給餌群を設けました。離乳は19日齢で行いました。その後毎日腔開口検査を行い、体重および摂餌量は週に1回測定し、さらに腔開口日にも測定しました。また、飼料中の主な Phytoestrogen である Daidzein および Genistein 含量に加え、これらの前駆物質である Daidzin および Genistin 含量を測定しました (Figure 1)。飼育中の飼料および水は自由摂取としました。

【結果および考察】

平均腔開口日齢は、NIH-07 群が31.3日齢、NIH-07PLD 群が31.1日齢、MF 群が32.6日齢でした。腔開口がみられた日の平均体重 (g) は、NIH-07 群が117.8、NIH-07PLD 群が118.4、MF 群が120.7でした (Table 1)。腔開口日までの平均総摂餌量 (g) は、NIH-07 群が125.0、NIH-07PLD 群

が126.9、MF群が143.1であり、平均総摂取量から換算した平均総熱量 (Kcal) はNIH-07群が438.7、NIH-07PLD群が463.1、MF群が509.3でした。また、平均総摂取量から計算したDaidzein、Genistein、DaidzinおよびGenistinの平均総摂取量 (mg/rat) はそれぞれNIH-07群が4.7、7.2、2.2、3.2、NIH-07PLD群が3.1、検出限界以下、0.9、検出限界以下、MF群が16.7、18.5、7.0、0.7でした (Table 2)。

結論を述べますと、NIH-07群とNIH-07PLD群間については、Daidzein、Genistein、Daidzin、およびGenistinの総摂取量に差がみられました。ところが、平均膣開口日齢に差はみられませんでした。また、膣開口日の平均体重および平均総摂取量でも差はみられませんでした。一方、MF群の動物の平均膣開口日齢は、NIH-07群およびNIH-07PLD群と比較して有意な差がみられました。しかし、

膣開口日の平均体重では差はみられませんでした。

これらのことから飼料に含まれる程度の量のPhytoestrogenは膣開口日齢に影響を及ぼさないことが示唆されました。一方、MF群の平均膣開口日齢で1日ほどの遅延がみられましたが、平均膣開口日体重に差は認められないことから、体重の増加が膣開口、すなわち春期発動にとって重要な因子の一つであると考えられました。

なお、NIH-07群、NIH-07PLD群とMF群で体重の増加に差がみられた理由は、前者が後者に比べて柔らかくて食べやすく、堅いMFに比べて多く摂取したためと推測されます。このことから、餌の性状も動物の成長や性成熟に影響を与える可能性があることが考えられます。

(三苦秀)

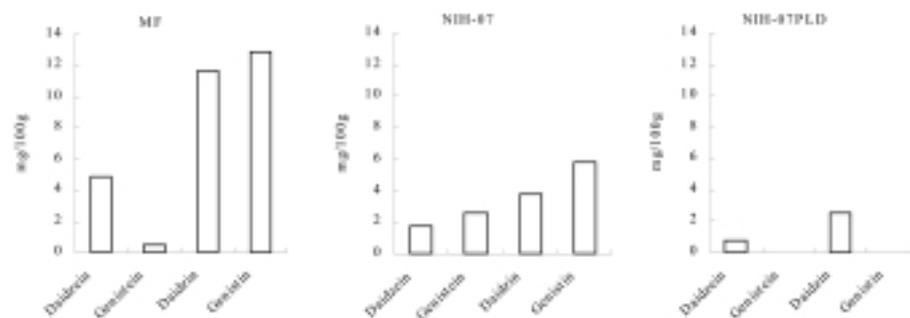


Figure 1 Comparison of phytoestrogen of each different diet

Table 1 Age at vaginal opening and body weights.

Sample diet	Number of animals examined	Mean \pm SD					
		VO (days)		Body weights (g)			
				Grouping		VO	
NIH-07PLD	33	31.1	††	43.9	**	118.4	
		\pm 2.0	\pm	\pm 4.6	\pm	\pm 13.7	
NIH-07	32	31.3	†	42.5		117.8	
		\pm 2.0	\pm	\pm 3.6	\pm	\pm 10.6	
MF	24	32.6		41.4		120.7	
		\pm 1.7	\pm	\pm 3.4	\pm	\pm 10.6	

VO, Vaginal opening.

† Significantly different from MF ($p < 0.05$, Wilcoxon rank sum test).

†† Significantly different from MF ($p < 0.01$, Wilcoxon rank sum test).

** Significantly different from MF ($p < 0.01$, t test).

Table 2 Accumulation of total food, diet energy and phytoestrogen intakes up to vaginal opening.

Sample diet	Food intakes (g) (N22~VO days)		Diet energy (N22~VO) (Kcal)	phytoestrogen (mg/N22~VO days)						
				Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein			
NIH-07PLD	126.9	463.1	3.1	** ##	ND	0.9	** ##	ND		
	\pm 40.1	\pm 146.3	\pm 1.0	\pm	\pm -	\pm 0.3	\pm	\pm -		
NIH-07	125.0	438.7	4.7	**	7.2	**	2.2	**	3.2	**
	\pm 35.6	\pm 125.1	\pm 1.3	\pm	\pm 2.1	\pm	\pm 0.6	\pm	\pm 0.9	
MF	143.1	509.3	16.7		18.5		7.0		0.7	
	\pm 25.3	\pm 90.0	\pm 3.0	\pm	\pm 3.3	\pm	\pm 1.2	\pm	\pm 0.1	

VO, Vaginal opening.

N, neonatal day.

† Significantly different from MF ($p < 0.01$, Wilcoxon rank sum test).

** Significantly different from MF ($p < 0.01$, t test).

Significantly different from NIH-07 ($p < 0.01$, t test).

ND, Not detected.

局所リンパ節増殖試験 (Local lymph node assay) の Non RI 化の試み

アレルギーは現代病として社会問題になっています。化学物質によって誘発されるアレルギーを事前に予測することは産業衛生上、極めて重要な課題で、これまでも化学物質の安全性評価の一環として皮膚感作性試験 (Guinea pig maximization test、Buehler test など) による遅延性過敏症の発症予測が行われてきたが、これらの試験はモルモットが高価である上、試験期間が長く経済的な負担も大きなものでした。

近年、英国の Dr. Ian Kimber らのグループ (現 Syngenta Central Toxicology Laboratory) によって Murine Local lymph node assay (LLNA) が開発され、国際的な評価試験が実施されるに至っています。この方法はマウスの耳に感作性を有する化学物質を塗布した際に感作性物質を認知したリンパ球から分泌されるサイトカインによって耳の直下にあるリンパ節内の細胞が特異的に増殖することを利用したものです。この方法は短期間で化学物質の感作性を客観的に評価できる非常に有用な方法ですが、原法では放射性同位体を投与する操作を伴い、廃棄物処理の問題等から我が国で広く普及するには多くの問題を抱えていました。

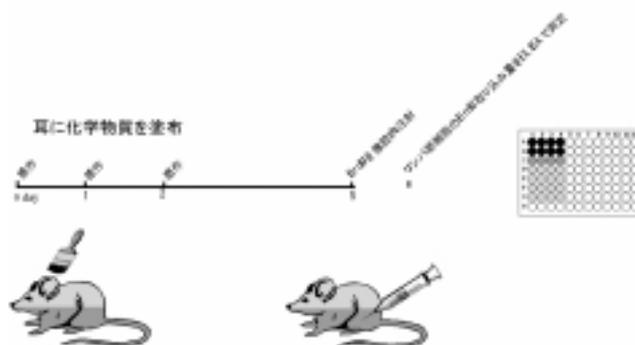
安全性評価技術研究所では本法の考案者でもある Dr. Kimber の協力の下で Thymidine の類似物質である BrdU を用いた LLNA 法の Non-RI 化を目指し、実験方法の改良および検証を実施してきました。

その結果、我々の開発した Non RI 手法は原法の測定原理に忠実で、且つ試験結果も試験物質の感作性の有無を良好に反映していることが示されました。本法は今後、感作性物質の簡易なスクリーニング手法として期待されます。

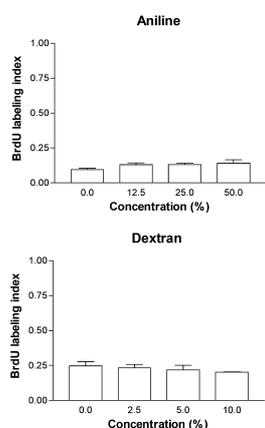
参考文献

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I., 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. Toxicology Letters 119, 203-208 (武吉)

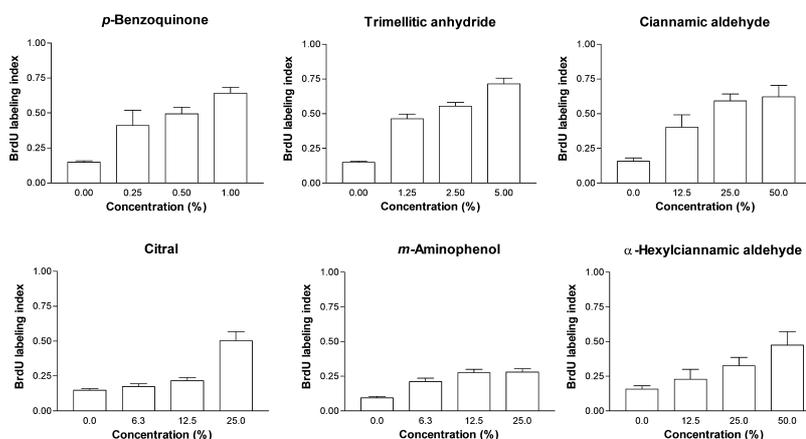
皮膚感作性試験代替法 (Non-RI Local Lymph Node Assay)



非感作性物質での実験例



感作性物質での実験例



東京事業所落成披露

本機構東京事業所は、昭和25年、東京都墨田区東向島に開所していらい皆様方の暖かいご支援をもちましてここまで発展して参りました。

しかし、業務の拡張により施設が手狭になったことに加えて、沿道の交通量の増大等から精密分析にふさわしくない環境になってきました。そこで、環境良好な場所に移転するとともに、施設の拡張および最新の分析装置の導入、さらには新たな化学物質の安全性に関する基礎研究を行う部門の新設を行いました。

この新しい東京事業所の見学会および落成式を10月19日に執り行いました。見学会および落成式には、官公庁、企業等から約220名の方に参加して頂きました。落成式は、本機構近藤理事長のあいさつで始まり、来賓を代表して経済産業省製造産業局次長 増田優様、地元杉戸町長 小川伊

七様からの祝辞をいただきました。つづきまして、製品評価技術基盤機構理事長 斎藤紘一様の音頭で乾杯の後、懇談いたしました。

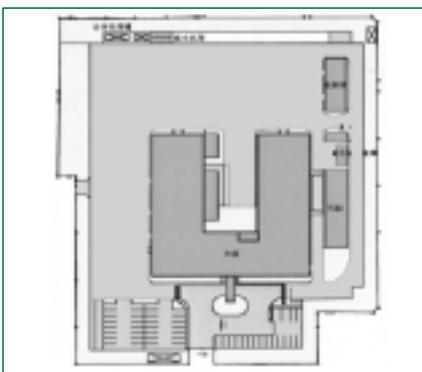
新しい事業所は、埼玉県北葛飾郡杉戸町にあり、敷地面積18,000m²、延べ床面積6,700m²と墨田区東向島の旧事業所に比べて延べ床面積で約2倍のスペースが確保されています。

また、従来の高分子技術部門、環境技術部門、化学標準部門、クロマト技術部門に併せて、化学物質安全部門と安全性評価技術研究所の2部門を新設して体制を強化いたしました。

今まで以上に社会の要望に迅速かつ的確に対応し、皆様方のお役に立つべく日夜努力を続けていく所存です。今後とも一層のお引き立てを賜りますようお願い申し上げます。



東京事業所



財団法人化学物質評価研究機構
東京事業所 概要

所在地
〒345-0043
埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600
TEL 0480(37)2601
FAX 0480(37)2521
敷地面積：18,000m²
建築面積：4,600m²
延床面積：6,700m²
役員員数：約110名

編集後記

第35号秋季号をお届けします。

めっきり秋めいてまいりましたが、皆様いかがお過ごしでしょうか。

巻頭言は、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構の戸部満寿夫顧問(本機構理事)から頂戴しました。誠にありがとうございました。

今号は、化学物質の安全性への取り組みを様々な視点か

らとらえお届けしました。皆様のご参考になれば幸いです。

次回の特集は、環境技術部門および化学標準部門について掲載する予定です。

また、このたび東京事業所は、東京都墨田区東向島から埼玉県北葛飾郡杉戸町へ移転いたしました。今後とも倍旧のご支援、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

(企画・小倉)

化学物質評価研究機構
ホームページ

<http://www.cerij.or.jp>

CERI NEWS 第35号 秋季号 発行日 平成13年11月

編集発行 財団法人化学物質評価研究機構 企画部

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-25 日教販ビル7F

Tel:03-5804-6132 Fax:03-5804-6139 mail to:cerinews@ceri.jp