

## 巻頭言

## Mayの話



日本獣医畜産大学 獣医学部獣医学科獣医生理学  
教授 鈴木勝士

英語の現在形、過去形、様々な助動詞の意味を、自然科学に携わるものとして今一度確認してみたい。因果律を認めるか否かで宗教と自然科学は袂を分かっている。その意味で原因と結果について紛れない判断が自然科学では要求される。因果律が成立すれば必ず再現性がある。「いつでも」「どこでやっても」「誰がやっても」そうなるということで再現性が認められ、そのような場合因果律成立として、英文法で言う「絶対的真理」として現在形を用いることが許される。では、「過去形」は、あるいは「～may～」などの表現が科学論文の中で用いられているが、これらはどのような意味があるのだろうか？

過去形の表現は「僕見たんだもん。」とケツをまくった表現である。過去の単純な事実と英文法では説明している。少なくとも関わりになっている人が、二度と起こらないかもしれないが、「ことに」出会ったことは間違いないと言っている。あるいは事実でなくても「(夢の中で) 太陽が西から昇ったのを僕は見た。」という表現は成り立つ。

問題は「may」である。受験英語ではmayは「～かもしれない」「～してもよい」という定番の訳が定着している。再現性をモットーとする自然科学に「かもしれない」はそぐわないではないか。実は、mayは50%の確率で起こることを意味している。正しい訳は「～が(50%の確率で) 起こる

可能性がある」ということになる。50%の確率ということとは「起こるかもしれない」し「起こらないかもしれない」し、「起こっても(起こらなくても) 不思議ではない」ことになるし、その意味では「どっちでも僕には関係ない」と解釈されかねないことになる。英語にはこのような確率こみの表現がたくさんあって日常的にその確率が前提で会話がなされている。perhaps、probably、maybeなど「多分」「おそらく」はいずれもその確率が異なっている。

内分泌攪乱物質の問題では「再現性」が疑問視される事象が話題になってきた。この背景には少なくとも上述の英語表現の無理解に基づく混乱もある。突然変異など百万分の一程度の低頻度確率事象の場合、哺乳動物での世代を超えた再現性の確認には一定程度の困難が付きものである。遺伝的に不均一な集団での低頻度確率事象は、選抜などによって背景遺伝子を均一化することができれば1:1対応の因果関係を証明できるようになる。一見再現性のない事象について確率論的に説明できるようにならない限り因果関係を論じるのは難しい。因果関係を解明するにあたって、シグナルトランスダクションのリダグダンシーなどのメカニズムに飛びつくよりも、落ち着いて確率論を見据える方が賢明といえるのではなかろうか。

## CERI 財団法人 化学物質評価研究機構

## CONTENTS

## ●巻頭言

「Mayの話」

日本獣医畜産大学 獣医学部獣医学科獣医生理学  
教授 鈴木勝士

## ●特集Ⅰ(化学物質安全部門Ⅱ) 日田事業所

## 1. 改訂がすすむOECDテストガイドライン

Ⅰ. 急性毒性試験のテストガイドライン変更について

Ⅱ. 急性皮膚刺激性/腐食性試験および急性眼刺激性/腐食性試験

## 2. 天然ゴム由来蛋白アレルゲンの定量法の開発

3. cDNA microarrayを用いた $\alpha_2\mu$ グロブリン発現変動メカニズムの解析

4. 変異マウス作製事業について

## ●特集Ⅱ(安全性評価技術研究所)

・化学物質の初期リスク評価および初期リスク評価手法の開発

-日田評価研における実施例-

・甲状腺機能に関する内分泌かく乱物質スクリーニング試験法開発の試み

## ●お知らせ

・無料クロマトセミナー

## ●編集後記

# 特集 1 (化学物質安全部門Ⅱ) 日田事業所

## 1. 改訂がすすむ OECD ガイドライン

### はじめに

日田事業所では、化審法届出用スクリーニング試験をはじめ医薬品申請、安衛法届出、農薬登録用等の各種安全性試験を実施してきております。これに加え、最近では、国の委託研究として内分泌攪乱が疑われる化学物質に対する安全性確認データを取る試験、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託によりトキシコゲノミクス分野に取り組んでいます。また、独自に化学物質の安全性に関連する種々の問題に対しても取り組んできています。今回は、OECDガイドライン改定状況および独自に開発したアレルゲンの検出法ならびにDNA microarrayを用いた遺伝子発現解析への取り組みの一端をご紹介します。

### I. 急性毒性試験のテストガイドライン変更について

平成14年12月17日をもって急性経口毒性試験に関するOECDテストガイドライン (TG) が変更されました。以前はTG401という大量の動物に一度に投与し、死亡率で化学物質の毒性を評価するという試験でしたが、試験結果がばらつきやすくLD<sub>50</sub>の再現性が悪い、動物の使用数が多いなどの理由から、動物数を減らした3つのガイドライン420、423、425となりました。これに伴い農薬の登録申請ならびに毒物および劇物取締法に必要な試験法がOECDに準じるよう変更されています。これら3つの試験は同等であり、どの試験法を選択するかは、試験依頼者または試験施設の判断となります。

TG420とはFixed Dose Procedure (固定用量法)であり、5、50、300、2000 mg/kgの4用量を用い、まず、見当づけ試験で1匹に投与し、その動物が死亡した場合は上の用量、毒性が無いときは下の用量と順に投与していき、死亡せずに明らかな毒性の出る用量を決定します。主試験は見当づけ試験で決まった用量を用い、4匹の動物で行います。結果の評価は見当づけ試験と主試験を合わせた5匹で行います。試験の評価は万国共通分類法 (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixture (GHS)) に基づいて危険度分類を行います。

TG423はAcute Toxic Class Method (急性毒性等級法)といい、TG420と同じ用量を用いますが、動物数は各群3匹で、3匹のうちの死亡数をもとに、順次投与をしていきます。また、同じ用量で2回投与します。評価は一回目と二回目の結果を合わせた各群6匹で行い、死亡をもとにして危険度分類を行います。

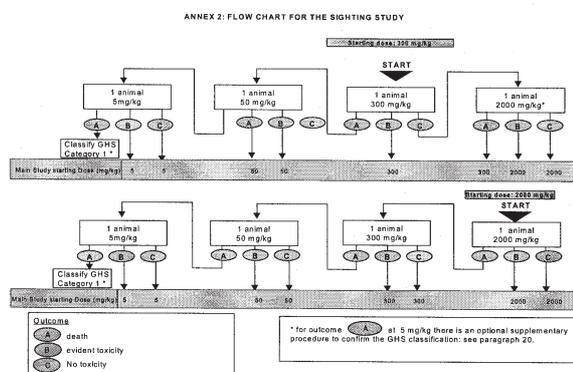
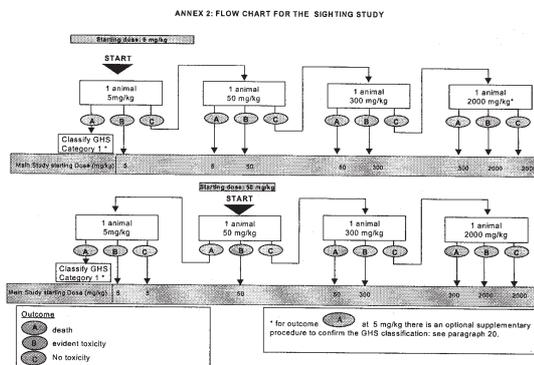


図 1-1 OECD TG420 Flow chart for the sighting study

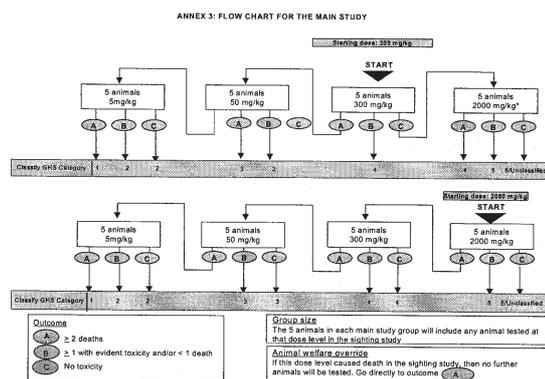
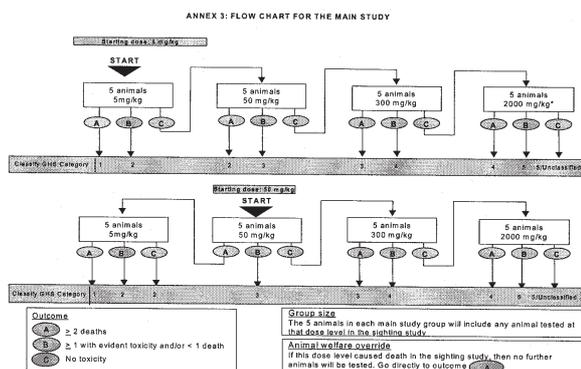


図 1-2 OECD TG420 Flow chart for the main study

TG425、Up-and-Down Procedure（上げ下げ法）は前2つの試験法とは異なり、固定された用量は用いません。まず、最初の動物に投与し、この動物が死亡すれば次の用量に下げ、生存すれば上げていきます。用量を順に上げ下げするのは同じですが、TG425では直前に投与した用量に、ある係数（3.2、毒性の出方により変更）をかけることで、次の用量を決定します。用量を連続して上げていくまたは下げていき、ある用量で結果（生存または死亡）が逆転したときを試験の終了とし、最終的にLD<sub>50</sub>を概算します。

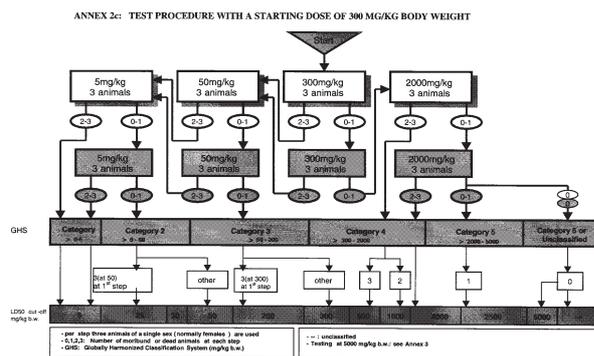


図2 OECD TG423 Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight

3試験ともにスタートの用量が重要であり、事前の毒性情報収集が必要です。これを間違えると何回も試験を行うことになります。動物は基本的に雌のみを使います。雄のほうが感受性が高いことが事前にわかっている場合は、雄で試験をすることになります。

## 文献

1. OECD Guideline for testing of chemicals, acute oral toxicity-Fixed dose procedure.
2. OECD Guideline for testing of chemicals, acute oral toxicity-Acute toxic class method.
3. OECD Guideline for testing of chemicals, acute oral toxicity-Up-and-down procedure.
4. OECD (2000) Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.24.
5. OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.19.
6. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances.

(日田・宮田)

## II. 急性皮膚刺激性/腐食性試験および急性眼刺激性/腐食性試験

### 1. はじめに

化学物質が皮膚、眼に接触した場合に影響があるのかどうかの検討には、以前から白色ウサギが広く用いられています。近年、動物愛護の観点から、検討に使用する動物数を削減すること、不必要な検討を減らすことが望まれており、2002年に改訂されたOECDの急性皮膚刺激性/腐食性試験および急性眼刺激性/腐食性試験のテストガイドライン（TG 404、TG 405）は、このことを反映した内容となっています。

### 2. 事前調査

TG 404およびTG 405では、まず、検討しようとする化学物質（以下化学物質）について、動物を用いる検討を実施することが適切かどうかを調査するよう求めています。つまり、すでに動物を用いて検討されていないか、ヒトに対する影響が明らかになっていないかなどについて調査します。この段階で化学物質の皮膚あるいは眼に対する急性刺激性あるいは腐食性が明らかになっていれば、動物を用いる検討は実施しないことになります。急性刺激性あるいは腐食性が明らかでない場合は動物を用いる検討の前に動物を用いない代替法による検討を実施することが推奨されています。代替法により急性刺激性あるいは腐食性を持つことが判明した場合、動物を用いる検討は実施しないことになります。これらの調査・検討ののち、動物を用いる検討が適切であると思われる化学物質について、はじめて動物を用いる検討を行うことになります。

### 3. 動物を用いる検討

最初に1匹の動物を用いて化学物質が皮膚あるいは眼に対して腐食性を持っているか、急性刺激性があるのかを検討します。この検討をInitial testといいます。Initial testにおいて腐食性が認められた場合、試験は終了となります。腐食性以外の反応が認められた場合は、その反応が可逆性か不可逆性かを確認します。次に2匹の動物を用いてConfirmatory testを行い、化学物質の急性刺激性について評価を行います。

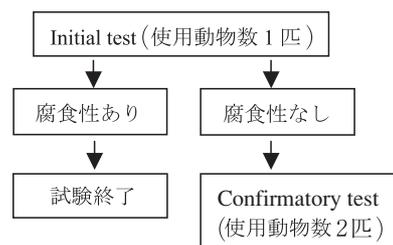


図1 動物を用いた試験の流れ

#### 4. まとめ

国内においても、農薬をはじめとして改訂 OECD TG 404、405 に準ずる試験ガイドラインの訂正あるいは改訂検討が行われています。現在、CERIでは動物を用いる急性皮膚刺激性/腐食性試験および急性眼刺激性/腐食性試験は GLP 試験、MSDS のような非 GLP 試験ともに改訂 OECD TG 404、405 に準じて実施しています。

#### 5. 参考文献

1. OECD (2002) Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 404
2. OECD (2002) Acute Eye Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 405

(日田・飯田)

## 2. 天然ゴム由来蛋白アレルギーの定量法の開発

### 1. はじめに

ラテックスアレルギーは天然ゴム（ラテックス）中に含まれる水溶性タンパク質をアレルゲンとし、接触部位の掻痒、発赤、膨疹、水疱形成等を主訴とするアレルギー性疾患であり、特に院内感染の予防などの目的でラテックス製品の使用頻度が高くなった医療従事者の罹患率が急激に上昇しています。また、食品業界においても、塩化ビニル手袋に替わるものとして、ラテックス手袋の使用が高まっており、使用者の発症リスクが高まっています。本疾患は天然ゴム中の水溶性アレルゲンが原因になっているため、アレルゲン溶出量の少ないゴム製品の開発は産業衛生上、極めて重要な課題であります。ゴム製品から溶出されるアレルゲンの検出法としては米国の Guthrie 研究所で実施されている Latex ELISA for Allergenic Protein (LEAP assay) や ELISA inhibition assay (ASTM D6499-00) が知られています。また、その他に単純に溶出される総タンパク質量を測定する方法 (ASTM D 5712-99) もあります。今回、我々は未精製ゴムシートから抽出した天然ゴム由来水溶性タンパク質を抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製し、ゴム製品から溶出される抗原性タンパク質の定量法 (ELISA inhibition assay) を確立しましたので紹介いたします。

### 2. 材料と方法

#### 1) 水溶性タンパク質の抽出

未精製ゴムシート (RRIM600) あるいは測定サンプル 1 g に対し PBS (pH 7.4) を 5 mL 加え、ポリプロピレン製容器にて 25℃、120 分、200rpm 振とうし、抽出を行いました。抽出液を 500 × g で遠心して沈殿を取り除き、実験に供しました。

#### 2) 抗体作製

ウサギ抗天然ゴム血清は日本白色種ウサギに抗原を一回当たり 100 μg の抗原を Freund's complete adjuvant とともに 1 週間間隔で 5 回免疫し、最終免疫の 2 週間後に全採血し、作製しました。

#### 3) タンパク質量

水溶性タンパク質の定量は、改良 Lowry 法 (ASTM D

5712-99) にしたがって測定を行いました。

#### 4) ELISA inhibition assay

測定用プレートは 50mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 5 μg/ml に調製した抗原を、greiner 社製 ELISA プレート (Immulon 200) に 100 μl ずつ添加して固相化した後、25%BlockAce (雪印乳業) を用いてブロッキングを行い作製しました。実験では試験液とウサギ抗天然ゴム血清をあらかじめ室温 1 時間反応させた後、抗原固相化プレートに添加し、プレートと反応した抗体をペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG で検出しました。

### 3. 結果および考察

#### 1) 用量依存曲線の確認

抽出した抗原の添加量に応じて用量依存的な吸光度の減少が観察され、本実験系において天然ゴム抽出液中の抗原タンパク質 (IgG 誘導性抗原) 量の推定が可能と推察されました (図 1)。実験条件の最適化を行った結果、測定可能範囲は 0.04 μg/mL ~ 50 μg/mL となりました。

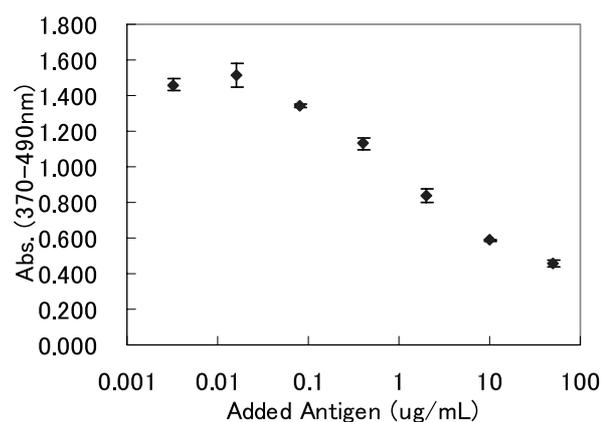


図1 抗原の添加量に応じた用量依存的な吸光度の減少

#### 2) ELISA inhibition assay と LEAP assay の比較

今回確立した ELISA inhibition assay と LEAP assay の比較を行いました。両手法の違いを表 1 に示します。また、米国 Guthrie 研究所での LEAP assay による測定結果と今回測定した ELISA inhibition assay による測定結果および改良 Lowry 法によるタンパク質量定量結果を表 2 に示しま

す。比較した結果、両者ともにタンパク質量が多くなるにしたがって抗原量が多くなる傾向が見られました。また、今回確立した実験系はLEAP assayと比べて相関係数0.85と比較的よい結果が得られております。完全に同一の結果にならなかった原因としては、使用抗体、使用標準抗原タンパク質等の違いがあると考えております。

表1 ELISA inhibition assay と LEAP assay の手法比較

	ELISA inhibition assay	LEAP assay
プレートコート	標準抽出タンパク質	サンプル抽出液
抗体反応	標準タンパク質との競合反応	直接
検出	標準タンパク質と反応した抗体を検出	サンプルを抗体反応より検出
抗原量算出法	標準タンパク質の検出阻害率から計算	標準抽出タンパク質の検量線から計算
測定手法	ASTM D 6499-00	Guthrie社独自

表2 LEAP assay と ELISA inhibition assay 測定値の比較

サンプルNo.	ASTM D 5712-99 タンパク量 ( $\mu\text{g/g}$ )		ELISA inhibition assay 抗原量 ( $\mu\text{g/g}$ )		LEAP assay 抗原量 ( $\mu\text{g/g}$ )
	Ave.	SD	Ave.	SD	
1	48.6 $\pm$ 5.9		6.9 $\pm$ 0.4		8.2
2	59.1 $\pm$ 5.0		3.3 $\pm$ 0.3		13.4
3	35.9 $\pm$ 14.2		1.5 $\pm$ 0.0		37.5
4	108.3 $\pm$ 23.7		23.9 $\pm$ 4.2		65.1
5	81.8 $\pm$ 4.2		7.7 $\pm$ 0.2		71.9
6	749.0 $\pm$ 20.4		115.9 $\pm$ 7.9		111.0
7	199.6 $\pm$ 17.6		74.8 $\pm$ 2.4		163.2
8	964.3 $\pm$ 28.5		156.7 $\pm$ 0.7		557.4

LEAP assayとの相関係数:0.85

### 3) 抽出タンパク質の電気泳動パターン

今回作製した抗体の選択性、ターゲットとなっている抗原を調べるために、抽出タンパク質の電気泳動による確認を行いました。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、銀染色し、タンパク質全体のパターンを確認したところ、サンプルでは、タンパク質量が少ないこともあり、検出はできませんでしたが、未精製ゴムシート (RRIM600) では、大小広い範囲のタンパク質が抽出されていることがわかりました (図2上)。一方、今回作製した抗体を用いたウエスタンブロットでは、未精製ゴムシート (RRIM600) で4つのメジャーなタンパク質が抗原として確認されました (図2下)。これらは、分子量が14、18、27、35kDaであることから、それぞれ既報のHev b1, b5, b3, b2に相当するものと考えております。

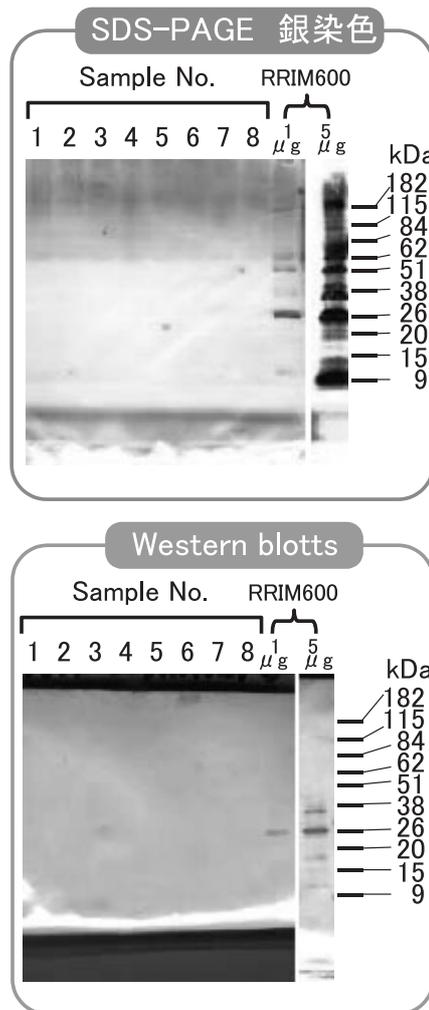


図2 抽出タンパク質の電気泳動パターン

### 4. まとめ

未精製ゴムシートから抽出した天然ゴム由来水溶性タンパク質を抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製し、ゴム製品から溶出される抗原性タンパク質のELISA inhibition assayによる定量法の確立ができました。LEAP assayと比べて相関係数0.85と比較的よい結果が得られ、有用であることが確認されております。今後は、より多くのラテックス製品を測定し、ラテックスアレルギーの削減、抗原レベルの低いラテックス製品の開発に助力していきたいと考えております。最後にサンプルをご提供いただきました(有)G&Aの中出伸一氏にこの場をかりてお礼申し上げます。

(日田・宮浦)

ラテックスアレルギーに関する測定ご依頼、ご質問等ございましたら下記までお問い合わせ下さい。  
財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所  
Tel 0973-24-7211 担当：武吉、宮浦

### 3. cDNA microarray を用いた $\alpha_{2u}$ グロブリン発現変動メカニズムの解析

日田事業所ではDNA microarrayを用いた遺伝子発現解析に取り組んでいます。DNA microarray (図1)は遺伝子断片を高密度にスライドガラスなどの支持体に張り付けたもので組織などに発現する遺伝子を一度に網羅的に解析することが出来ます。

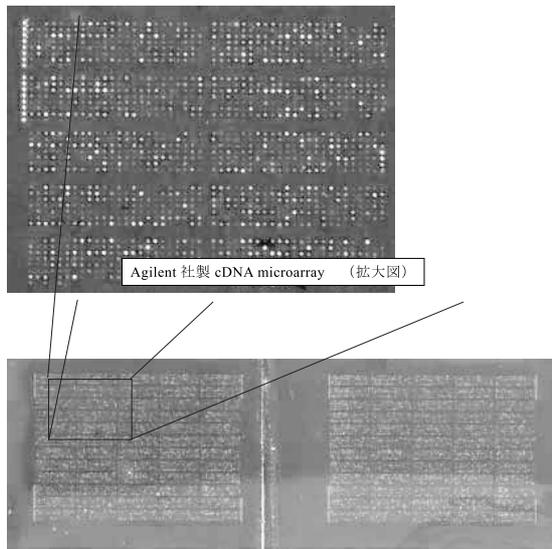


図1 Agilent社製 cDNA microarray (全体像)

今回はDNA microarrayを用いた $\alpha_{2u}$ -globulin (AUG) 遺伝子の発現変動のメカニズム解析について紹介します。AUGは成熟雄ラットの血清および尿中に存在する分子量約19kDaの蛋白質で、肝臓で生合成されます。AUGの生合成や遺伝子の転写は各種ホルモン (Estrogen、Androgen、Growth hormone等) によって影響を受けることが知られており、特にEstrogenの投与により肝臓でのAUG遺伝子の転写や血清AUG濃度が著しく減少します。実験では雄成熟ラットにDiethylstilbestrol (DES) を0mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kgの用量で7日間連続投与し、投与1日後、3日後、7日後に動物の肝臓からtotal RNAを採取し、cDNA microarrayを用いてAUG発現抑制メカニズムについて解析を行いました。

その結果、DES投与によって、投与1日後の血清AUGレベルの上昇と3日後から7日後にかけての血清AUGレベルの減少が観察されました (図2)。血清AUGの変動は0.1mg/kgよりも1mg/kgで顕著であり、1mg/kg投与群の7日後の血清AUGレベルは全例検出限界以下となりました。0.1mg/kg投与群の一部の動物において著しい血清AUGの減少が観察されましたが、0.01mg/kg投与群では血清AUGの明らかな変動は観察されませんでした。本実験に使用した動物の肝臓における遺伝子発現の変動をAgilent社製 cDNA microarrayを用いて網羅的に解析した結果 (図3)、DESの投与の用量および血清AUGと連

動した一連の遺伝子群が抽出されました。注目される遺伝子にはRat ribosomal protein L21 mRNA, complete cds、Rat senescence marker protein 2A gene, exons 1 and 2、Rat mRNA for Ulip and dihydropyrimidinase-like protein、Mouse TSC22-related inducible leucine zipper 2 (Tilz2) mRNA, complete cds.等が含まれておりましたが、特にRat senescence marker protein 2A gene (SMP-2)はAUG遺伝子が発現しない雌動物では生涯を通して高率に発現し、雄ではAUGが発現していない若齢期に発現し、成熟するに従って発現量が低下することが知られています。これらのことから、EstrogenによるAUG発現低下とSMP-2との関連性が注目されます。

このようにDNA microarrayは遺伝子解析の強力な手段となります。日田事業所ではMicroarray技術を始め、さまざまな先進技術を駆使した新しい毒性試験に挑戦しています。

(日田・武吉)

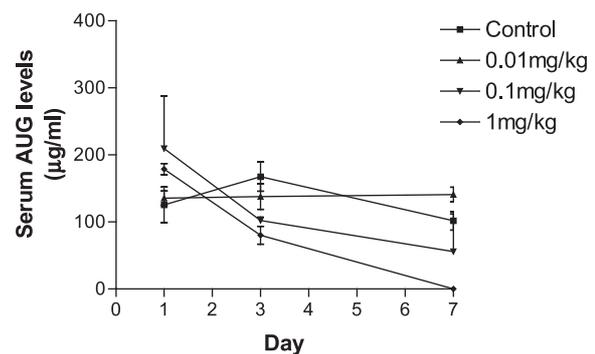


図2 DES投与期間中の血清AUG levelの変動

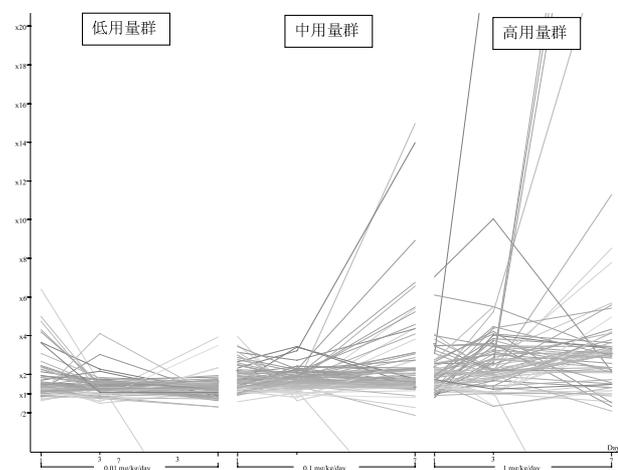


図3 対照群との発現比において3倍以上の変化が認められた遺伝子群 (GeneSpringを用いた解析)

## 4. 変異マウス作製事業について

当機構では、ベンチャー企業である株式会社トランスジェニック（TG社）の依頼を受け、今年の5月から日田事業所において変異マウス作製事業を開始しています。本事業は、突然変異マウスを作製し、その表現型を解析して突然変異を起こした遺伝子の機能を推定するというものです。ヒトゲノムの構造解析がほぼ終了し、そこに3万2千個余の遺伝子の存在することが判明した今、それらの遺伝子の機能を解明し、得られた成果を創薬を始めとしてバイオ産業に利用しようという動きが世界中で活発化しています。本事業は、その一翼を担うもので、ES細胞で発現していると想定される1~2万個の遺伝子全てについて、突然変異を起こしたマウスを作製することを目標としています。ヒトの遺伝子が約3万個であることを考えると、この事業の目標が如何に壮大なものが理解できると思います。

ヒトの遺伝子の機能を解析するのになぜマウスの遺伝子かという点、ヒトとマウスでは80%以上で同じ遺伝子が存在すると推定されているからです。つまり、マウスの遺伝子の機能を解明することで、ヒトの遺伝子の機能がわかるということです。そして、マウスには、遺伝子の機能解析に当たり、実験動物として古くから使用されてきて背景データが豊富なことや、ヒトでは実施できなかつたり実施することに困難を伴う種々の分子生物学的手法や生殖発生工学的的手法などが実施できるという利点があるからです。

現在、機構においてはキメラマウスの作製作業を週当たり6系統の割合で実施していますが、来年度からは週当たり8系統で実施する予定です。以下に、突然変異マウス作製の原理ならびに本業務の概要とその流れを示します。

### 1. 突然変異マウス作製原理

ベクターをES細胞に組み込ませる。ベクターがES細胞の遺伝子内に組み込まれることで、その遺伝子の構造が変化して突然変異が生じる。突然変異を起こしたES細胞を正常なマウスの胚と融合させ（キメラ胚、写真1）、キメラマウス（写真2）を作製する。突然変異が生じたES細胞が生殖細胞に分化したキメラマウス（生殖キメラマウス）と正常なマウスとを交配させることで、産仔に突然変異マウスが生まれる。

### 2. 業務の概要とその流れ

- (1) ベクターの作製およびベクターのES細胞遺伝子への組み込み（TG社が実施）
- (2) ベクターが組み込まれたES細胞（トラップES細胞）の選抜（TG社が実施）
- (3) トラップES細胞と癒合させる正常胚を得るためのホルモン投与による雌マウスへの過排卵処理
- (4) 過排卵処理マウスからの正常胚の採取

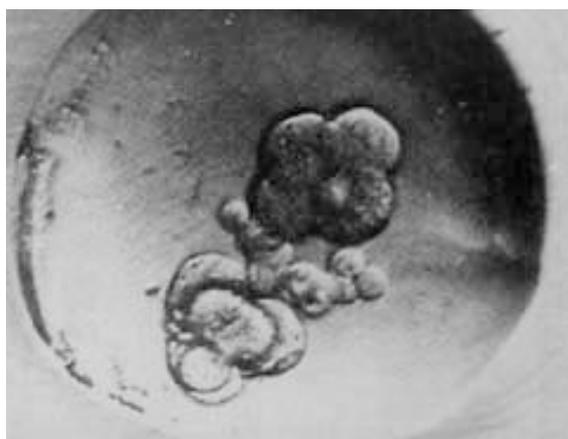


写真1 キメラ胚 中央の小さな塊の細胞がES細胞、大きな塊の細胞が正常胚



写真2 キメラマウス

- (5) トラップES細胞と正常胚とを融合させてできるキメラ胚を移植するための仮親作製
- (6) トラップES細胞と正常胚との融合によるキメラ胚の作製およびキメラ胚の培養
- (7) キメラ胚の仮親子宮への移植およびキメラマウスの誕生
- (8) トラップES細胞を用いての突然変異遺伝子の同定（TG社が実施）
- (9) 生殖キメラマウス選抜のためのキメラマウスと正常マウスとの交配および仔の誕生
- (10) 出生仔DNAを用いてのベクターDNAをマーカーとしたPCRおよびサザンブロッティング解析による生殖キメラマウスの選抜
- (11) 生殖キメラマウスの精子と正常マウスの未受精卵とによる体外受精
- (12) 体外受精で得られた胚の仮親卵管への移植およびマウスの誕生
- (13) 出生マウスDNAを用いてのベクターDNAをマーカーとしたPCRによる突然変異マウスの選抜

- (14) 突然変異マウスを用いての表現型解析  
行動機能検査、体重測定、尿検査、血液学的検査、  
血液化学的検査、剖検、組織学的検査など
- (15) ベクター内のマーカー遺伝子の発現に基づく突然変異  
遺伝子のマウス個体での発現部位の同定
- (16) 突然変異マウスの精子と胚の凍結保存

#### 用語説明

- ・ES細胞：胚由来の細胞で、それ自体は個体にならないが、胚と混ざることにより体の全ての器官や組織に分化

- できる性質を試験管内で半永久的に保持した細胞。
- ・キメラ：2種類以上の遺伝形質の異なった細胞または組織から構成された個体。
- ・ベクター：外来性DNAを組み込み、宿主細胞内で増えることのできるDNA。
- ・PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）：特定の遺伝子またはDNAを試験管内で多量に増幅する技術。
- ・サザンブロッティング：特定の遺伝子またはDNAをフィルター上で検出する技術。

(日田・麻生)

## 特集 2 (安全性評価技術研究所)

### 化学物質の初期リスク評価および初期リスク評価手法の開発 —日田評価研における実施例—

現在、国内においては化学物質の有害性やリスクを評価するためのデータ収集および評価手法は十分には整備・体系化されていません。このような背景のもとに、当機構では平成13～18年度にかけて、新エネルギー・産業技術総合開発機構からの委託を受け、化学物質総合評価管理プログラムの下に先般制定されたPRTR法対象物質のうち高生産量化学物質を中心に有害性情報、暴露情報等の基礎データを収集・整備し、①有害性評価、②暴露評価および③初期リスク評価手法の開発を行っています。この開発過程でまとめられた初期リスク評価書はインターネットで公開されています (<http://www.safe.nite.go.jp/siryou/project/main.html>)。本プロジェクトは産業技術総合研究所、製品評価技術基盤機構の協力を得て実施しています。以下に初期リスク評価に至るまでの概要と、安全性評価技術研究所日田事業所（日田評価研）で実施し、現在公開されている2物質の評価結果についてご紹介いたします。

#### 1. 概要

##### 1) 有害性評価

化審法指定化学物質や、有害性が懸念され生産量の多い既存化学物質から、対象物質を選定します。次に選定された物質について、国際的評価機関等で発行されている評価文書（IARC、EHC、ATSDR等）のほか、それらに引用されている重要な文献や、これらの評価文書の発行年以降に発表された最新の文献、および各研究機関で実施された試験結果報告書等を査読し、有害性評価書を作成します。

##### 2) 暴露評価

PRTR制度による環境への放出量および環境中の化学物質のモニタリング結果等を用いて環境中の生物とヒトへの推定暴露量を算出します。

#### 3) 初期リスク評価

1) で作成した有害性評価書に取り上げたデータの中から、環境中の生物への無影響濃度とヒトへの無毒性量を決定します。この結果と2) で算出した推定暴露量にもとづき、暴露マージン（Margin of Exposure; MOE、無影響濃度もしくは無毒性量を推定暴露量で割った値）を算出します。MOEの値が大きいほど、現時点の暴露量が環境中の生物またはヒトに有害性を発現するまでの余裕が大きいことを示します。次に、採用した試験について、環境中の生物もしくはヒトの健康へ外挿するための不確実係数積（個人差、種差、試験期間、毒性の重篤度等を考慮し、これらをかけあわせた値）を算出し、MOEと比較して、リスクの判定を行います。

#### 2. 初期リスク評価結果

日田評価研で評価を実施し、現在結果が公開されている1,2-ジクロロエタンおよび1,1,2-トリクロロエタンについて表に示します。

例えば1,2-ジクロロエタンのヒト健康に対する初期リスク評価の場合、経口経路においてMOEは無毒性量（37,500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ）を推定暴露量（1.65  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ）で割った値、すなわち22,700です。一方、不確実係数積は、個人差10、種差10および試験期間5を掛け合わせた値、すなわち500です。ここで算出された結果を比較しますと、MOEが不確実係数積を上回り、ヒト健康へのリスクは低いと言えます。同様に計算した結果、1,2-ジクロロエタンおよび1,1,2-トリクロロエタンは、現時点では環境中の生物およびヒトの健康へ悪影響を及ぼす可能性は低いことが示唆されました。

(評価研・奥田)

表 初期リスク評価実施結果 (1,2-ジクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン)

物質名	ヒトに対するリスク評価						環境中の生物に対するリスク評価				
	経路	無毒性量 ( $\mu$ g/kg/日)	ヒト暴露量 ( $\mu$ g/kg/日)	MOE ※①	①と ②の 比較	不確実 係数積 ②	無影響濃度 ( $\mu$ g/L)	環境中濃度 ( $\mu$ g/L)	MOE ※③	③と④ の比較	不確実 係数積 ④
1,2-ジクロロエタン	経口	37,500	1.65	22,700	>	500	1,020	0.5	2,040	>	10
	吸入	63,600		3,860	>	100					
1,1,2-トリクロロエタン	経口	3,900	2.1	1,860	>	1,000	3,000	0.3	10,000	>	10

※MOE;Margin of Exposure、暴露マージン

## 甲状腺機能に関する内分泌かく乱物質スクリーニング試験法開発の試み

### 要約

雄ラットにヨウ素の有機化を阻害する物質である6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) を0, 0.01, 0.1, 1 mg/kg/dayの用量で生後1日から5日間経口投与し、発育分化検査、反応性検査、情動性検査、学習能力検査、包皮分離、器官重量測定、血清中ホルモン測定、病理学的検査を実施した。その結果、0.01 mg/kg/day群からthyroxin (T4)の増加、0.1 mg/kg/day群からthyroid-simulating hormone (TSH)の減少、1 mg/kg/day群で甲状腺重量の増加と病理組織学的に甲状腺におけるコロイドを充満した濾胞の増数がみられた。

また、以前PTUにおける思春期投与試験、改良TG407試験(いずれも投与量: 0, 0.01, 1 mg/kg/day)を実施したが、思春期投与試験では1 mg/kg/day群でT4とtriiodothyronine (T3)の減少、甲状腺と下垂体重量の増加、甲状腺の濾胞上皮細胞の腫大、下垂体におけるbasophilic cellsの増加が、改良TG407試験では0.01 mg/kg/day群からT4とT3の減少、1 mg/kg/day群で甲状腺の重量増加、甲状腺の濾胞上皮細胞の腫大、TSHの増加、下垂体でのbasophilic cellsの増加が観察され、両試験共に同様な変化が認められた。これらの試験と今回の試験を比較した結果、今回の試験においてもPTUによる甲状腺への影響はとらえられるものの、変化自体は思春期投与試験、改良TG407試験と異なることが明らかになった。また、感度的には今回の試験では0.01 mg/kg/day群から変化がみられ、改良TG407試験と同じであり思春期投与試験より良好であった。

### 緒言

内分泌かく乱物質がヒトあるいは野生動物の内分泌系、神経系、免疫系、生殖器系に対する影響が報告されている。

OECDでは1998年から女性および男性ホルモン様作用を短期間で検出する試験方法として、ラットを使用したスクリーニング試験法(子宮増殖試験、Hershberger試験)の開発が開始され、再来年にはガイドライン化する予定である。一方、女性および男性ホルモンばかりでなく、甲状

腺機能障害による内分泌かく乱作用も重要な問題であるが、その影響を検出する試験法の一つとして、OECDは従来の28日間反復投与毒性試験(TG407)を改良した“改良OECD test guideline no. 407(改良TG407試験)”を、一方米国のEPA(EDSTAC)は“Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats(思春期投与試験)”を提唱している。

以前当機構においても代表的な甲状腺機能障害物質として知られているヨウ素の有機化阻害作用の6-n-propyl-2-thiouracil (PTU)を用いた改良TG407試験と思春期投与試験の比較試験を実施し、発現した変化について両試験間に本質的な差がなかったことを確認している(Yamasaki et al. 2002)。しかし、両試験の投与開始時期が改良TG407試験では生後8週、思春期投与試験では生後23日と、動物がある程度成熟してからの影響を検索したものである。一方、出生児に暴露された影響を想定し、出生直後から5日間という短期間に暴露する新生児期投与試験が提唱され、すでにその方法においてエストロゲン作用物質であるdiethylbestrol、ethynylestradiol、clomiphene、tamoxifenでの内分泌かく乱作用が認められている(Branham et al. 1988; Medlock et al. 1988; Iguchi et al. 1989)。そこで、PTUを出生直後から5日間という短期間暴露した場合、どのような変化が発生するのか、さらには改良TG407試験、思春期投与試験と質的に異なった変化が発生するのか、影響を発現する用量に差がみられるのかを目的として、今回の試験を実施した。

### 材料および方法

試験物質: 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU, CAS No. 51-52-5, 99% pure)を使用した。

動物: 11週齢のCrj:CD (SD) IGS SPFラット(日本チャールズリバー株式会社、滋賀)の未経産雌50匹を購入し、14週齢で雄と交配後、交尾が確認された動物を各群10匹ずつ振り分け、それらの出産児を使用した。出生児は、生後7日(PND7、出生日をPND0とする)に同腹出生児数を親1匹当り雄8匹になるよう無作為抽出法を用い

て調整し、雄が8匹に満たない場合は雌雄の合計が8匹になるようにした。各検査に関しては、これらの同腹新生児のうち可能な限り各群雄4匹について発育分化検査、包皮分離検査、器官重量測定、病理組織学的検査、2匹について反応性検査、情動性検査、学習能力検査、ホルモン測定を実施した。各検査に使用した動物数を下表に記載する。

検査項目	VC	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg
発育分化検査	40	40	38	36
反応性検査	20	20	20	18
情動性検査	20	20	20	18
学習能力検査	20	20	18	18
包皮分離検査	38	38	38	36
器官重量測定	38	35	38	36
ホルモン測定	19	19	20	17
病理組織検査	38	35	38	36

投与：PTUの投与用量は先に実施した思春期投与試験、改良TG407試験を考慮し0.01、0.1、1 mg/kg/dayとし、PND1-5に強制経口投与した。投与容量は10 ml/kgとし、調製液に対し濃度、均一性、安定性を確認した。なお、媒体にはオリーブ油を使用した。

検査：以下の項目について実施した。

- ・発育分化検査

PND12に下顎切歯萌出、PND14に眼瞼開裂について実施した。

- ・反応性検査

PND8に背地走性を、PND13にオーディオメーターを用い、60 dB、1,000 Hz および20,000 Hzで耳介反射を実施した。

- ・情動性（Open-field）検査

PND23に、室内を暗くした検査室で円形の装置を使用し、装置の底面上1 mから100 wの白熱球でフィールド全体を照射した状態で1日1回2分間、3日連続し、潜時、区画移動数、立ち上がり回数、身づくろい回数、洗顔回数、脱糞回数、排尿回数を検査した。

- ・学習能力（水迷路）検査

PND29にT型水迷路装置を使用し、水泳能力、Goal到達時間、ゾーン内エラー数、選択錯誤数を検査した。

- ・包皮分離検査

Yamasakiら（2001）の方法に従い包皮分離検査を行った。

- ・器官重量測定

脳、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、精囊（凝固腺を含む）、腹葉前立腺、肛門挙筋+球海綿体筋、精巢、精巢上体、肝臓、腎臓、副腎の重量を測定した。なお、甲状腺（上皮小体を含む）についてはブアン液に固定し約24時間後に測定し、下垂体については10%中性緩衝ホルマリン液で固定し約24時間後に測

定した。

- ・ホルモン測定

解剖時（PND61）に採取した血液から血清を分離し、得られた血清について甲状腺に関するthyroid-stimulating hormone（TSH）、thyroxine（T4）、triiodothyronine（T3）を測定した。

- ・病理組織学的検査

脳、下垂体、甲状腺について、パラフィン包埋、薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し光学顕微鏡的に検査した。

## 成績

一般状態および剖検について各PTU投与群に異常はみられなかった。また、体重、発育分化検査、反応性検査、情動性（Open-field）検査、学習能力（水迷路）検査、包皮分離検査および剖検においても媒体対照群と各PTU投与群間に差はみられなかった。

器官重量では0.1 mg/kg/day以上の群で脳重量の絶対重量増加、1 mg/kg/day群で相対重量増加がみられた。また、1 mg/kg/day群で甲状腺の絶対、相対重量の増加が認められた（表1）。

ホルモン測定では0.01、1 mg/kg/day群でT4の増加がみられ、中用量の0.1 mg/kg/day群においても有意差はつかないものの増加傾向がみられた。また、0.1 mg/kg/day群でTSHの減少が認められ、1 mg/kg/day群においても減少傾向があった（表2）。

病理組織学的検査では1 mg/kg/day群の甲状腺においてコロイドを充満した濾胞の増数が観察された（表3）。

表1 Body weights and abnormal organ weights (mean ± SD) in neonatal assay

	Control (n=38)	0.01mg/kg (n=35)	0.1mg/kg (n=38)	1mg/kg (n=36)
Body weights (g)	390.7±28.7	387.7±32.7	392.3±29.3	384.9±32.7
Organ weights				
Thyroids				
Absolute (mg)	18.5±2.92	18.8±3.27	19.5±2.80	22.7±4.57**
Relative (mg/100g)	4.74±0.77	4.87±0.85	4.99±0.70	5.91±1.22**
Brain				
Absolute (mg)	2014.0±83.2	2018.1±70.9	2052.9±63.4*	2060.9±64.6*
Relative (mg/100g)	517.5±34.3	523.3±35.6	525.8±37.0	538.5±39.7*

\* \*\* Significantly different from control at  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively

表2 Thyroid-stimulating hormone (TSH), thyroxin (T4) or triiodothyronine (T3) concentration (mean ± SD) in neonatal assay

Items	Control (n=19)	0.01mg/kg (n=19)	0.1mg/kg (n=20)	1mg/kg (n=17)
TSH (ng/ml)	11.2±3.3	11.3±2.1	8.96±2.5*	9.48±2.26
T4 (µg/dl)	5.75±0.68	6.65±0.99**	6.31±0.81	6.47±0.86**
T3 (ng/dl)	50±10	57±30	50±10	50±10

\* \*\* Significantly different from control at  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively

表3 Histopathological changes in neonatal assay

Organs Findings	Control (n=38)	0.01mg/kg (n=35)	0.1mg/kg (n=38)	1mg/kg (n=36)
Thyroid				
Increased follicles filled with colloid	3 <sup>a)</sup>	5	4	16

<sup>a)</sup> Number of animals affected

## 考 察

今回の試験において、甲状腺機能障害に関する変化として甲状腺の重量増加、コロイドを充満した濾胞の増数、さらにはTSHの減少とT4の増加がみられた。PTUの甲状腺に対する機序は、PTUのヨウ素の有機化阻害に伴って血中甲状腺ホルモン濃度の低下が起り、下垂体へのネガティブフィードバックが抑制される結果、TSHの産生が増加し、その結果甲状腺濾胞上皮の増殖を促進するというものである (Cappen 1997)。前回実施した思春期投与試験、あるいは改良TG407試験ではT3、T4の減少、TSHの増加、濾胞上皮細胞の腫大がみられPTUによる障害を説明する変化がみられた。しかし、今回は甲状腺の重量増加はあるものの、TSHの減少、T4の増加、濾胞内のコロイドの充満など、思春期投与試験、改良TG407試験で出現した所見と逆の変化を示していた。今回みられたホルモン値の変化については血中のT4が高いため、TSHの分泌を抑えた可能性が推測され、組織学的にも下垂体に増殖性の変化がなく、さらに甲状腺の濾胞上皮細胞の活性化がみられなかった所見と一致する。今回みられたホルモン値の変動、組織学的変化は成熟ラットにthyroxinを28日間投与した場合にみられる変化に類似している (OECD, 2003)。なぜ、投与時期により変化が異なったのかという点については十分に説明することはできないが、PTUに起因する変化であることは確かである。当機構の内部資料においてPTUを妊娠期から離乳時まで母ラットに投与した場合、親動物では甲状腺の濾胞上皮細胞の腫大はみられるものの、出生児動物において今回と同様の濾胞内のコロイドの充満が観察されている。

周産期から授乳期にかけてPTUを飲水投与したラット出生児において低体重、身体発達遅延、聴覚欠損、学習能力の低下等の影響が報告されている (Akaike et al. 1991; Golden, et al. 1995)。今回の試験において脳重量の増加がみられたが、発育分化検査、反応性検査、情動性検査、学習能力検査に異常がなく、脳の組織学的変化もみられなかった。従って、脳重量の変動の原因については不明だが、重大な影響とは考えられなかった。

今回の試験と以前実施した思春期投与試験、改良TG407試験との感度の比較については、思春期投与試験では1 mg/kg/day群でT4とT3の減少、甲状腺と下垂体重量の増加が、病理組織学的には甲状腺の濾胞上皮細胞の肥大と下垂体でのbasophilic cellsの増加が観察され (Yamasaki, et al, 2002)、一方、改良TG407試験では0.01 mg/kg/day群からT4とT3の減少、1 mg/kg/day群でTSHの増加、甲状腺の重量増加、甲状腺の濾胞上皮細胞の肥大、下垂体でのbasophilic cellsの増加が観察された。これらの試験と今回の試験を比較した場合、みられた変化自体は別として感度的には改良TG407試験と同じであり思春期投与試験より良好であった。

## 引用文献

- Akaike M, Kato N, Ohno H, Kobayashi T (1991) Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicol Teratol* 13: 317-322
- Branham WS, Zehn DR, Chen JJ, Sheehan DM (1988) Uterine abnormalities in rats exposed neonatally to diethylbestrol, ethynylestradiol, or clomiphene citrate. *Toxicology* 51: 201-212
- Cappen CC (1997) Mechanistic data and risk assessment of selected toxic endpoints of the thyroid gland. *Toxicol Pharmacol*. 25: 39-48
- Golden ES, Kehn LS, Rehnberg GL, Grofton KM (1995) Effects of developmental hypothyroidism on auditory and motor function in the rat. *Toxicol Pharmacol* 135: 67-76
- Iguchi T, Todoroki R, Yamaguchi S, Takasugi N (1989) Changes in the uterus and vagina of mice treated neonatally with antiandrogen. *Acta Anat* 136: 146-154
- Medlock KL, Sheehan DM, Nelson CJ, Branham WS (1988) Effects of postnatal DES treatment on uterine growth, development, and estrogen receptor levels. *J Steroid Biochem* 29: 527-532
- OECD (2003) Fourth meeting of the validation management group for the screening and testing of endocrine disrupters (mammalian effects), April 14-15, 2003. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris
- Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Takatsuki M (2001) Preputial separation and glans penis changes in normal growing Crj:CD (SD) IGS rats. *Reprod Toxicol* 15: 533-536
- Yamasaki K, Tago Y, Nagai K, Sawaki M, Noda S, Takatsuki M (2002) Comparison of toxicity studies based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407" and the research protocol of "Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats" with 6-n-propyl-2-thiouracil. *Arch Toxicol* 76: 495-501

(評価研・室井)

## 無料クロマトセミナー

平成15年度クロマトセミナーを次のとおり開催いたします。皆さまのご参加をお待ちしております。  
なお、ご参加は無料です。

### ☆セミナー内容☆

#### 「HPLCにおける分離の基礎」

講師：名古屋大学名誉教授 工学博士 石井 大道先生  
順相、逆相、サイズ排除、イオン交換の分離モードを中心に、試料成分に対しての適切なカラムと移動相選択について。

#### 「逆相系 HPLC カラムの取扱について」

講師：本機構職員  
HPLCにおいて最も多く使用されている逆相系カラムについて使用上の留意点について解説。

### ☆開催日程☆

●開場は12:30となります。

	日 時	会 場	募集人数
55回 (東京)	平成15年11月21日(金) 13:00～16:30 (終了予定)	北とぴあ つつじホール	300名
56回 (横浜)	平成15年12月5日(金) 13:00～16:30 (終了予定)	ラジアントホール	150名

※各会場共、定員になり次第受付を締め切らせて頂きますので、お早目にお申込下さい。  
定員を超えた場合に限りご連絡致します。

セミナー参加ご希望者は、参加ご希望日、お名前、お勤め先およびお勤め先住所、  
お電話番号、FAX番号をご記載の上、FAXまたはお葉書にて下記宛にお申し込み下さい。  
また、本機構ホームページ (<http://www.cerij.or.jp>) から  
お申し込みができますのでどうぞご利用ください。

財団法人化学物質評価研究機構 東京事業所クロマト技術部セミナー係  
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番  
TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521

### 編集後記

第43号秋季号をお届けいたします。  
いよいよ秋も本番となり、皆様ますますご健勝のことと存じます。日頃はいろいろとお世話になり、お礼申し上げます。  
巻頭言は、「Mayの話」について日本獣医畜産大学獣医学部獣医学科教授鈴木勝士先生から頂戴しました。

誠にありがとうございました。  
今回は、化学物質安全部門Ⅱ・日田事業所および安全性評価技術研究所における活動を紹介させていただきました。  
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。(企画部・吉岡)

化学物質評価研究機構  
ホームページ

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

CERI NEWS 第43号 秋季号 発行日 平成15年10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@cerij.jp

古紙配合率100%再生紙を使用しています 