

環境変異原研究

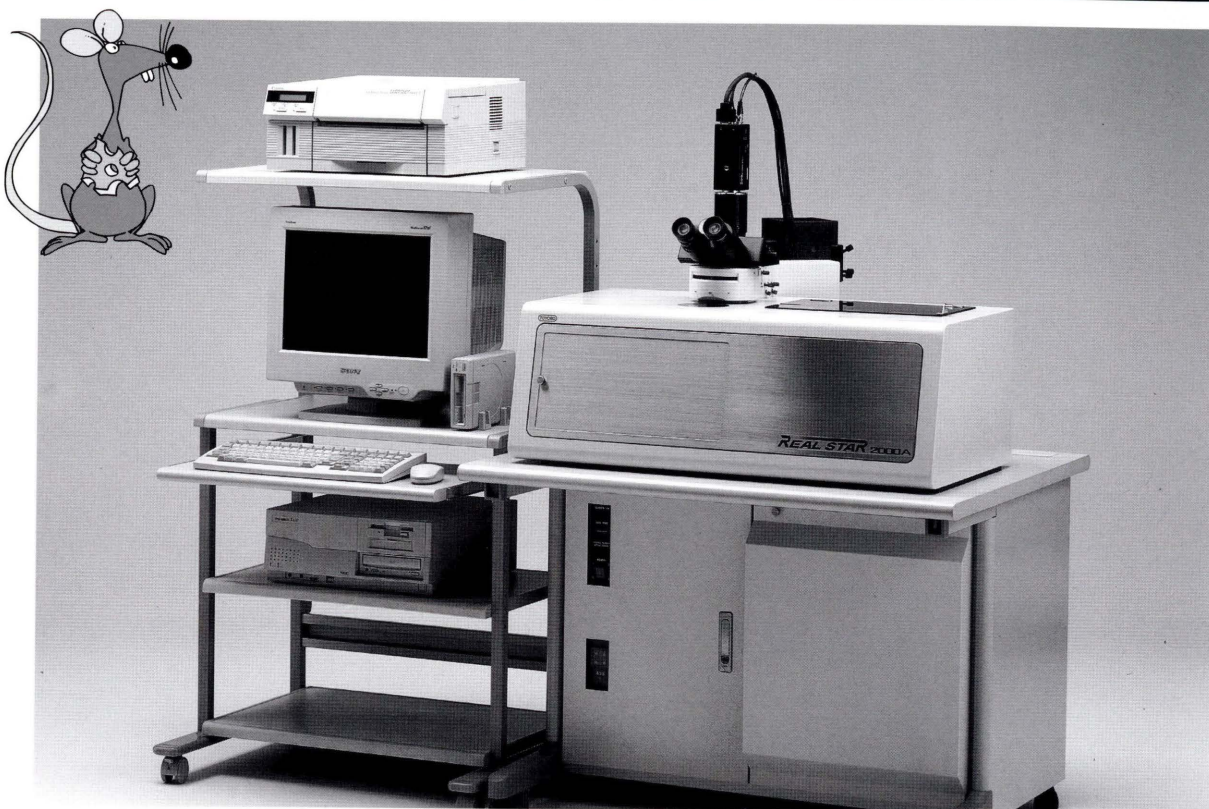
**Environmental
Mutagen
Research**

Vol.21 No.3 1999

小核試験自動計測装置

REAL STAR 2000 2000A

マウス末梢血による小核試験を自動で行い、客観的なデータを計測することができます。



特徴

1. 標本(スライドグラス)自動供給装置を備えており、30枚までの標本を連続計測できます。
2. 標本名を入力するだけで、後は機械が自動的に計測を行います。
3. 当社のオリジナル技術を駆使した画像処理により、網赤血球(RET)と小核を有する網赤血球(MNRET)を精度良く認識し、個数を計測します。
4. 専用のアクリジンオレンジ塗布済みスライドグラスを用いることにより、簡単に安定したデータが得られます。

※REAL STAR2000Aは、REAL STAR2000に連続計測機能を付加したものです。

<A.O.COATED>

(アクリジンオレンジ塗布済スライドグラス)



特徴

1. スライドグラスに既にアクリジンオレンジが塗布されています。
2. 専用の塗布装置を用いているため、均一な塗布が施されています。
3. グリッドありタイプ(末梢血滴下位置及びカバーグラス貼合わせ位置を印刷)とグリッドなしタイプがございます。

生化学事業部(東京)
東京都中央区日本橋小網町17番9号 〒103-8530
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951

TOYOBO
東洋紡績株式会社
[URL] <http://www.toyoobo.co.jp/seihin/xr>

生化学事業部(大阪)
大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 〒530-8230
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

テクニカルライン TEL 06-6348-3888 (開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00 土、日、祝を除く)
FAX 06-6348-3833 e-mail: techosk@bio.toyoobo.co.jp

Environ. Mutagen Res., 21: 243-250(1999)

Original Article

Antimutagenicity testing of glucopyranosylvanillin and vanillin examined in a mouse peripheral blood micronucleus test system

Shizuyo Sutou¹, Liquing Q. Wong², Masashi Takada²,
Youji Mitsui¹ and Masataka Mochizuki²

¹National Institute of Bioscience and Human-Technology,
1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

²Kyoritsu College of Pharmacy,
Shibakoen 1-5-30, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

Summary

Utilizing the fact that peak responses of micronuclei in peripheral blood appear approximately 48 hr after a single chemical dosing and that blood samples can be collected consecutively from the same animal, an *in vivo* antimutagenicity testing system was designed on the basis of the micronucleus test with mutagen-sensitive MS/Ae mice. This system consisted of 1) sampling of peripheral blood before treatment for the baseline micronucleus frequency and administration of test chemicals soon after the sampling, 2) the second sampling of the blood 48 hr after the dosing to examine if test chemicals themselves induced micronuclei, 3) soon after the second sampling, administration of test chemicals followed by administration of a known micronucleus inducer cyclophosphamide (CP, 20 mg/kg), and 4) the third sampling of the blood 48 hr after the combined dosing to examine if test chemicals suppressed micronucleus frequencies induced by CP. One group consisted of 6 MS/Ae mice, and 2000 reticulocytes per animal were examined for micronuclei. More than 500 erythrocytes per animal were scored for the ratio of reticulocytes to total erythrocytes. When 125, 250, and 500 mg/kg of glucopyranosylvanillin (GV), a synthesized compound with expectation to be antimutagenic, was given, 500 mg/kg stimulated the induction of micronuclei by CP, but 125 and 250 mg/kg significantly repressed CP-induced micronucleus frequencies. When 61, 122, and 244 mg/kg (equivalents to three doses of GV) of vanillin, an *in vitro* antimutagen, were administered, 244 mg/kg also stimulated the micronucleus induction by CP and 122 mg/kg suppressed it. These results indicate that the present *in vivo* system is applicable to testing of *in vivo* antimutagens, that GV and vanillin are antimutagens, and that antimutagens might be mutation enhancers at higher doses.

Keywords: antimutagenicity, glucopyranosylvanillin, vanillin, micronucleus test

Introduction

Antimutagenicity testing is usually conducted utilizing *in vitro* systems such as the Ames test and gene mutation or chromosomal aberration tests in

cultured mammalian cells, mainly for their simplicity. *In vitro* test results, however, cannot always be true for *in vivo* systems. For example, dose levels applicable *in vitro* and *in vivo* are quite different. Absorption, distribution, metabolism, and excretion have to be always taken into consideration *in vivo*. Concentrations of test chemicals and duration of exposure to target cells *in vivo* are usually lower and

received: August 11, 1999 accepted: August 31, 1999
© Environmental Mutagen Society of Japan

shorter, respectively, than those *in vitro*. Indeed, quercetin, which is an *in vitro* mutagen and predicted to be carcinogenic is, on the contrary, anticarcinogenic. By contrast, β -carotene, an *in vitro* antimutagen, was expected to prevent cancer in humans, but chemoprevention trials showed that this, either alone or in combination with vitamin A or vitamin E, actually increased lung-cancer incidence and mortality in heavy smokers and asbestos workers unexpectedly (the Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994).

Therefore whatsoever effective antimutagens are determined *in vitro*, effectiveness has to be demonstrated *in vivo*. Even though there are several *in vivo* mutation detection systems that could be applied for antimutagenicity testing, simple ones are rare. The mouse micronucleus test was thought to be an exception, for blood samples can be collected consecutively from the same animal and detection of micronuclei is relatively simple and accurate.

We therefore tried to establish a simple antimutagenicity testing system on the basis of the mouse micronucleus test and tested a possible antimutagen with it. As a test chemical, we synthesized a vanillin derivative, glucopyranosylvanillin (GV). To compare the effectiveness of GV, vanillin was also tested in this system.

Materials and Methods

Chemicals

Glucopyranosylvanillin (GV, 4-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-methoxybenzaldehyde) was synthesized as follows. Vanillin and *O*-tetraacetyl- α -glucose were treated with silver oxide in the presence of quinoline by the method of Robertson and Waters (1930). The yield of tetraacetyl- β -D-glucovanillin as colorless prisms was 95% with mp 143-144°C; literature mp 143-144°C. $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ : 2.04 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.07 (3H, s), 3.71-3.87 (1H, m), 3.89 (3H, s), 4.16-4.31 (2H, m), 5.09-5.31 (2H, m), 5.33-5.36 (2H, m), 7.25 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.42 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.43 (1H, s), 9.89 (1H, s). Hydrolysis with NH_3 in methanol afforded 4-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-methoxybenzaldehyde 97% as colorless needles with mp 191-192°C; literature mp 189-190°C (Thorpe and Williams, 1937). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 3.29 (1H, d, $J=4.5$ Hz), 3.38 (2H, dd, $J=4.5$ Hz, 1.0 Hz), 3.47-3.49 (1H, m), 3.52-3.62 (1H, m), 3.64-3.72 (1H, m), 3.74-3.82 (1H, m), 4.53 (1H, d, $J=3.5$ Hz), 4.63 (1H, d, $J=3.5$ Hz), 5.04 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.23 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.42 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.48 (1H, s), 9.86 (1H, s). Signals at 3.29, 4.53, 4.56, and 4.63 were exchangeable with D_2O .

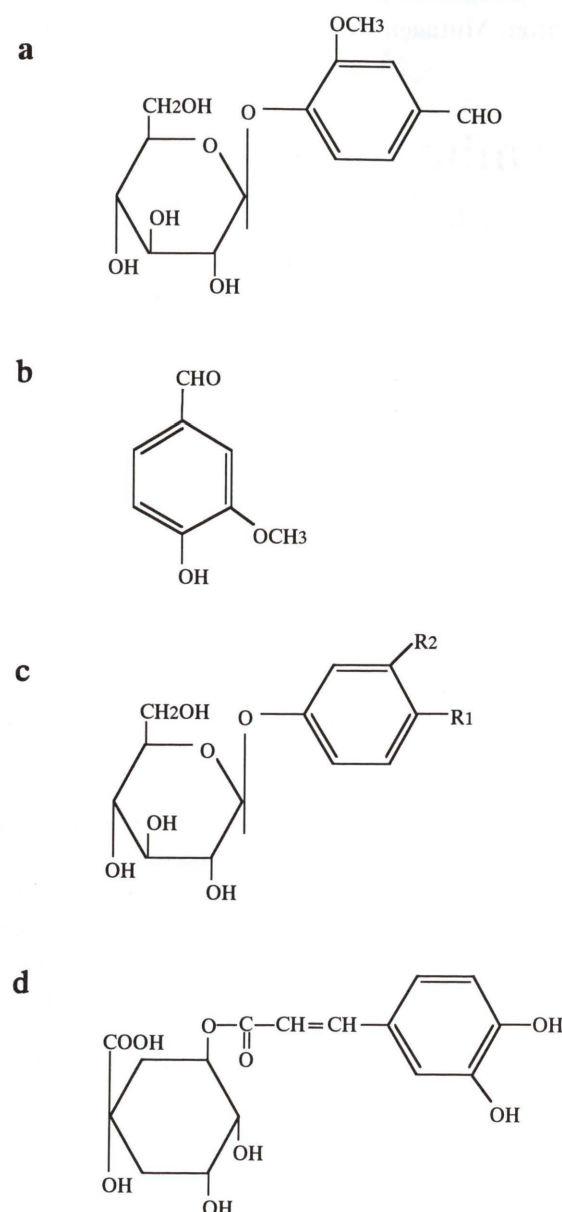


Fig. 1 Structures of glucopyranosylvanillin and related compounds
a, Glucopyranosylvanillin (GV); b, vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde); c, aromatic glucosides: 3,4-dimethoxyphenyl- β -D-glucoside ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OCH}_3$), 3-methoxy-4-hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside ($\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{OCH}_3$), and 4-hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside ($\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{H}$); and d, chlorogenic acid.

Chemical structures of GV and related compounds are shown in Fig. 1. The highest dose of GV (500 mg/kg, 10 mL/kg) was suspended in physiological saline using a sonicator. Mid (250 mg/kg) and low (125 mg/kg) doses were dissolved in physiological saline. Physiological saline (Lot. 7I70) was from Otsuka Pharmaceuticals Co. (Tokushima, Japan).

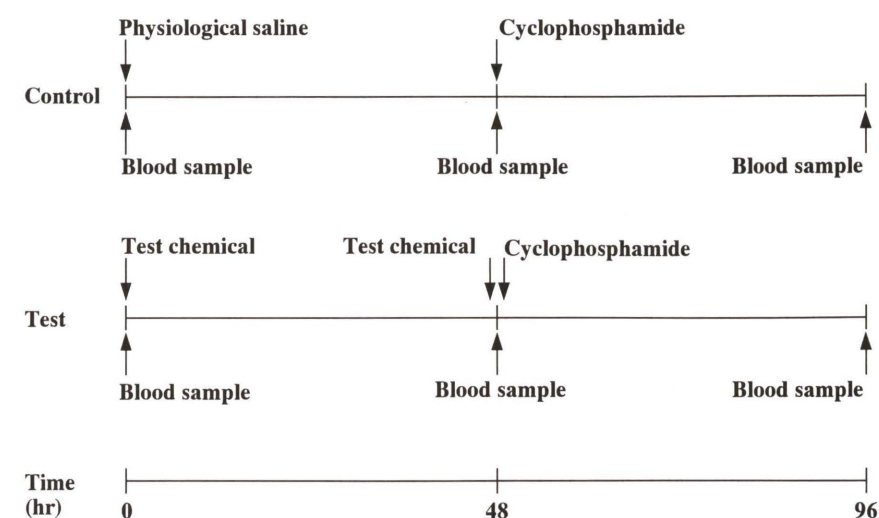


Fig. 2 Protocol of the present study

This was also used as a vehicle for vanillin and cyclophosphamide (CP).

Vanillin (CASRN 121-33-5, Lot. 224-00682) was purchased from Wako Pure Chemical Ltd. (Osaka, Japan). The highest dose was 244 mg/kg, molar equivalent to 500 mg/kg of GV. Since crystals appeared at room temperature, the solution was kept in a warm water bath at approximately 40 °C during treatment. Low and mid doses were 61 and 122 mg/kg, respectively.

CP (CASRN 6055-19-2, Lot. 0413TX) was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, USA) and given at 20 mg/kg. Acridine orange-coated slides were products of Toyobo Co. (Osaka, Japan).

Animals

MS/Ae mice were raised in the animal house of the Central Research Institute, Itoham Foods Inc., under specific pathogen-free conditions. Foods and water were freely supplied. Either males or females were used.

Protocol

The protocol used here is briefly depicted in Fig. 2. Each group consisted of 6 male or female mice. Just before administration of test chemicals, blood samples were taken from the tail blood vessel (CSGMT, 1992) to examine background levels of micronucleus frequencies. Then physiological saline (negative control) or test chemicals dissolved or suspended in physiological saline were given ip at 10 mL/kg. After 48 hr, blood samples were collected and examined for micronuclei. In separate experiments, test chemicals were administered ip followed

by ip treatment with CP. The time span between the two treatments was approximately 15 min. After 48 hr, blood samples were collected to examine if test chemicals could suppress micronuclei induced by CP.

Blood examination

Blood samples were examined under fluorescence microscopy (Nikon). Reticulocytes (RETs, 2000 cells per animal) were scored for micronucleated reticulocytes (MNRETs). The ratio of reticulocytes (RETs) to total erythrocytes was evaluated by counting more than 500 erythrocytes per animal.

Statistical analyses

The method of Kastenbaum and Bowman (1970) was used for statistical analysis of MNRETs frequencies. Analyses of variance were used for examining differences in the ratios of RETs to total erythrocytes, by the method of the least significant difference using a software of statistical analyses for Microsoft Excel.

Results

Antimutagenicity of GV

Since we did not have sufficient GV to conduct toxicity tests and pilot experiments, and there was difficulty in sample preparation, the highest dose was set at 500 mg/kg. With the dilution ratio being 2, mid and low doses were set at 250 and 125 mg/kg, respectively.

Fig. 3 shows the results of antimutagenicity testing of GV. Fig. 3a shows micronucleus frequencies 48 hr after the second GV treatment. No statistically significant differences were seen between the nega-

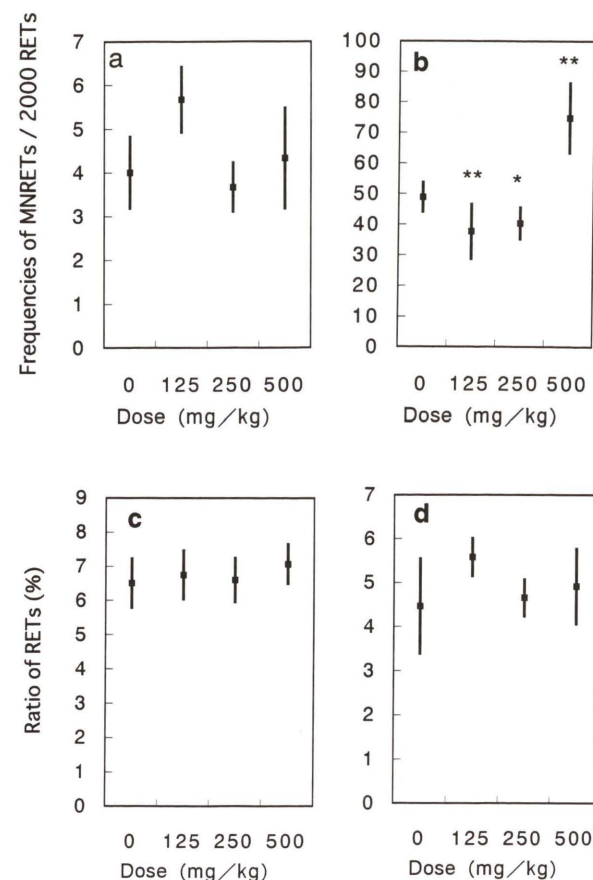


Fig. 3 Micronucleus frequencies and ratios of RETs to total erythrocytes in mice treated with glucopyranosylvanillin (GV). Each group consisted of 6 females at 16 weeks of age. a, Micronucleus frequencies 48 hr after GV treatment; b, micronucleus frequencies 48 hr after GV and CP treatments; c, ratios of RETs 48 hr after GV treatment; and d, ratios of RETs 48 hr after GV and CP treatments. Physiological saline was given to the control (see Fig. 2). Statistically significant differences from the control are shown by * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

tive control group (physiological saline) and the three treated groups, indicating that GV did not induce micronuclei. The micronucleus frequency was almost identical to that seen for mice at time zero (3.8 ± 1.5 MNRETs/2000 RETs, $n=24$) and which in the control group fell within the normal range for Ms/Ae mice (Sutou, 1996). Fig. 3b shows micronucleus frequencies 48 hr after the combined treatment with GV and CP (being 96 hr after the start of GV treatment). The control mice were given only CP, which, as expected, induced micronuclei about 10-fold (48.8 ± 10.5 MNRETs/2000 RETs). The high dose GV group (500 mg/kg, 74.8 ± 25.0 MNRETs/2000 RETs, $p < 0.01$) showed a statistically significant increase of micronuclei, indicating

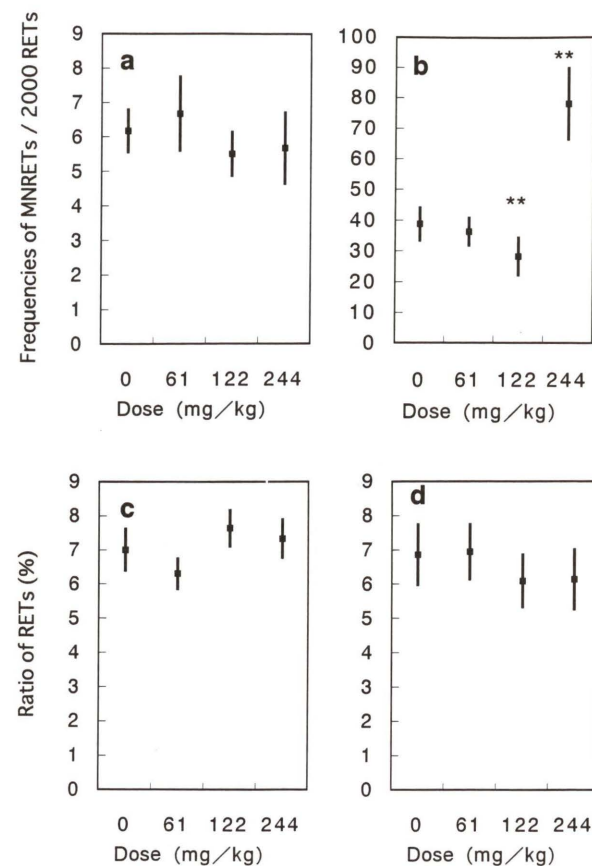


Fig. 4 Micronucleus frequencies and ratios of RETs to total erythrocytes in mice treated with vanillin. Each group consisted of 6 males at 8 weeks of age. a, Micronucleus frequencies 48 hr after vanillin treatment; b, micronucleus frequencies 48 hr after vanillin and CP treatments; c, ratios of RETs 48 hr after vanillin treatment; and d, ratios of RETs 48 hr after vanillin and CP treatments. Physiological saline was given to the control (see Fig. 2). Statistically significant differences from the control are shown by * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

that GV enhanced the CP-induced micronucleus frequency. By contrast, the low GV dose (37.7 ± 19.5 MNRETs/2000 RETs, $p < 0.01$) and mid GV dose (40.3 ± 11.1 MNRETs/2000 RETs, $p < 0.05$) suppressed the micronucleus induction by CP.

The ratios of RETs to total erythrocytes, 48 hr after GV treatment and 48 hr after treatments with GV and CP, are shown in Fig. 3c and d, respectively. No specific changes were observed; GV seemed to be non-toxic to the bone marrow.

Antimutagenicity of vanillin

Doses of vanillin were chosen as molar equivalents to the GV doses used, i.e., 61, 122, and 244 mg/kg for low, mid, and high doses, respectively. After admin-

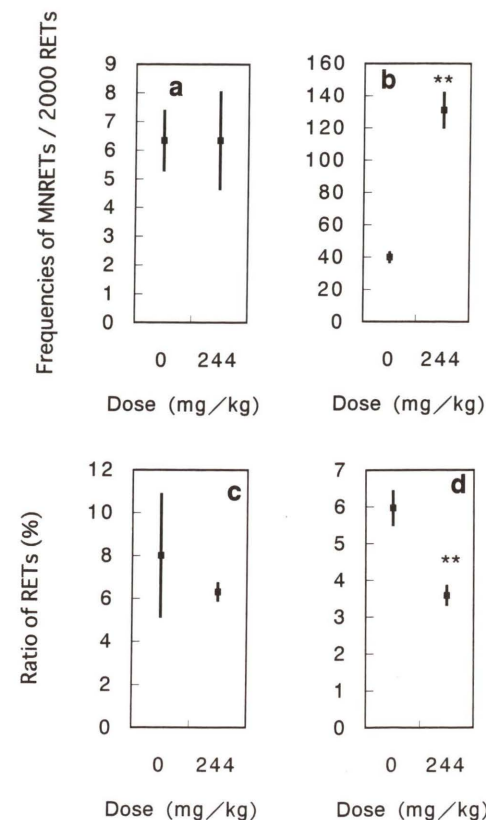


Fig. 5 Results of antimutagenicity testing of vanillin by a single treatment. As to details, see the legend to Fig. 4.

istration of high doses, mice showed reduced spontaneous movements.

Fig. 4 shows the results of antimutagenicity testing of vanillin. Fig. 4a shows micronucleus frequencies 48 hr after the second vanillin treatment. No statistically significant differences were seen between the negative control group (physiological saline) and the three treated groups, indicating that vanillin did not induce micronuclei. The micronucleus frequency was almost identical to that seen for mice at time zero (6.0 ± 2.7 MNRETs/2000 RETs, $n=24$) and which in the control group fell within the normal range for Ms/Ae mice (Sutou, 1996). Fig. 4b shows micronucleus frequencies 48 hr after the combined treatment with vanillin and CP (being 96 hr after the start of vanillin treatment). The control mice were given only CP, which, as expected, induced micronuclei about 6-fold (36.7 ± 11.6 MNRETs/2000 RETs). The high dose vanillin group (244 mg/kg, 78.2 ± 25.8 MNRETs/2000 RETs, $p < 0.01$) showed a statistically significant increase of micronuclei, indicating that vanillin enhanced the CP-induced micronucleus frequency. Although the low dose group (36.2 ± 9.5 MNRETs/2000 RETs) showed no difference in the micronucleus frequency

from that of the CP group, the mid vanillin dose (28.2 ± 13.2 MNRETs/2000 RETs, $p < 0.01$) suppressed the micronucleus induction by CP.

The ratios of RETs to total erythrocytes, 48 hr after vanillin treatment and 48 hr after treatments with vanillin and CP, are shown in Fig. 4c and d. No specific changes were observed.

Both GV and vanillin enhanced the micronucleus induction by CP at high doses and suppressed it at lower doses. In the present testing system, test chemicals were given twice. On the other hand, the micronucleus inducer CP has to be metabolically modified to an active form. There was the possibility that the first high doses of GV or vanillin stimulated induction of drug-metabolizing enzymes and, as a result, CP was highly activated. To examine this possibility, a high dose of vanillin was given once together with CP and blood samples were collected 48 hr later. The results are shown in Fig. 5. Vanillin (131.0 ± 21.1 MNRETs/2000 RETs, $p < 0.01$) markedly stimulated the induction of micronuclei by CP (39.8 ± 5.7 MNRETs/2000 RETs) (Fig. 5b). Potentiation of micronucleus induction by a single dose of vanillin was more potent than that by double doses. The ratio of RETs to total erythrocytes ($3.6 \pm 0.5\%$, Fig. 5d) was significantly reduced as compared with that of the control ($6.0 \pm 0.9\%$, Fig. 7c, $p < 0.01$). Thus a single high dose of vanillin combined with CP seemed to be toxic to bone marrow.

Discussion

Use of MS/Ae mice

MS/Ae mice are highly sensitive to mutagens in not only the micronucleus test but also in the dominant lethal test, sister-chromatid exchange (SCE) induction, and pulmonary adenoma induction by urethane (brief review, in Sutou, 1996). Their life span is shorter than the parental strain CD-1 (Higashikuni and Sutou, 1996) and the high sensitivity of MS/Ae mice to mutagens seems to provide a highly sensitive antimutagenicity testing system.

We used rather aged male and female mice (approximately 4-months old), but neither age nor sex of mice affected the micronucleus test very much throughout the life span (Higashikuni and Sutou, 1996).

Chemical structure of GV

Matuura et al. (1990) reported that three aromatic glucosides (Fig. 1c) isolated from crude black sugar were biologically active and effective in inhibiting intestinal absorption of glucose. Vanillin (Fig. 1b), an antimutagen, is a major component of vanilla

pods and widely used as a flavoring in confectionaries, beverages, and foods. Chlorogenic acid (Fig. 1d), which is a sugar analogue with aromatic moiety, is an antimutagen originally isolated from coffee beans. Since plants have been exposed to intensive UV irradiation, they must have developed antimutagenic mechanisms. Such examples of the above naturally occurring, antimutagenic plant constituents prompted us to examine whether a synthetic compound GV, one of the aromatic glucosides, shows antimutagenicity in an *in vivo* system. The glucose moiety of GV was predicted to increase solubility and to enhance biological activity of vanillin.

Since we did not know if GV was absorbed well from the digestive tract, GV was administered ip, alone and with the micronucleus inducer CP, to ensure that GV was indeed inside the biological compartment of mice. Although there was a time span of approximately 15 min between GV and CP treatments, there remained the possibility that antimutagenicity of GV was based on desmutagenic action, i.e., GV directly inactivated CP. If this was the case, antimutagenicity of GV must be dose-dependent and higher doses must be more effective. The experimental results that both GV and vanillin were antimutagenic at lower doses and comutagenic at higher doses indicated that the actions of GV and vanillin were not desmutagenic but bioantimutagenic, i.e. the test chemicals modified replication and/or repair systems after the mutagenic insult incurred by CP. Direct evidence that vanillin was a bioantimutagen was given by Inoue et al. (1988), who showed that micronucleus induction by mitomycin C administered ip to mice was suppressed by vanillin given po 6 to 9 hr after the mitomycin C treatment.

Mechanisms of bioantimutagenic action of GV and vanillin

Since GV and vanillin similarly potentiated and suppressed, depending on doses, the micronucleus frequencies induced by CP, mechanisms of bioantimutagenic action of both compounds are most likely the same. Vanillin was neither mutagenic in bacteria nor clastogenic in cultured Chinese hamster cells (Kasamaki et al., 1982, and this study). Neither GV (this study) nor vanillin (Inoue et al., 1988) induced micronuclei in mice.

Ohta et al. (1988) postulated using various mutant *Escherichia coli* strains that the bioantimutagenic effect of vanillin was the result of enhancement of a *recA*-dependent, error-free pathway of post-replication repair. Sasaki et al. (1990) suggested that

the anticlastogenic effect of vanillin in cultured Chinese hamster cells treated with UV-light or X-rays may be due to the promotion of the DNA rejoining process in which DNA polymerase β acts. Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mice by post-treatment with vanillin (Inoue et al., 1988) also suggests that vanillin enhances a repair process/es. Unexpected results that vanillin potentiated SCEs induced by some chemical mutagens in cultured Chinese hamster cells (Sasaki et al., 1987a, b) could be explained by enhanced DNA recombination. Vanillin itself induced SCEs at higher doses (Jansson and Zech, 1987).

Contradictory action of GV and vanillin

Although vanillin is an antimutagen, sometimes it shows mutation-enhancing effects depending on endpoints and mutagens used (reviewed by Ohta, 1993). Such cases were observed with SOS responses of *Escherichia coli* (Takahashi et al., 1990), gene mutations in cultured Chinese hamster cells (Tamai et al., 1992), and SCEs in cultured Chinese hamster cells (Sasaki et al., 1987a, b). To our knowledge, GV and vanillin were the first related chemicals to show dose-dependent both suppression and enhancement of micronuclei induced by a mutagen, CP.

To understand this, various biological aspects might be considered, e.g., the suppressive effect could be due to stimulation of a repair process/es and the enhancement due to metabolic modifications of mutagens or toxicity of antimutagens. Vanillin dose-dependently suppressed micronuclei induced by mitomycin C (Inoue et al., 1988) that needs not to be metabolically activated to affect DNA, while it suppressed at lower doses and enhanced at higher doses micronuclei induced by CP that needs metabolic activation (this study). Vanillin and GV at high doses might induce cytochrome P450 subenzymes encoded by CYP2B1 and CYP3A4 genes that activate CP (Philip et al., 1999). Involvement of vanillin in the activity of P450 2E1-like isoform has been reported (Kazakoff et al., 1994).

The mutagenicity and clastogenicity of a flavonoid quercetin may be due to production of the OH \cdot radical (Gasper et al., 1994). On the other hand, quercetin shows antioxidant properties by chelating iron (Sestili et al., 1998). It induced the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase (Uda et al., 1997) and is a natural ligand of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) which mediates transcriptional activation of the human gene CYP1A1 (coding for cytochrome P450 1A1) (Ciolino et al., 1999). Quercetin may compete with man-made AhR-ligands such as halogenated and polycyclic

hydrocarbons. These multilateral activities as a whole must exert the anticarcinogenic effect of quercetin *in vivo* in the long run. Interestingly, β -carotene induces CYP genes and, as a result, may exert a co-carcinogenic effect (Paolini et al., 1999). β -Carotene enhanced micronucleus induction by CP depending on dosing schedules (Higashikuni, 1994), possibly through cytochrome P450 enzyme induction. GV and vanillin might also induce cytochrome P450 at higher doses.

When a high dose of vanillin was given, the spontaneous movement of mice was repressed and the ratio of RETs to total erythrocytes was reduced. In addition to induction of drug metabolizing enzymes, toxic high doses might cause some abnormalities that result in enhancement of micronuclei due to, e.g., inhibition of repair processes, induction of extramedullary erythropoiesis, and inhibition of micronucleus trapping.

Difficulty of establishing *in vivo* antimutagenicity testing systems and evaluation of test results

Antimutagenic activity detected *in vitro* must be demonstrated in *in vivo* systems for practical applications and many variables must be addressed. These include the species of the testing animals, endpoints, types of mutagens such as ionizing radiation and alkylating agents with or without metabolic activation, administration routes and doses for mutagens and antimutagens, dosing schedule, and treatment period (long-term or short-term). Even if antimutagenicity is demonstrated in *in vitro* and *in vivo* systems, long-term testing with humans might show some hazardous effects in the case of β -carotene (the Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994). A wide variety of studies is needed to elucidate the complicated nature of antimutagenicity.

References

- The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group (1994) The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers, *N. Engl. J. Med.*, 330, 1029-1035.
- Ciolino, H.P., P.J. Daschner and G.C. Yeh (1999) Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially, *Biochem. J.*, 340, 715-722.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, *Mutat. Res.*, 278, 83-89.
- Gasper, J. A. Rodrigues, A. Laires, F. Silva, S. Costa, M.J. Monteiro, C. Monteiro and J. Rueff (1994) On the mecha-

nisms of genotoxicity and metabolism of quercetin, *Mutagenesis*, 9, 445-449.

Higashikuni, N. (1994) Studies on the development of a high sensitive micronucleus test system Using MS/Ae mice and its applications, thesis (Tamagawa Univ.).

Higashikuni, N. and S. Sutou (1996) Lifetime micronucleus frequencies in MS/Ae mice treated with mitomycin C: A report of the 8th collaborative study by the CSGMT/JEMS \cdot MMS, *MMS Commun.*, 4, 19-27.

Inoue, T., Y.F. Sasaki, H. Imanishi, M. Watanabe, T. Ohta and Y. Shirasu (1988) Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mouse bone marrow cells by post-treatment with vanillin, *Mutat. Res.*, 202, 93-95.

Jansson, T. and L. Zech (1987) Effects of vanillin on sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in human lymphocytes, *Mutat. Res.*, 190, 221-224.

Kasamaki, A., H. Takahashi, N. Tsumura, J. Niwa, T. Fujita and S. Urasawa (1982) Genotoxicity of flavoring agents, *Mutat. Res.*, 105, 387-392.

Kastenbaum, M.A. and K.O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, 9, 529-549.

Kazakoff, K., P. Iverson, T. Lawson, J. Baron, F.P. Guengerich and P.M. Pour (1994) involvement of cytochrome P450 2E1-like isoform in the activation of N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in the rat nasal mucosa, *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*, 30B, 179-185.

Matsuura, Y., Y. Kimura and H. Okuda (1990) Effect of aromatic glucosides isolated from black sugar on intestinal absorption of glucose, *J. Med. Pharma. Soc. WAKAN-YAKU*, 7, 168-172.

Ohta, T. (1993) Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives, *Crit. Rev. Toxicol.*, 23, 127-146.

Ohta, T., M. Watanabe, Y. Shirasu and T. Inoue (1988) Post-replication repair and recombination in *uvrA umuC* strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compounds, *Mutat. Res.*, 201, 107-112.

Paolini, M., G. Cantelli-Forti, P. Perocco, G.F. Pedulli, S.Z. Abdel-Rahman and M.S. Legator (1999) Co-carcinogenic effect of β -carotene, *Nature*, 398, 760-761.

Philip P. A., S. Ali-Sadat, J. Doehmer, T. Kocarek, A. Akhtar, H. Lu and K.K. Chan (1999) Use of V79 cells with stably transfected cytochrome P450 cDNAs in studying the metabolism and effects of cytotoxic drugs, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43, 59-67.

Robertson, A. and R.B. Waters (1930) Syntheses of glucosides. Part VI. The preparation of β -glucosides of phenols, *J. Chem. Soc.*, 2729-2733.

Sasaki, Y.F., H. Imanishi, T. Ohta and Y. Shirasu (1987a) Effects of antimutagenic flavorings on SCEs induced by chemical mutagens in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, 189, 313-318.

Sasaki, Y.F., H. Imanishi, T. Ohta and Y. Shirasu (1987b) Effects of vanillin on sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.*, 191, 193-200.

Sasaki, Y.F., H. Imanishi, M. Watanabe, T. Ohta and Y. Shirasu (1990) Suppressing effect of antimutagenic flavorings on chromosomal aberrations induced by UV-light or X-rays in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, 229, 1-10.

Sestili, P., A. Guidarelli, M. Dacha and O. Cantoni (1998) Quercetin prevents DNA single strand breakage and

cytotoxicity caused by *tert*-butylhydroperoxide : free radical scavenging versus iron chelating mechanism, Free Radic. Biol. Mes., 15, 196-200.

Sutou, S. (1996) Achievements by CSGMT/JEMS.MMS : the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan, Mutat. Res., 340, 151-174.

Takahashi, K., M. Sekiguchi and Y. Kawazoe (1990) Effects of vanillin and *o*-vanillin on induction of DNA-repair networks : modulation of mutagenesis in *Eschericia coli*, Mutat. Res., 230, 127-134.

Tamai, K., H. Tezuka and Y. Kuroda (1992) Differential modifications by vanillin in cytotoxicity And genetic changes induced by EMS and H₂O₂ in cultured Chinese hamster cells, Mutat. Res., 268, 231-237.

Thorpe, W.V. and R.T. Williams (1937) Glucovanilline and a color reaction for vanillin, J. Chem. Soc., p. 494.

Uda, Y., L.R. Price, G. Williamson and M.J. Rhodes (1997) Induction of the anticarcinogenic Marker enzyme, quinoe reductase, in murine hepatoma cells *in vitro* by flavonoids, Cancer Lett., 120, 213-216.

Environ. Mutagen Res., 21 : 251 - 253(1999)

Short Communication

Evaluation of micronucleus induction in rats by Oil Orange SS

Masahito Watanabe, Kiyoto Satake and Shin Kurogochi

Yuki Research Center, Nihon Bayer Agrochem. K.K.
9511-4 Yuki, Yuki-shi, Ibaraki 307-0001, Japan

Summary

Oil Orange SS, 1-[(2-methylphenyl) azo]-2-naphthalenol is one of the azo-dyes which was classified in Group 2B compound (possible human carcinogen) by IARC. Groups of four male rats were orally administered this compound at 500 to 2,000 mg/kg twice at 24 h intervals and the bone marrow and peripheral blood were examined 24 h after the last treatment. Oil Orange SS induced a significant increase of polychromatic erythrocytes and reticulocytes with micronuclei, indicative of a clastogen.

Keywords : Oil Orange SS, rat, micronucleus assay, bone marrow, peripheral blood

Introduction

Oil Orange SS, 1-[(2-methylphenyl) azo]-2-naphthalenol [CAS 2646-17-5], one of the azo-dyes, has been used as color varnishes, oils, fats, waxes and cosmetics. However, this compound was classified in Group 2B compound (possible human carcinogen) by IARC (IARC, 1987) and its usage has been regulated in many countries (IARC, 1975 ; Karstadt, 1982). Although the mutagenicity of this compound using a bacterial system has been tested so far, the results are not consistent but equivocal, showing negative and positive data. Recently, it was reported in a micronucleus assay that Oil Orange SS has a clastogenic potential in mouse peripheral blood (Morita, 1997). In the present study, we conducted the micronucleus assay on this compound using the rat bone marrow and peripheral blood, in order to evaluate the clastogenic potential in rats.

Materials and Methods

Eight week old male SD rats were purchased from Charles River Japan Inc. (Kanagawa, Japan) and acclimatized for one week. Four rats were randomly assigned into negative control, 3 treatment and positive control groups. They were kept in air-

conditioned room at a temperature of 24 to 26°C, at a relative humidity of 40 to 60% and at a ventilation of 10 to 15 times per hour, and were fed commercial pellets (CRF-1 ; Charles River Japan) and given tap water *ad libitum* throughout the acclimatization and experimental periods.

Test compound, Oil Orange SS was purchased from Tokyo Kasei Co. (Lot. GC01) and was suspended in olive oil. The suspension was orally administered rats twice with 24 h intervals at 500, 1000 and 2000 mg/kg, thus rats received 1000, 2000 and 4000 mg/kg in total (These dose levels were determined by preliminary dose-finding test). The rats in the concurrent negative control group received only olive oil. The volume of administration was 10 ml/kg for each treatment. Positive control compound, cyclophosphamide (CP ; [CAS 50-18-0]) was obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) and was dissolved in physiological saline immediately before use. CP was intraperitoneally injected once at 20 mg/kg.

Peripheral blood was collected from tail vein 24 h after the last treatment, and then rats were sacrificed. Femur was dissected and the bone marrow cells were collected with fetal bovine serum (Schmid, 1975 ; Heddle, 1973). Bone marrow cells and peripheral blood cells were smeared, fixed with methanol and stained with acridine orange (Hayaishi, 1983). Micronucleated polychromatic eryth-

received : May 19, 1999 accepted : July 19, 1999
© Environmental Mutagen Society of Japan

Table 1 MNPCE and MNRET frequencies in SD rat bone marrow and peripheral blood following 2 daily treatments of Oil Orange SS

Dose (mg/kg p.o) per treatment	No.of rats	Bone marrow			Peripheral blood		
		MNPCEs		PCE	MNRETs		RET
		Per 2000 PCEs	Mean±SD(%)	Mean±SD(%)	Per 2000 RETs	Mean±SD(%)	Mean±SD(%)
0	4	2,1,1,0	0.05±0.04	56.8±0.1	3,2,5,4	0.18±0.06	3.3±0.6
500	4	13,8,14,10	0.56±0.14 ^{c)}	74.1±3.6 ^{b)}	5,5,14,9	0.41±0.21 ^{c)}	2.7±0.7
1000	4	9,17,16,9	0.64±0.27 ^{c)}	66.6±8.2	7,14,7,9	0.46±0.17 ^{c)}	2.9±0.9
2000	4	12,21,24,15	0.90±0.27 ^{c)}	62.6±5.1	17,14,14,8	0.66±0.19 ^{c)}	2.7±0.6
CP ^{a)} 20	4	45,84,98,65	33.65±1.05 ^{c)}	36.1±10.4 ^{c)}	47,34,35,22	1.73±0.51 ^{c)}	1.4±0.4 ^{c)}

Bone marrow and blood samples were obtained at 24 hour after the last oral administration

a) : Cyclophosphamide, intraperitoneally once

b) : p<0.05

c) : p<0.01 significant difference from negative control data (0mg/kg)

(Kastenbaum and Bowman's method (1970) for MNPCEs and MNRETs ; Dunnett-test for PCE and RET)

rocytes (MNPCE) and micronucleated reticulocytes (MNRET) frequencies were based on the observation of 2000 PCEs in bone marrow cells and 2000 RETs in peripheral blood cells per animal, respectively. In order to assess cytotoxicity, 200 and 1000 erythrocytes for bone marrow and peripheral blood were analyzed, respectively.

Results

The results of the micronucleus assay on Oil Orange SS are presented in Table 1. Significant increase of the MNPCEs and MNRETs frequencies were statistically found at 500, 1000 and 2000 mg/kg (Kastenbaum and Bowman, 1970). No significant decrease was noted for percentage of PCE and RET in total of erythrocytes (Dunnett-test). On the other hand, the mean MNPCE and MNRET frequencies were 0.05% and 0.18% in the negative control group, respectively, and were 3.65% and 1.73% in the positive control group, respectively. These values were in the expected range and revealed that this assay was technically acceptable. From these results, it was suggested that Oil Orange SS has clastogenic potential.

Discussion

From carcinogenicity studies in experimental animals, Oil Orange SS is classified in Group 2B compound (possible human carcinogen) by IARC (IARC, 1987). And, there are some reports indicating that this compound is mutagenic in a bacterial system (Combes, 1982 ; Zeiger, 1992). But, some of assays on this compound provided negative data for mutagenicity in a bacterial system (Kada, 1972 ; Miyagoshi, 1983). Busk (1978) also reported that this compound showed mutagenic potential in Ames test with liver homogenates of mice, though no mutagenic with liver homogenates of rats. Further-

more, our Ames test provided no signs indicating the mutagenic potential of this compound (unpublished). Thus, the mutagenicity of Oil Orange SS may be equivocal in a bacterial system.

On the other hand, as for *in vivo* assay, this compound showed a clastogenic effect in micronucleus test using peripheral blood of male CD-1 and MS/Ae mice by a single and double treatments, respectively (Morita, 1997). In the present study, a clastogenic potential on this compound was also found in bone marrow and peripheral blood of male SD rats by a double oral treatment. Thereby, *in vivo* assay for detecting mutagenic potential obviously supports that this compound is genotoxic, compared with *in vitro* assay.

References

- Busk, L. and L. Albanus (1978) On the mutagenicity of some azo-dyes, *Mutat. Res.*, 53, 161-162.
- Combes, H. and R. Smith (1982) A review of the genotoxicity of food drug and cosmetic colors and other azo tri-phenyl methane and xanthene dyes, *Mutat. Res.*, 98 (2), 101-248.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr (1983) An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 120, 241-247.
- Heddle, J.A.(1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutat. Res.*, 18, 187-190.
- IARC (1975) IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to man, some aromatic azo compounds, 8, 165-171, Inst. Agency for Research on Cancer, Lyon (France).
- IARC (1987) IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Supplement 7, 69, Inst. Agency for Research on Cancer, Lyon (France).
- Kada, T., K. Tutikawa and Y. Sadaie (1972) *In vitro* and host-mediated 'Rec-assay' procedures for screening chemical mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected, *Mutat. Res.*, 16, 165-174.
- Karstadt, M. and R. Bobal (1982) Availability of epidemiologic data on humans exposed to animal carcinogens, *Terat. Car. Mutag.*, 2, 151-167.
- Kastenbaum, M. A. and K. U. Bowman (1970) Tables for

determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, 9, 527-549.

- Miyagoshi, M., Y. Hayakawa and T. Nagayama (1983) Studies on the mutagenicity of cosmetic azo-dyes, *Eisei Kagaku (J. Hyg. Chem.)* 29, 212-220.
- Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A.Wakata, T. Sofuni, M. Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus

assay in the screening of IARC carcinogens (Group 1, 2A and 2B), *Mutat. Res.*, 389, 3-122.

- Schmid, W.(1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31, 9-15.
- Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor and K. Mortelmans (1992) Salmonella mutagenicity tests : V. Results from the testing of 311 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 9, Suppl. 21, 2-141.

本稿は1999年5月28日, 東京の日本薬学会 長井記念館で開催された日本環境変異原学会主催の第10回公開シンポジウム「内分泌攪乱物質の作用機序と後世代影響—環境変異原研究との接点—」(企画: 菊川清見, 渋谷 徹, 藤川和男)で発表された(座長: 太田敏博)

内分泌攪乱とホルモン様化学物質

井上 達

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 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Chemicals potent to have hormone-like actions and their possible endocrine disruptions

Tohru Inoue

Cellular & Molecular Toxicology Division, Biological Safety Research Center,
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 181-8501, Japan

Summary

Chemicals having hormone-like actions are suspected of inducing possible disruptions in the endocrine tissues and organs, thus the chemicals are called possible endocrine disrupting chemicals (EDCs). Their possible consequent hazards such as developmental/repro-toxicological anomalies and carcinogenicities are reviewed, together with any relevant data from mutagenicity testing. The actions of EDCs appear to be receptor-mediated. Four major subjects to be focused on are: first, the threshold issue, because of their potent activity at low doses, specifically in *in vitro* tests; second, possible redundant action, which may induce an equivocal non-linear dose-response curve; third, unknown additive/synergistic effects in combinations of chemicals, possibly due to interacting co-factor(s) and/or signal transducer(s); and, fourth, the “fetal window” known as a period of greater sensitivity during the developmental stages. By means of available data-bases, special interest has been given to the potential repro-toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity of possible EDCs as listed by U.S.-EPA. Lastly, as a theoretical risk-analysis, discussion is made on the possible impact of EDCs on life span, applying data on EDC-mediated hazards to the Risk Factor-Multiplication Theory of Aging.

(This paper, chaired by Toshihiro Ohta, was presented to the 10th Annual Symposium, “Endocrine Disruptor Mechanism and Posterity Effects-Concern with Environmental Mutagen Research”, organized by Kiyomi Kikukawa, Tohru Shibuya, and Kazuo Fujikawa, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at The Pharmaceutical Society of Japan, Nagai Memorial Hall, May 28, 1999.)

Keywords: chemicals having hormone-like action, endocrine disruptors, non-linear dose-response curve, the fetal window, the risk factor-multiplication theory of aging

緒 言 —ホルモン様の作用を持つ化学物質の影響について—

医薬品はもとより, 農薬や工業用化学物質などの中に

は, 明らかに内分泌ホルモン様の生体内作用を持つ物質が少なくない. それらはしばしば蓄積性を示し, しかも環境中でも実際に検出されることがあるなど, いわゆるホルモン様作動性化学物質の存在はいわば既知の事実である. 問題は, それらが(その定義はさておいて) “内分泌攪乱” を起こすかどうか, また, 起こすとすればそれはどのような機構に即して起こるのか, という点にある.

ホルモン様作用化学物質の同定はさして困難ではないが、それらが“内分泌攪乱”を生ずるかの如何の同定は難しく、とりわけそのもののヒトへの外挿は難しい。多くの混乱もこの点に起因している点が少なくない。

当該の物質は、内分泌攪乱化学物質(EDCs)と呼称されるが、これは、もとより“内分泌ホルモン様作用を持つ化学物質”が内分泌系統に起こす障害を念頭に置いた概念である。ただしその捉え方は単純ではない。たしかにビルに用いられる ethynyl estradiol(EE)のように 17 β -estradiol に近似した作用物質でも、投与の時期と方法によっては、後述するようなウィンドウ効果として知られる神経発達障害を引き起こす(Hambergh, 1969; Gomes et al., 1999)。むしろそうしたことは、estradiol でさえも起こしうる。しかし他方 EDCs では、ホルモン作用を持つかにみえて障害性を引き起こすような、いわばホルモンらしからぬ点にその物質が特徴づけられる面がある。むしろこの問題では、estradiol のようなホルモンそのものの投与によって引き起こされる反応ないしは障害の研究と、EDCs のような物質が非生理的に引き起こすであろう障害性(adverse effect)を明らかにする研究をそれぞれ分けて取り扱うことが問題の整理の仕方として重要なのではないかと考える。

1991 年 7 月、米国 Wisconsin 州の Wingspread に集まった環境医学生物学領域の専門家達は、各地の野生生物の生態に観察される群集規模の縮小や異常についての討議の末、これらが EDCs に起因する可能性を危惧して政府への詳細な調査研究を求めた。そうした背景を読みもの風にまとめた“*Our Stolen Future*”(邦題は「奪われし未来」)が Theo Colborn らによって 1996 年 3 月に出版され、EDCs 問題が社会問題へと発展する契機となった。1995 年に至り大統領府は、環境自然資源委員会(CENR)を設置して EDCs に関する総合的な研究推進計画を開始した。1997 年 1 月には大統領府科学技術政策室が諸外国から専門家を招き、環境防護庁(EPA)と共同でいわゆるスミソニアン・ワークショップを開催した。ここでの考え方は、EDCs に関するその後の研究の方向性を明らかにした(U.S.EPA, 1997)。

ちなみにこの時のワークショップではその定義について「生体の恒常性・生殖発生あるいは行動に参与する生体の種々の性ホルモンの合成、分泌、体内輸送、受容体結合そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」と定めている。かくしてこうした諸過程に沿ったきわめて多岐にわたる試験系が研究の対象となることになる。実際的にはこれらの中から主なバッテリー試験を選び出す形で、受容体原性のシグナルの伝達プロセスを測定するレポータ遺伝子アッセイをはじめ、子宮肥大試験(Gray et al., 1997)や Hershberger 試験(Hershberger et al., 1953)などの個体レベル反応が検討の対象と

なるに至った。

こうした背景に対して、次に問題となるは、EDCs の生体作用、なによりもその特徴そのものである。

1. 内分泌攪乱物質(EDCs)の生体作用の特徴

EDCs の生体作用の特徴をまとめると、例外はあるにせよ、その基本点を一言でいえば受容体原性のホルモン(様)作用を反応の入り口にしている、ということではないかと思われる。生殖腺などに直接作用する化学物質なども少なくないが、単に内分泌機能に影響があっても受容体を介さないものについては、その影響の特徴に従来の化学物質と比較したときのユニークな点はないからである。ホルモン受容体はホルモンの種類に相応して種々存在する。同一ホルモンに対しても、いくつかの異なった機能を示す複合ドメイン構造(Schwabe et al., 1993)や α とか β といった受容体アイソフォームが異なったライガンドに異なった親和性で結合する反応様式(redundancy)が知られており(Kuiper et al., 1997)これにいわゆるコ・アクチベーターなどが反応を修飾するうえ(Norris et al., 1998)、スプライシング・バリエントなども数多く知られている(Pfeffer, 1996; Leygue et al., 1996; Hirata et al., 1995)。したがって作用は自ずと多様にならざるを得ないが、そのことを前提として整理するとその特徴には、次の 4 点があげられる。第 1 に、作用がプレイオトロピズム、つまり多臓器で種々の異なった生理活性を発揮する傾向を持つこと。エストロジェン・レセプター(ER)ひとつをとっても、各種内分泌臓器のほとんどに分布しているほか、胎生期では形態形成などをも制御し(Brandenberger et al., 1997)、非内分泌系臓器でもその発現が知られている。第 2 に、これに引き続く二次性伝達物質としての細胞増殖因子などを介した種々の組織、とくに神経系、免疫系などのいわゆる高次系と呼ばれる諸組織に対する作用がしばしば認められる(Shughrue et al., 1997)ことである。これらのことと関連して、例えば子宮は、インターリューキン 6(IL-6)や顆粒球・マクロファージ系コロニー刺激因子(GM-CSF)などと呼ばれる免疫担当細胞増殖因子の産生母地であり(Kover et al., 1995)、エストロジェンはこれを制御する(Robertson et al., 1992)。これは、神経系や免疫系の機能状態によって EDCs の影響が変化する可能性を意味している。第 3 点は、これはアッセイ系の性質にもよるが、反応様式にしばしば直線的な用量反応関係がみられないことである。しばしば指摘されるいわゆる“逆 U 字型反応曲線”(vom Saal et al., 1997, 1998)も、これに相当する。こうした現象と併せて受容体の不活性化のような一連の受容体原性反応は、高用量反応から低用量反応を予測する根拠を危うくしている。第 4 点目は受容体シグナルが正確に反応しさえすれば、1 分子の化学物質の反応に至るまで反応は連続的となるので、恐らく反応

に閾値がないという点である。このことは必ずしも個体レベルでの閾値の有無の問題に繋がらないが、相乗性および相加性の如何によってはこれも無視できないことになる(Arnold et al., 1996; Ashby et al., 1997)。これらはいずれも、理論問題としても実際問題としても解決の求められている主要点である。つまり、EDCs 問題では、個々の物質の問題の解決もさることながら、こうした普遍的影響に係わることがらを総体として解明してゆかなくてはならない。

さて、そのような受容体原性作用の結果、具体的にはどのようなことが想定されるかについては、わからない点が少なくないので戯画的になるが、1) 受容体に対する生体内ホルモンの結合の阻害、2) 疑似ホルモンとしての受容体への結合と、その結果としての異常シグナル、3) 受容体過剰発現の惹起とその結果としての異常な機能亢進状態、4) 生体内ホルモンとの相互作用と、その結果としてのホルモン作用の機能変異、5) ホルモン類の産生障害などをあげることができる。

ところで本稿は、EDCs の環境変異原物質としての可能性を検討の対象としている。EDCs は、内分泌様の性質を持つ化学物質の“種の保存”に対する危惧を、催奇形性などの発生異常と、内分泌・性腺関連諸臓器での発がん性の双方の面から投げかけるものとして注目されてきた。そうした意味で、本質的にこのものの変異原性の如何が注目される理由である。しかしながらこれら物質の作用機構からみたときの多様性、その結果に一般性が見い出されないことと相俟って、変異原性についても一般則のようなものがないものとして必ずしも充分な検討がなされないままに今日に至ったことは否めない。これは EDCs の実際上の影響の如何はともかくとして、それらの発生・生殖障害性の面と発がん性の面の双方をカバーする視点が従来のトキシコロジー(毒性学)に乏しかったことによる。この視点の新たな構築のために、変異原性の検討に求められている課題は大きいと思われる。

2. 検討対象となる化学物質

内分泌系に作用する種々の化学物質が存在すること自体は、以前から指摘されていた。事実、化学物質のアンドロジェン受容体(AR)への作用をみる試験のひとつ Hershberger 試験は、1953 年という年代物の報告(Hershberger et al., 1953)であるし、文献が見い出されないので Earl Gray の論文(Gray et al., 1997)を引用して済ませているが子宮肥大試験(Uterotrophic assay)に至っては多くの著作はその原法が 1930 年代に遡ると記載している。

EDCs の中には、有機塩素系化合物の殺虫剤(Bitman et al., 1968; Velsicol Chem Corp., 1983 b; Hodge et al., 1952)・抗真菌剤(BASF Wyandotte Corp., 1982)、工業用化学物質としてのビスフェノール A (Dodds et

al., 1938; Krishnan et al., 1993)、あるいはフタル酸類(Carpenter et al., 1953)などがあげられるほか、さらに医療用薬剤としてのビル(ethynyl estradiol)のようなものなどがあり、このほか、一部の黴毒・マイコトキシン類、あるいは豆科のイソフラボン類に含まれるジェニスタイン、また赤葡萄の皮に含まれるリグナン類などいわゆる植物性のホルモン(phytoestrogens: PEG)がある(Verdeal et al., 1985; Bradbury et al., 1954)。少なくとも 20 数種類知られる PEG 類は、イソフラボン類がエストロジェンに似た構造を示す反面、リグナン類には共通性はむしろ乏しい。これら物質は基本的にはエストロジェン作用を持つが、環境化学物質と同様、種々の条件によってアゴニストとしてもアンタゴニストとしても作用することが知られている。

3. 発生と形態形成への影響—マウスの胚形成と window 問題—

エストロジェンの胚形成への関与が知られている中で、発生経過中の受容体の発現が観察されている(Lemmen et al., 1999)。これによれば、 α 受容体と β 受容体は、胎生 9.5 日目から 14.5 日目までにかけて、中腸、中腎管、ミューラー管、脳、などに発現を始めるが、前述の通りこの時、 α 受容体の発現と β 受容体の発現は、決して併行してはいない。これら双方が出そろうのは、体生 16.5 日過ぎのことであり、それ以後でも膀胱、前立腺、大腿骨骨軟骨などでは α 受容体のみ発現している。神経形成を中心としたエストロジェン受容体発現についても視床下部や特定の皮質領域で調べられている(Friedman et al., 1983)。

Lemmen ら(1999)は母体に [^3H] moxestrol を投与して、このものの分布がエストロジェン受容体の発現と並行する(Gerlach et al., 1983)との前提にたって、その胎生期間中の分布を経時的に調べ、前頭葉での [^3H]moxestrol の結合が胎生 15—18 日より生後 18 日前後までに、20 数倍まで急速に増加することを観察した。しかもこれに対して、帯状回皮質や側頭葉、後頭葉では、生後 1 週をピークにして以後、単位 DNA 量あたりの結合が減少していた。こうした変化の意味は未知であるが、胎生期曝露による特定時期での高感受性問題なども以上のような発達過程にリンクするものと理解される。このような胎生期曝露は、また、生後、思春期を迎えた後、あるいはさらに時間を経た後にその影響を顕わすことがあることが知られている。安田ら(Yasuda et al., 1988)は、ICR 系妊娠マウスへ胎生 11 ないし 17 日の時点で ethynyl estradiol(EE; 0.02 mg/kg)を投与し、その仔が 20—22 ヶ月齢に達した時点の精巣を観察した。興味深いことに、それらの精巣では、睾丸あたりの testosterone の産生が対照の 84 ng から 27.5 ng に激減していた。さらにそれらでは組織学的にも対照に較べて精子形成の退縮が著し

く、細胞はアポトーシス(apoptosis)を起こしており、また、Leydig細胞の過形成(hyperplasia)が認められたという(Yasuda et al., 1988)。著者らは、これをこの決定的な時期における胎児の精巣でのtestosteroneの減少と、17 β -estradiolへの置き換え(conversion)が生じた結果によるものと考えている。

EDCsの中で、胚形成への影響の知られているものに、polychlorinated biphenyl(PCBs)や、dichlorodiphenyldichloroethylene(DDE)などがある。PCBsでは、“Yusho”や“Yu-Cheng”(いずれも油症の意)の名で知られるヒトへの影響も知られている。胎生期のこれらの曝露により、生下時体重の減少、早産などが観察されている。実験室レベルでは、methoxychlorやbisphenol Aのほか、octylphenolなどのphenol類、butyl benzyl phthalate(BBP)、dibutyl phthalate(DBP)などのphthalate類、さらに、vinclozolinchlordeconeなどでは、生殖管への影響が知られている。

胎生期ウィンドウの問題は単純でない。Diethylstilbestrol(DED)(3 μ g/30 mg.BW)が胎生期ウィンドウをもって特異的に膈上皮の可逆的過形成を生ずることは知られるが、井口らによれば、これがビスフェノールA投与(胎生10日目より9日間、1 mg/10 mg.BW)では、観察されなかったという(Iguchi et al., 1999)。

EDCsにおける胎生期ウィンドウ問題を含めた発生と形態形成への影響は、そこで惹起される遺伝子レベルでの可逆的・不可逆的変化の研究と、これら物質の変異原性との関連リンクがあるかどうかに焦点があるが、この点を明らかにする十分な報告は出そろっていない。これはゲノム解析の一分野として、分子発生・形態形成領域の研究に対する未曾有の強化方針が出されつつも、その体制が十分に整っていないことを意味している。

4. 動物実験における発がん性

“Our Stolen Future”は、EDCsの前立腺癌への影響をヒト影響の一つとして取り上げた。そのような事実を裏付ける疫学的データは存在しないが、実験的検証を求める声は高い。ホルモンを用いた実験研究は、用量の高低によりしばしば結果が逆転するなど、実験の計画そのものも、結果の解釈も難しいことが少なくない(Maekawa et al., 1999)。白井らは、0.75 ppmのEEを混餌により3週間投与し、2週間の休薬をおいた後、50 mg/kg.bwのdimethyl amino-biphenyl(DMAB)をs.c.で投与した(Shirai et al., 1986)。結果としてDMAB単独投与に較べて、高度の前立腺癌の亢進をみた。この結果を単純に解釈すればEDCsの無意識な摂取は、自然発生性の前立腺癌の亢進を来す結果になる可能性を導き出すが、白井らのその後の研究によれば、先の投薬期間を1週間に短縮するだけで、DMAB単独との差は消失してしまうという(Shirai et al., 1990)。

このように内分泌腺の発がん性試験は、ホルモンそのものを取り上げてすらも結果の評価がきわめて難しい。これに加えて、EDCsも実際にEDCsかどうかを検討の対象となっているものも、その作用機構や、化学物質としての物理化学的性質がまさに多様である。比較的はっきりしていることは、多くのEDCsや実際にEDCsかどうかを検討の対象となっている物質のうち、いわゆる化学物質の二段階発がん性生物試験でいうところのイニシエーター物質に相当するものが、数えるほどしかないという点である。

多くは発がん性があってもプロモーターの性質にとどまるし、標的臓器も多くは内分泌臓器とはなっていないことが指摘される。とくに有機塩素系の殺虫剤の中にはそうした意味での発がん性プロモーター作用物質は少なくない。DDE, DDT, TCDDあるいはendrinなどはこれに含まれる。他方、未知の点の少なくない核内受容体系のシグナル連絡が、そうした非内分泌臓器を連絡する可能性は否定できないので、現時点では包括的に取り扱う必要がある。

以下にまず造腫瘍性の知られる物質をいくつかのカテゴリー別にわけて作用の特徴を通覧する(Keith, 1997)(なお、物質の区分けには、東京都立衛生研究所毒性部によってまとめられた二次資料「内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体影響—データ集」を参考にした)。

①Chlordane関連物質(Keith, 1997): testosteroneの低下、エストロジェン受容体(ER)結合性などでEDCsとしての性質が早くから想定されてきた物質であるが、多くで肝や甲状腺に腫瘍誘発を起こすような薬物代謝の亢進が示唆されている(NCI, 1997; Becker et al., 1979)。腫瘍発生そのものは、報告により異なるが、前述のホルモン腫瘍背景を反映していると思われる。[Chlordane(trans-, cis-), Heptachlor, Heptachlor epoxide, Nonachlor(trans-), Oxychlordaneなど。]

②有機塩素系殺虫剤DDT類: 肝や甲状腺で薬物代謝酵素の亢進を惹起する傾向がみられ、腫瘍発生はこれに関連したプロモーター作用性の肝、甲状腺の腫瘍からなる。1例を除き、BALB/c, CF-1, A系, Swiss/Bombay, BC3/AKRで調べられたすべてで造腫瘍性が陽性になっている(Thorpe et al., 1973; NCI, 1978)。ただしこれらの結果のヒトへの外挿性には疑問もある。[p,p'-DDT,p,p'-DDD,p,p'-DDE]

③Aldrin/Dieldrin類: Testosterone産生に作用したり、ARやER結合性がみられるので、これを介した発がんプロモーター作用が示唆されている(Georgian, 1978)。しかし造腫瘍性の如何はマウスでは陽性(Davis et al., 1962)、ラットでは概ね陰性(Deichmann et al., 1983)となっており、用量によっても異なる。

④その他の有機塩素系化学物質: 甲状腺ホルモン産生への影響やER, AR, PRなどへの結合性による“推定

EDCs物質”。多くが肝癌や甲状腺腫瘍など齧歯類腫瘍を発生。例によって用量相関がはっきりしない(NCI, 1977)[Hexachlor cyclohexan(Lindane), kepone, methoxychlor, mirex, toxacheneなど(なお、有機塩素系化学物質の中でEndosulfanは実験腫瘍の発生がみられない。また、Endrinについては8項のAhR結合性陽性物質を参照)。]

⑤その他の農薬関連化学物質のうち、推定EDCs物質で実験的に腫瘍発生の認められるもの(いずれもいわゆるプロモーター作用と判断される): 甲状腺;alachlor(Wilson et al., 1996)、およびamitrole(Tsuda et al., 1976)。肝腫瘍;kelthane(Dicofol)(IARC, 1983), malathion, nitrofen、およびpentachlorophenol。(このほかに弱い肝腫瘍原性?の示唆されるtrifluralin, dibromochloropropane(Saegusa et al., 1986)、線維肉腫の報告が確認されるdibromochloropropaneなど)。

⑥Chlorotriazin系除草剤:AtrazineやSimazineではERやARへの結合性、Metribuzinでは甲状腺機能亢進がみられる。AtrazineではPR結合性もみられる。[Atrazine(乳腺腫瘍)(Stevens et al., 1999)(Metribuzinでは甲状腺機能亢進が認められるが、MetribuzinもSimazineも実験動物での発がん性はみられない(Keith et al., 1997; IARC, 1991)).]

⑦ジチオカルバメイト系の野菜・果樹用殺菌剤: 甲状腺ホルモン産生に作用したり甲状腺ペルオキシダーゼの上昇もしくは低下を引き起こし、これらを通じて造腫瘍性プロモーター作用のポテンシャルがあるものと考えられる。[Mancozeb(Hurley, 1998), Zineb, Ziram(IARC, 1983)に弱い造腫瘍性作用。ただし類薬のManeb(FAO/WHO, 1993), Metiram(FAO and WHO working group, 1994)での実験腫瘍は陰性。]

⑧AhRを介する物質: AhR結合性が陽性で、これを介してT₃T₄の低下などを引き起こす特異なEDCs物質。ホルモン受容体結合性はみられない。ECDsとしては作用機構上、特異な一群を構成する。その他に有機塩素系殺虫・殺鼠剤のendrin、弱い造腫瘍性のhexachlorobenzeneなど。変異原性はPCBとdioxinsに単鎖切断がみられる程度で、いずれも薬物代謝酵素のCYP1A1の惹起を介して代謝を亢進し、発がんプロモーターとして作用する。(ただし周知の通り、benzo(a)pyrenは、Amesの復帰突然変異など種々の変異原性試験についても陽性の物質。発がん性バイオアッセイでのいわゆるイニシエーター作用も陽性)[芳香族塩素化合物のうち、Benzo(a)pyren(Sjogren et al., 1996), polychlorinated biphenyls(PBBs)(Safe, 1984), polychlorinated biphenyls(PCBs)(Safe, 1984), polychlorinated di-benzo-p-dioxins(dioxins)(Huff et al., 1994; IARC, 1997), poly-chlorinated di-benzofurans(PCBF)(IARC, 1997)など。]

他方、EPAの“推定EDCs物質”の多くでは、いわゆるプロモーター作用も見い出されず、発がん性のないものが少なくない。それらの主なものには、次のようなものがある。

⑨カーバメイト系殺虫剤: ERやARなどホルモン受容体への結合性を持つか、もしくは甲状腺ホルモンの変化を惹起することで知られる。いずれも造腫瘍性をみない(IARC, 1991)。[Aldicarb, Benomyl, Carbaryl, Methomyl, Vinclozolin。]

⑩ピレスロイド系の殺虫剤: AR結合性や甲状腺機能亢進を来すことをもってEDCsの可能性が想定されている。これらの中で実験的に弱い造腫瘍性がみられるのはアルカリフォスファターゼを惹起することが知られるFenvalerateのみ(IPCS, 1989; IARC, 1991; IARC, 1991)。ほか、Cypermethrin, Esfenvalerate, Permethrinでは神経障害、免疫能低下、成長遅延などが観察される。なお、このものの神経障害がナトリウム・チャンネルを標的とした脱分極異常に基づくこと、ヒトと昆虫とでその感受性がさまざまに異なっていることなどが知られている(Nakanishi, 1996)。

⑪プラスチック可塑性剤: MCF7への増殖活性などによりEDCsとして取り扱われているもの、あるいはその候補物質(Phthalate類やalkylphenol類の大部分)。Diethylhexyl phthalate(DEHP)(Huber et al., 1996)やdiethylhexyl adipate(DEHA)(NTP, 1982)などのperoxisome増殖剤^(*)(Takagi et al., 1990)を除き、多くは動物実験による発がん性は陰性(Catharine et al., 1997): Butyl benzyl phthalate, dibutyl phthalate, dicyclohexyl phthalate, dihexyl phthalate, di-n-pentyl phthalate, dipropyl phthalate, bisphenol A, alkylphenol, nonylphenol, p-octylphenol, styrenes, styrene dimers, styrene trimersなど^(*)diethylhexyl phthalate(Huber et al., 1996), diethylhexyl adipate(NTP, 1982)は実験的肝腫瘍を誘発)。

以上通覧してきたとおり、EDCsにおける変異原性と発がん性のリンクは、前項にみた発生・形態形成の障害との関連に較べれば、よいといってよい。しかし、ここでもEDCsでは主としてその造腫瘍性がいわゆる発がんプロモーター作用に基づくことと相俟って詳細な検討に乏しい。とくに変異原性の強さの問題や、EDCsの相互作用との関連などは比較的データの古いものもありはつきりしないことが少なくない。

5. 内分泌攪乱化学物質の変異原性

前項で発がん性と併せてみてきたとおり、内分泌攪乱化学物質と考えられる物質がその内分泌“攪乱性”の様式そのものの多様性と相俟って、それらの物質の変異原性も多種多様である(なお、○印を付した番号は、前項のそれと物質グループを合わせてある)。

① Chlordane 関連物質では前項でみたとおり薬物代謝の亢進を通じた発がん性が示唆されている (Becker et al., 1979 ; Thorpe et al., 1973). 関連化合物の中では, Chlordane で突然変異と染色体異常の双方が示されている (Sobti et al., 1983 ; Sarkar et al., 1993) が, それ以外の物質では変異原性はみられない (Marshall et al., 1976).

②有機塩素系殺虫剤 DDT 類. 同じく肝や甲状腺で薬物代謝酵素の亢進を惹起する傾向がみられる DDT 類では, Ames 試験などが陰性 (Sobti et al., 1983 ; Rashid et al., 1986). なお, このグループの中に染色体異常が認められるものが散見される (Lessa et al., 1976 ; Mahr et al., 1976).

③ Aldrin/Dieldrin 類. 発がんプロモーター作用が示唆されてきた (Georgian, 1978 ; Davis et al., 1962). 催奇形性も陽性 (Meisner et al., 1992). 変異原性では, 染色体異常陽性 (Georgian, 1975 ; Majumdar et al., 1976). Dieldrin では突然変異も陽性 (McGregor et al., 1991).

④その他の有機塩素系化学物質 (Hexachlorocyclohexan, Kepone, methoxychlor など). 比較的高い用量での長期試験で肝癌や甲状腺腫瘍などを産生. 催奇形性や精子形成障害が散見される (Hoffman et al., 1982). これに対して (toxachene を除いて) 復帰突然変異は陰性 (Moriya et al., 1983) だが, 染色体異常が種々の試験系で陽性 (Kumar et al, 1995), Hexachlorocyclohexan では小核試験も陽性 (Bhunya et al., 1992).

⑤農薬類では, Alachlor は変異原性が既知の物質で, いずれの変異原性試験も陽性 (Georgian et al., 1983 ; Lin et al., 1987). そのほか Dibromochloropropane や, Kelthane, Malathion で姉妹分体交換 (Loveday et al., 1989) や染色体異常が陽性 (Salvadori et al., 1988). 他方, pentachlorophenol には周知のとおりいずれの試験でも変異原性は認められない (Kappas, 1988).

⑥ Chlorotriazin 系除草剤の Atrazine の乳腺腫瘍をはじめとする造腫瘍性 (IARC-class III) が知られているが, 変異原性試験では, Ames 試験は陰性 (Moriya et al., 1983), ショウジョウバエなどによるそのほかの突然変異では陽性 (Torres et al., 1992) のほか, 小核試験 (Gebel et al., 1997), 姉妹分体交換 (Ursini, 1998), 染色体試験 (Infurna et al., 1988) などですべて陽性. Atrazine の EDCs としての作用標的は下垂体と考えられている. これに基づく乳腺腫瘍などの発現機構が研究対象となっている. また, 繁殖試験での交配率の低下が報告されているが, 催奇形性はみられない (Infurna et al., 1988).

この類薬の Metribuzin と Simazine では実験発がん性はみられない (Stevens et al., 1999 ; Keith et al., 1997) が, 同時に双方とも変異原性陰性となっている (Moriya et al., 1983 ; De Veer et al., 1994).

⑦ジチオカルバメイト系殺菌剤での変異原性は Ames の復帰突然変異が Ziram を除いて陰性である (Moriya et al., 1983 ; De Veer et al., 1994) (ただし Ziram での実験動物での造腫瘍性は陰性と報告されている) (IARC, 1991). 小核試験や姉妹染色体分体交換が散発性に陽性の物質がみられるがこれらとリンクする造腫瘍性や奇形発生はいずれもみられない.

⑧ AhR 結合性を介する芳香族塩素化合物のうち, Benzo [a] pyren は, 変異原性がすべて陽性の genotoxic carcinogen に相当する物質である (Sjogren et al., 1996). また有機塩素系ドリン剤の Endrin では姉妹分体交換も染色体異常もみられ (Dikshith et al., 1973), これを反映するものと考えられる甲状腺癌, 肝癌, 乳腺癌の発生がみられるほか, 催奇形性も知られている. そのほかの物質では, 変異原性は PCB と dioxins に単鎖切断がみられる程度であるが, いずれも薬物代謝酵素の CYP 1 A 1 の惹起を介した造腫瘍プロモーター作用が知られる.

つぎに前章と同様に, EPA の EDCs リストの物質で発がん性を示す文献のない物質の方について変異原性を通覧する.

⑨カーバメイト系殺虫剤. ER や AR などホルモン受容体への結合性を持つか, もしくは甲状腺ホルモンの変化を惹起することが知られる. 造腫瘍性は観察されないが, 精子形成障害が benomyl, carbaryl, vinclozolin などに観察される (Keith et al., 1997). カーバメイト系殺虫剤ではいずれも Ames の復帰突然変異試験は陰性 (Marshall et al., 1976 ; Sarraf et al., 1994). ただし, 突然変異 (Cid et al., 1984), 小核試験 (Wei et al., 1997), 姉妹染色体分体交換 (Cid et al., 1984 ; Dolara et al., 1992) および染色体異常 (Gonzalez et al., 1987) などが散見される.

⑩ピレスロイド系の殺虫剤. AR 結合性や甲状腺機能亢進を来すことにより EDCs との可能性が想定されているもので, 突然変異, 小核試験, 姉妹染色体分体交換などの陽性結果や染色体異常が散見される (Dianovsky et al., 1995) が, Ames の復帰突然変異試験はいずれも陰性 (Herrera et al., 1990). Cypermethrin で観察されている奇形胚 (ICI Americas, Inc., 1978 b), esfenvalerate で観察される魚類の成長遅延など (Tanner et al., 1996) と, 散見される変異原性陽性所見とがリンクするのかわかると, 文献上の検討の範囲では明らかでない. fenvalerate や permethrin で観察される神経障害 (Cavaliere et al., 1990) は本剤固有の薬効がほ乳類に及ぶ可能性を示唆したものであり今後の進展を注視する必要がある.

⑪フェノール類のようなプラスチック可塑剤およびフタレートなどの樹脂関連物質では, ペルオキシゾーム増殖剤の DEHP や DEHA のようなものを除くと, 発がん

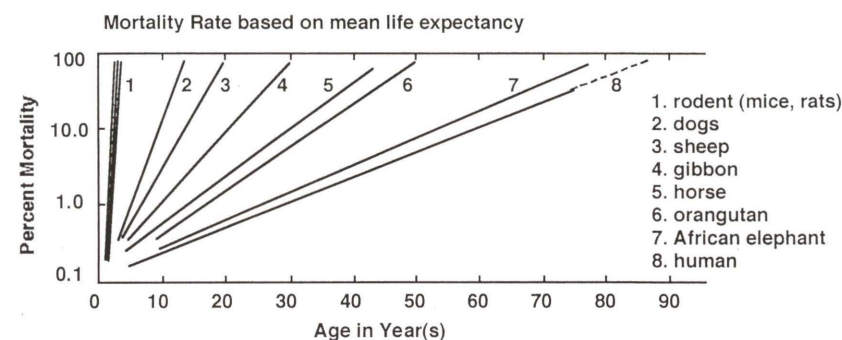


Fig. 1 各種ほ乳類の死亡曲線 (Trosko, J. E. and T. Inoue 1997). データの出典: 齧歯類およびイヌのデータは, 筆者原著より, ヒトのデータは, 厚生省人口動態統計をもとに筆者が算出, その他の動物は, Cutler, R.G. (1984) のデータより外挿した (筆者原図).

性が見い出されない (Catharine et al., 1997). 催奇形性 (Yagi et al., 1980) や繁殖毒性 (IARC, 1982) などの可能性についてはデータが十分に存在しない傾向はあるが, 調べられている限りでは支持データはみられない (Keith et al., 1997). 変異原性についてもこれと符合して (?) 調べられている限りの Ames 復帰突然変異は認められない (Seed, 1982). スチレンについてはホルモン受容体との結合反応がまったくみられないが, モノマー代謝産物での Ames 試験や姉妹染色体分体交換などは陽性である (Tomita et al, 1982 ; Milvy et al., 1976 ; Lee, et al., 1995). Bisphenol A の変異原性試験はこのグループの中ではよく調べられている方の部類に属するが, 何れの資料でもすべて陰性 (NTP, 1982 ; NTP, 1985 a ; NTP, 1986 a, Schweikl et al., 1998 ; Ivett et al., 1989). またフタレート類では報告がみられない.

以上にみたような変異原性の消長と EDCs としての性質がどこまでリンクしているのかについては未検討である. 核内受容体のシグナルのリンク関係の充分明らかでない現状にあってはこの面からも多分にはっきりしないことが少なくない.

6. 環境化学物質と生命系

EDCs が生態系に対する種の絶滅を生ずる危惧によって注目されだしたことと関連して, このものの生命体の寿命に与える影響にも関心が高まっているが, まとまった検討はなされていない. 胎児期に暴露されて神経形成なりに生ずる不顕性の遺残性の障害があった場合, これを顕在化する因子として, 老化による神経細胞の脱落とこれに伴う機能相補の不全が想定される. Weiss (1988) は, この立場からパーキンソン病での神経細胞消失と同様の事柄が EDCs で生ずる可能性を考察しているが, 推論にとどまっており, 証左を得るには至っていない.

老化の発現機構と種々の毒性物質による細胞・組織障害の発現機構との間には密接な関係がある. 寿命の短い生物は一般論としては, 毒性物質に対する感受性が高いことが通念だからである. 悠久の昔, 生物が発生して以来, 生物の寿命が外界の放射線あるいは紫外線, そして強烈な活性酸素に抗して, 進化してきたことを考えるならば, これは当然のことでもある. そしてそのことは, 毒性物質による生体への細胞・組織障害を, 寿命に対するリスクとして理解することの意義を意味していると考えられる (Trosko and Inoue, 1997). すべてではないが多くの生物には固有の自然寿命がある. 生物の発生・成長過程と同様に, 寿命は個々の生物固有の長さにプログラムされているものと信じられている. かつて Sacher (1959, 1978) は, 種々の動物の自然寿命が “脳重量” や “脳重量を体重で割った値 (脳の比重量)” の関数で表わされることを見出した. 生物の死亡率は年齢とともに指数関数的に増加するので, 縦軸に対数目盛で単位時間あたりの死亡率をとり, 横軸に年齢をとると, その死亡率の変化は右上がりの直線関係をとる (Fig. 1) (Trosko and Inoue, 1997). この寿命曲線の変化をみると, 齧歯類からヒトに至るまで急峻な傾きが, 急速に平坦化していることがわかる (Aimes, 1973 ; Cutler, 1984).

年齢に対して死亡率の変化を対数で表したときに, ヒトの寿命曲線が Fig. 1 でみたようにほぼ直線関係をとることは, Gompertz (1825) によって 150 年以上も前に発見された. このものの生物学的な意味は, 生物が死に向かう際, そのリスクは多数の因子の “積” の形をとって表現される一連の関数関係に収束しているということである (老化の多因子乗算論)^{脚注1}.

EDCs がそうしたファクターの一つになり得るとすれば, タバコのリスクでも試算が示されると同様, 先の Fig. 1 で示した寿命カーブの傾きが急峻なカーブを描く

脚注1 ただしこのカーブは, ほ乳類の中でも純系の実験動物のように近変化がすすみ, 比較的均一な死因スペクトルをとって死亡するような動物種では, その死亡期分布はむしろ正規分布に近くなり, 死亡曲線もガウス分布を反映した単純なものへと収束する.

方に立ち上がるものと予測される。先に述べた Weiss の推論では, McGeer et al. (1988) のパーキンソン病における大脳基底核の細胞喪失速度を示している。基底核の細胞数の変化が脳重量のそれに平衡するかの如何についてはここでは立ち入らないが, Weiss の推論は, Fig. 1 の寿命カーブが急峻に傾くという推論と同じ意味を持っている。すなわち EDCs でも早期加齢を促す可能性を意味していることになる。既知の強い EDCs を実験動物に投与してこのことを確かめることはそれ程困難なことではないであろう。

結 語

ホルモン様の作用を持つ化学物質の影響の特徴を、もう一度整理しておこう。このものは、基本的には転写因子である受容体と結合して、当該受容体を活性化し、標的遺伝子のプロモーター部位に結合して、転写調整を障害するという性質に由来する。ある意味で、通常の化学物質作用の中では特異な反応性の化学物質と考えるべきだと思う。こうした受容体との結合には種間交差性が強く、低容量、極微量の作用性を持っていて、またホルモン構造の類似性とも相俟って、さまざまな受容体に同時的に働くことが少なくないということがある。

内分泌系は、下垂体、副腎、性腺、といった系や、甲状腺、ランゲルハンス島だけでなく腸管、肺、肝臓といったあらゆる臓器の中に内包されるような構造になっていることが知られている。他方、免疫系や中枢神経系でも、相互に内分泌系と似た分子機能を持ったシグナル伝達系が発達しており、これらは相互の細胞内シグナル・クロストークを持つ高次機能調節系として働いている。たとえば、エストロゲン受容体の転写活性化部位にはセリンリン酸化部位があり、このセリンを膜結合型受容体の細胞内シグナルを司る MAPK がリン酸化することでエストロゲン受容体の転写活性が上昇するという報告がある (Kato et al., 1998)。つまり、上皮増殖因子 (EGF) をエストロゲンと同時に加えることで、エストロゲン反応が増強されることを意味する。内分泌系はホメオスタシスのいわば平衡機能を担っていると考えられる。ホルモン様の作用を持つ化学物質の中には、当然こうした系全体に作用するものが含まれている可能性がある。これら高次系調節そのものに与える影響といった視点も合わせて今後の研究を進めていくことが重要であろうと考えられる。

謝 辞

本稿の基礎は、平成 11 年度厚生科学研究・生活安全総合研究事業研究費、平成 11 年度科学技術振興調整費における生活・社会基盤研究のうちの生活者ニーズ対応研究“内分泌攪乱物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究”、ならびに平成 11 年度国立医薬品食品衛生

研究所特定研究費などによって得られた結果に基づいている。また、ご校閲戴いた変異遺伝部長・林 真先生 (国立医薬品食品衛生研究所)、本稿の作製作業にご協力戴いた北條美伸氏 (国立医薬品食品衛生研究所) に衷心よりお礼を申し上げます。

参考文献

- Aimes, B.N. (1973) Cancer, aging, and endogenous DNA damage. In : “DNA damage and repair”, Castellani A. Ed. Plenum Press, NY, pp. 291-298.
- Arnold, S.F., D.M. Klotz, B.M. Collins, et al. (1996) Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals, *Science*, 272, 1489-1492.
- Ashby, J., P.A. Lefevre, J.O. Dum, et al. (1997) Synergy between synthetic oestrogen? *Nature*, 385, 494.
- BASF Wyandotte Corporation (1982) MRID No. 00110446 ; HED Doc. No. 002214. Available from EPA. Write to FOI, EPA, Washington DC. 20460.
- Becker, F.F., S. Sell (1979) Fetoprotein levels and hepatic alterations during chemical carcinogenesis in C57BL/6N mice, *Cancer Res.*, 39, 3491-3494.
- Bhunya, S.P., G.B. Jena (1992) Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BHC) : an in vivo study in chicks, *Mutat Res*, 272, 175-181.
- Bitman, J., H.C. Cecil, S.J. Harris et al. (1968) Estrogenic activity of *o,p'*-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct, *Science*, 162, 371-372.
- Bradbury, R.B., D.E. White (1954) Oestrogens and related substances in plants, *Vitamins, Hormones*, 12, 207-233.
- Brandenberger, A.W., M.K. Tee, J.Y. Lee et al. (1997) Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2, 3509-3512.
- Carpenter, C.P., C.S. Weil, H.F. Smyth (1953) Chronic oral toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate for rats and guinea pigs, *Arch Indust Hyg Occup Med.*, 8, 219-226.
- Catharine, A.H., H. Pirkko, G.P. Malcolm et al. (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, *Environ Health Perspect*, 105, 802-811.
- Catharine, A.H., H. Pirkko, G.P. Malcolm et al. (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, *Environ Health Perspect*, 105, 802-811.
- Cavaliere, M.J., M.Y. Maeda, L.W. Shih et al. (1990) Changes in myelinated nerve fibers and skeletal muscle of rats exposed to high doses of permethrin, *Biomed Environ Sci*, 3, 139-145.
- Cid, M.G., E. Matos (1984) Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes by Aldicarb, a carbamate pesticide, *Mutat Res*, 138, 175-179.
- Cutler, R.G. (1984) Antioxidants, aging, and longevity, In : “Free Radicals in Biology”, Vol.6, W.A.Pryor, Ed., Academic Press, N.Y.
- Davis, K.J., O.G. Fitzhugh (1962) Tumorigenic potential of aldrin and dieldrin for mice, *Toxicol Appl Pharmacol*, 4, 187-189.
- Deichmann, W.B., M. Keplinger, F. Sala et al. (1983) Synergism among oral carcinogens. IV. The simultaneous feeding of four tumorigens to rats, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 11, 88-103.

- De Veer, I., H.J. Moriske, H. Ruden (1994) Photocycemical decomposition of organic compounds in water after UV-irradiation : investigation of postvie mutagenic effects. *Toxicol Lett*, 72, 113-119.
- Dianovsky, J., K. Sivikova (1995) *In vivo* and *in vitro* cytogenetic effect of supermethrin, *Biomed Environ Sci*, 8, 359-366.
- Dikshith, T.S., K.K. Datta (1973) Endrin induced cytological changes in albino rats, *Bull Environ Contam Toxicol*, 9, 65-69.
- Dodds, E.C., W. Lawson (1938) Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus, *Proc Royal Soc Lon B.*, 125, 222-232.
- Dolara, P., M. Salvadori, T. Capobianco et al. (1992) Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omethoate, deltamethrin, benomyl and their mixture, *Mutat Res*, 283, 113-118.
- FAO/WHO (1993), Pesticide Residues in Food-1992 Evaluation. Part II (Toxicology), World Health Organization, WHO/PCS/93, 34.
- FAO and WHO working group (1994) Metiram. Pesticide Residues in Food-1993. Toxicology Evaluations, 311-331.
- Friedman, W.J., B.S. McEwen, C.D. Toran-Allerand et al. (1983) Perinatal developoment of hypothalamic and cortical estrogen receptors in mouse brain : Methodological aspects, *Develop Brain Res*, 11, 19-27.
- Gebel, T., S. Kevekordes, K. Pav et al. (1997) *In vivo* genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test, *Arch Toxicol*, 71, 193-197.
- Georgian, L. (1978) The comparative cytogenic effects of aldrin and phosphamidon, *Mutat Res*, 31, 103-108. NCI (National Cancer Institute). Bioassays of aldrin and dieldrin for possible carcinogenicity. DHEW Publication No. (NIH) 78-821. NCI Carcinogenesis Tech Rep Ser. No. 21. NCI-C6-TR-21.
- Georgian, L. (1975) The comparative cytogenetic effects of aldrin and phosphamidon, *Mutat Res*, 31 : 103-108.
- Georgian, L., I. Moraru, T. Draghicescu et al. (1983) Cytogenetic effects of alachlor and mancozeb, *Mutat Res*, 116, 341-348.
- Gerlach, J., B.S. McEwen, C.D. Toran-Allerand et al. (1983) Prenatal development of estrogen receptors in mouse brain assessed by radioautography, nuclear isolation and receptor assay, *Develop Brain Res*, 11, 7-18.
- Gomes, F.C., C.G. Naia, J.R. de Menezes, V.M. Neto (1999) Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation, *Glia*, 25, 247-255.
- Gompertz, B. (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining life contingencies, *Philos Trans Royal Soc. (London)*, 115, 513.
- Gonzalez, Cid, M., E. Matos (1987) Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with aldicarb, a carbamate pesticide, *Mutat Res*, 191, 99-103.
- Gray Jr., L.E., W.R. Kelce, T. Wiese et al. (1997) Endocrine screening methods workshop report : Detection of estrogenic and androgenic hormonal and anti-hormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanism, *Reprod Toxicol*, 11, 719-750.
- Hamburgh, M. (1969) The role of thyroid and growth hormones in neurogenesis, *Curr Top Dev Biol*, 4, 109-48.

- Herrera, A., E. Laborda (1990) Mutagenic activity in synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium*, *Mutagenesis*, 3, 13-18.
- Hershberger, L., E. Shipley, R. Meyer (1953) “Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method”, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 83, 175-180.
- Hirata, S., N. Yamada-Mouri, M. Nara et al. (1995) Presence of alternatively spliced-estrogen receptor mRNA variants in normal human uterine endometrium and endometrial cancer, *Endocr J.*, 42, 289-293.
- Hodge, H.C., E.A. Maynard, H.J. Blanchet Jr (1952) Chronic oral toxicity tests of methoxychlor (2,2-Di-(P-methoxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane) in rats and dogs, *J Pharmacol Exp Ther.*, 104, 60-66.
- Hoffman, D.J., W.C. Eastin Jr. (1982) Effects of lindane, paraquat, toxaphene, and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on mallard embryo development, *Arch Environ Contam Toxicol.*, 11, 79-86.
- Huber, W.W., B. Grasl-Kranpp, R. Schulte-Hermann (1996) Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethyl-hexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk, *Crit Rev Toxicol*, 26, 365-481.
- Huff, J., G. Lucier, A. Tritscher (1994) Carcinogenicity of TCDD experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34 : 343-372.
- Hurley, P.M. (1998) Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents, *Environ Health Perspect*, 106, 437-45.
- IARC (1982) Some Industrial Chemicals and Dyestuffs, di (2-ethylhexyl) phthalate. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 29.
- IARC (1983) Dicofol. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 30, 87-101.
- IARC (1991) Fenvalerate. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 53.
- IARC (1991) Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides Permethrin. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 53.
- IARC (1991) Occupational exposures in insecticide application and some pesticides, Aldicarb. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 53.
- IARC (1991) Simazine. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 53, 495-513.
- IARC (1991) Ziram. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 53, 423-438.
- IARC (1997) Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. International Agency for Research on Cancer Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 69.
- ICI Americas, Inc. (1978b) Accession No. 099855. Available from EPA. c/o FOI, EPA, Washington D.C. 20460.
- Iguchi T, et al. (1999) Unpublished data.
- Infurna, R., B. Levy, C. Meng et al. (1988) Teratological

- evaluations of atrazine technical, a triazine herbicide, in rats and rabbits, *J Toxicol Environ Health*, 24, 307-319.
- IPCS (1989) Cypermethrin. International Program on Chemical Safety Environmental Health Criteria 82.
- Ivett, J.L., B.M. Brown, C. Rodgers et al. (1989) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro* IV. Results with 15 chemicals, *Environ Mol Mutagen*, 14, 165-187.
- Kappas, A. (1988) On the mutagenic and recombinogenic activity of certain herbicides in *Salmonella typhimurium* and in *Aspergillus nidulans*, *Mutat Res*, 204, 615-621.
- Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro et al. (1998) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen activated protein kinase, *Science*, 270, 1491-1494.
- Keith, L.H., Metribuzin. (1997) In: *Environmental Endocrine Disruptors: a Handbook of Property Data*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 870-895.
- Keith, L.H. (Ed) (1997) *Environmental Endocrine Disruptors: a Handbook of Property Data*. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 1232.
- Kover, K., L. Liang, G.K. Andrews et al. (1995) Differential expression and regulation of cytokine genes in the mouse uterus, *Endocrinol.*, 136, 1666-1673.
- Krishnan, A.V., P. Starhis, S.F. Permuth et al. (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrin.*, 132, 2279-2286.
- Kuiper, G.G., B. Carlsson, K. Grandien et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol*, 138, 863-870.
- Kumar, D., P.K. Khan, S.P. Sinha (1995) Cytogenetic toxicity and no-effect limit dose of pesticides, *Food Chem Toxicol*, 33, 309-314.
- Lee, S.H., H. Norppa (1995) Effects of indomethacin and arachidonic acid on sister chromatid exchange induction by styrene and styrene-7,8-oxide, *Mutat Res*, 348, 175-181.
- Lemmen, J.G., Broekhof J. LM, Kuiper GGJM, et al. (1999) Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis, *Mechan Develop*, 81, 163-167.
- Lessa, J.M., Becak, W. Nazareth M. Rabello et al. (1976) Cytogenetic study of DDT on human lymphocytes *in vitro*, *Mutat Res*, 40, 131-138.
- Leygue, E.R., P.H. Watson, L.C. Murphy (1996) Estrogen receptor variants in normal human mammary tissue, *J Nat'l Cancer Inst.*, 88, 284-290.
- Lin, M.F., Wu, C.L., T.C. Wang (1987) Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells, *Mutat Res*, 188, 241-250.
- Loveday, K.S., M.H. Lugo, M.A. Resnick et al. (1989) Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*: II. Results with 20 chemicals, *Environ Mol Mutagen.*, 13, 60-94.
- Maekawa, A., M. Takahashi, J. Ando et al. (1999) Uterine carcinogenesis by chemicals/hormones in rodents, *J Toxicol Pathol*, 12, 1-11.
- Mahr, U., H.G. Miltenburger (1976) The effect of insecticides on Chinese hamster cell cultures, *Mutat Res*, 40, 107-118.
- Majumdar, S.K., H.A. Kopelman, M.J. Schnitman (1976) Dieldrin-induced chromosome damage in mouse bone-marrow and WI-38 human lung cells, *J Hered*, 67, 303-307.
- Marshall, T.C., H.W. Dorough, H.E. Swim (1976) Screening of pesticides for mutagenic potential using *Salmonella typhimurium* mutants, *J Aric Food Chem*, 24, 560-563.
- McGeer, P.L., S. Itagaki, H. Akiyama et al. (1988) Rate of cell death in Parkinsonism indicates active neuropathological process, *Ann Neurol*, 24, 574-576.
- McGregor, D.B., A.G. Brown, S. Howgate et al. (1991) Responses of the L5178Y mouse lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 coded chemicals, *Environ Mol Mutagen*, 17, 196-219.
- Meisner, L.F., D.A. Belluck, B.D. Roloff (1992) Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine *in vivo* and *in vitro*, *Environ Mol Mutagen.*, 19, 77-82.
- Milvy, P., A.J. Garro (1976) Mutagenic activity of styrene oxide (1,2-epoxyethylbenzene), a presumed styrene metabolite, *Mutat Res*, 40, 15-18.
- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe et al. (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutat Res*, 116, 185-216.
- Nakanishi, T. (1996) Neuronal ion channels as the target sites of insecticides, *Pharmacol and Toxicol*, 78, 1-14.
- NCI (National Cancer Institute) (1977) Bioassay of chlordane for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Tech. Rep. Ser. No. 8. US DHEW Publ. No. (NIH) 77-808. Bethesda, MD.
- NCI (1977) Bioassay of lindane for possible carcinogenicity. National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series No. 14.
- NCI (National Cancer Institute) (1978) Bioassays of DDT, TDE and p,p'-DDE for possible carcinogenicity. NCI Report No. 131. DHEW Publ. No. (NIH) 78-1386.
- Norris, J.D., D. Fan, M.R. Stallcup et al. (1998) Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology, *J Biol Chem*, 273, 6679-6688.
- NTP (1982) Carcinogenesis bioassay of di-(2-ethylhexyl) adipate in F344 rats and B6C3F1 mice. National Toxicological Program Technical Report Series, No. 212.
- NTP (1982) (National Toxicology Program). NTP Technical Report on the carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study), NTP-80-35. NIH Publ. No. 82-1771.
- NTP (1983) Carcinogenesis Bioassay of Ziram. National Toxicology Program Technical Report Series, No. 238.
- NTP (National Toxicology Program) (1985a) Teratologic evaluation of bisphenol A in F344 administered to CD-1 mice on gestational days 6-15, NTP, NIEHS, Research Triangle Park, NC.
- NTP (1986a) (National Toxicology Program). Teratologic evaluation of bisphenol A administered to CD9R rats on gestational days 6-15, NTP, NIEHS, Research Triangle Park, NC.
- Ottolenghi, A.D., Haseman, J.K., Suggs, F. (1988) Teratogenic effects of aldrin, dieldrin, and endrin in hamsters and mice, *Teratology*, 9, 75-81.
- Pfeffer, U. (1996) Estrogen receptor. mRNA variants. Do they have a physiological role? *Ann N Y Acad Sci*, 784, 304-313.
- Rashid, K.A., R.O. Mumma (1986) Screening pesticides for their ability to damage bacterial DNA, *J environ Sci Health [B]*, 21, 319-334.
- Robertson, S.A., G. Maryhofer, R.F. Seamark (1992) Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and non-pregnant mice, *Biol Reprod.*, 46, 1069-1079.
- Sacher, G.A. (1959) Relation of lifespan to brain weight and body weight in mammals. In: *Ciba Foundation Colloquia on Ageing*. Vol 5, The Lifespan of Animals. (Eds.) G.A.W. Wolstenholme and M. O'Connor, Churchill, London.
- Sacher, G.A. (1978) Longevity and aging in vertebrate evolution, *Bioscience*, 28, 497-501.
- Saegusa, J., K. Kawai (1986) Fibrosarcoma induced by repeated administration of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DPCP), *Toxicol Letters*, 31(Suppl), 202.
- Safe, S. (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology and mechanism of action, *Crit Rev Toxicol*, 13, 319-395.
- Salvadori, D.M., L.R. Ribeiro, C.A. Pereira et al. (1988) Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice, *Mutat Res*, 204, 283-287.
- Sarkar, D., A. Sharma, G. Talukder (1993) Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*, *Mutat Res*, 301, 33-38.
- Sarraf, A.M., G.T. Arce, D.F. Krahn et al. (1994) VL. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the *Salmonella*/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities, *Mutat Res*, 321, 43-56.
- Schwabe, J.W., L. Chapman, J.T. Finch et al. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements, *Cell*, 75, 567-578.
- Schweikl, H., G. Schmalz, K. Rackebbrandt (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells, *Mutat Res*, 415, 119-130.
- Seed, J.L. (1982) Mutagenic activity of phthalate esters in bacterial liquid suspension assays, *Environ Health Perspect*, 45, 111-114.
- Shirai, T., S. Fukushima, E. Ikawa et al. (1986) Induction of prostate carcinoma in situ at high incidence in F344 rats by a combination of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, *Cancer Res*, 46, 6423-6426.
- Shirai, T., A. Nakamura, S. Fukushima et al. (1990) Different carcinogenic responses in a variety of organs, including the prostate, of five different rat strains given 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, *Carcinogenesis*, 11, 793-797.
- Shughrue, P.J., M.V. Lane, I. Merchenhaller (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and-beta mRNA in the rat central nervous system, *J Comp Neurol*, 388, 507-525.
- Sjogren, M., L. Ehrenberg, U. Rannug (1996) Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency, *Mutat Res*, 358, 97-112.
- Sobti, R.C., A. Krishan, J. Davis (1983) Cytokinetic and cytogenetic effect of agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro. II. Organochlorine pesticides, *Arch Toxicol.*, 52, 221-231.
- Stevens, J.T., C.B. Brechenridge, L. Wetzel (1999) A risk characterization for atrazine: oncogenicity profile, *J Toxicol Environ Health*, 56, 69-109.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura et al. (1990) Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators: di 92-ethylhexyl phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate, *Cancer Lett*, 53, 33-38.
- Tanner, D.K., M.L. Knuth (1996) Effects of esfenvalerate on the reproductive success of the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus* in littoral enclosures, *Arch Environ Cotam Toxicol*, 31, 244-251.
- Thorpe, E., AIT. Walker (1973) The toxicology of dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone, beta-BHC and gamma-BHC, *Food Cosmet Toxicol*, 11, 433-442.
- Tomita, I., Y. Nakamura, N. Aoki et al. (1982) Mutagenic/carcinogenic potential of DEHP and MEHP, *Environ Health Perspect*, 45, 119-125.
- Torres, C., Q. Ribas, N. Xamena et al. (1992) Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test, *Mutat Res*, 280, 291-295.
- Trosko, J.E., T. Inoue (1997) Oxidative stress, signal transduction and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells.*, 15(2), 59-67.
- Tsuda, H., M. Hananouchi, M. Tatematsu et al. (1976) Tumorigenic effect of 3-amino-1H-1,2,4-triazole on rat thyroid, *J Natl Cancer Inst*, 57, 861-864.
- United States Environmental Protection Agency (1997) Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis: EPA/630/R-96/0112, Risk Assessment Forum, US Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 20460.
- Ursini, M.V. (1998) Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636, *Environ Mol Mutagen*, 32, 39-46.
- Velsicol Chemical Corporation (1983b) MRID No. 00138591. Available from EPA. Write to FOI, EPA, Washington, D.C. 20460.
- Verdeal, K., D.S. Ryan (1985) Naturally-occurring oestrogens in plant foodstuffs-a review, *Food Add Contam*, 2, 73-106.
- vom Saal, F.S., B.G. Timms, M.M. Montano et al. (1997) Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2056-2061.
- vom Saal, F.S., P.S. Cooke, D.L. Buchanan et al. (1998) A phylogenetically based study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior, *Toxicol Ind Health*, 14, 239-260.
- Wei, L.Y., J.S. Chao, C.C. Hong (1997) Assessment of the ability of propoxur, methomyl, and aldicarb, three carbamate insecticides, to induce micronuclei *in vitro* in cultured Chinese hamster ovary cells and in vivo in BALB/c mice, *Environ Mol Mutagen*, 29, 386-393.
- Weiss, B. (1998) A risk assessment perspective on the neurobehavioral toxicity of endocrine disruptors, *Toxicology & Industrial Health*, 14, 341-359.
- Wilson, A.G., D.C. Thake, W.E. Heydens et al. (1996) Mode of action of thyroid tumor formation in the male Long-Evans rat administered high doses of alachlor, *Fundam*

Appl Toxicol, 33, 16-23.

Yagi, Y., Y. Nakamura, I. Tomita et al. (1980) Teratogenic potential of di-and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in mice, J Environ Pathol Toxicol, 4, 533-544.

Yasuda, Y., I. Ohara, H. Konishi et al. (1988) Long-term effects on male reproductive organs of prenatal exposure to ethynyl estradiol, Am J Obstet Gynecol, 159, 1246-1250.

Environ. Mutagen Res., 21 : 267 - 272(1999)

シンポジウム

本稿は 1999 年 5 月 28 日, 東京の日本薬学会 長井記念館で開催された日本環境変異原学会主催の第 10 回公開シンポジウム「内分泌攪乱物質の作用機序と後世代影響—環境変異原研究との接点—」(企画: 菊川清見, 渋谷 徹, 藤川和男) で発表された(座長: 菊川清見)

内分泌攪乱化学物質の精巣毒性と継世代催奇形性

長尾 哲二

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 生殖生物学研究室 〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5

Multigeneration effects of endocrine disrupting chemicals with special reference to teratogenesis by paternal exposure to synthetic hormones

Tetsuji Nagao

Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology,
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center,
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

Summary

Male mice prenatally treated with a synthetic hormone, estradiol benzoate (EB, 0.15 and 0.3mg/kg/day), were mated with untreated females, and resulting fetal offspring were inspected for external malformations. A significant increase in the incidence of malformed fetuses over the control level was noticed in the offspring whose sires were treated with a high EB dose, but it was not seen in the offspring of males treated with a low dose. The high dosing, but not the low dosing, caused partial atrophy and feminization in the genital tracts. Ethinyl estradiol also showed transgenerational teratogenicity when applied prenatally at a dose which caused histopathological changes in the testes. Germ-cell series in normal testis have mechanisms to select against spontaneously arisen mutations; but these selection mechanisms may not function efficiently in chemically damaged testis. Based on these results and considerations, I propose as a working hypothesis that male-mediated teratogenesis may occur as a consequence of testicular toxicity.

(This paper, chaired by Kiyomi Kikukawa, was presented to the 10th JEMS Annual Symposium, "Endocrine Disruptor Mechanism and Posterity Effects-Concern with Environmental Mutagen Research", organized by Kiyomi Kikukawa, Tohru Shibuya, and Kazuo Fujikawa, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at The Pharmaceutical Society of Japan, Nagai Memorial Hall, May 28, 1999.)

Keywords : synthetic hormone, endocrine disrupting chemical, prenatal exposure, trans-generational teratogenicity, testicular toxicity, genetic damage, germinal selection

緒 言

内分泌攪乱化学物質の後世代影響を考える場合, 母体を介した胎児や新生児の毒物被曝の効果と, 被曝胎児や新生児の次世代以降で発現する効果は峻別しなければならない。前者の毒性効果は一代限りであるが, 後者の効

果は, 残留毒物の伝達以外は, 生殖細胞の変異を介したものであるからである。現在までの, 内分泌攪乱化学物質の後世代影響の研究はもっぱら一代限りの効果に限られていた。その代表例が合成ホルモンによる生殖機能障害に関する一連の研究である。本稿では, ヒトと実験動物で明らかにされている合成ホルモンの毒性を概説した後, 遺伝的影響も視野に入れた私の研究の経過をまとめる。

受付: 1999 年 8 月 30 日 受理: 1999 年 9 月 10 日
©日本環境変異原学会

1. 合成ホルモンの人体影響の調査と動物実験で明らかになっていること

合成女性ホルモンである ethinyl estradiol (EE) や estradiol benzoate (EB) は, estradiol 17 β (E₂) と構造が類似し, ステロイド骨格を有するが, diethylstilbestrol (DES) はステロイド骨格を持たない非ステロイド系エストロゲンである (Fig. 1). これら合成女性ホルモンは主に産婦人科の医薬品として開発されたものである.

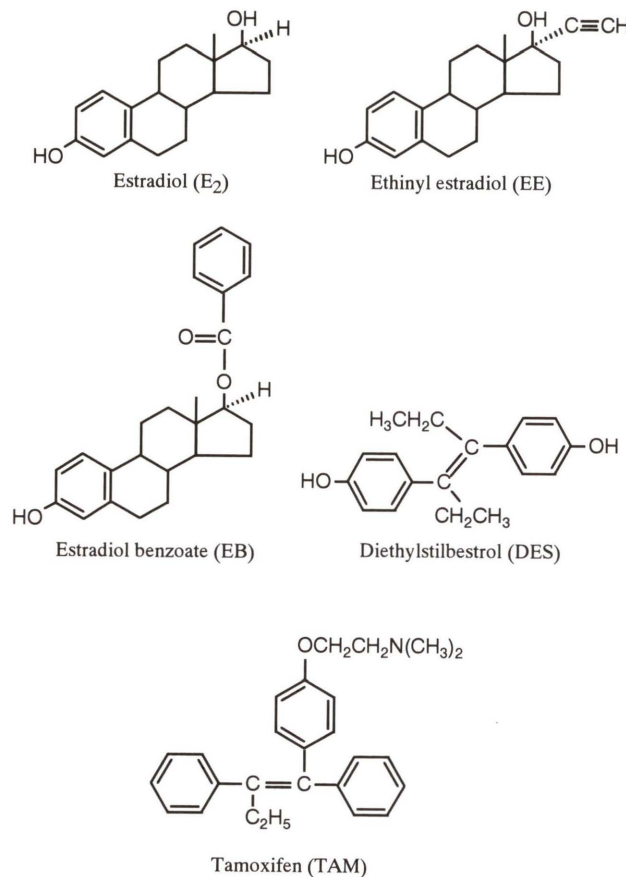


Fig. 1 Structure of synthetic hormones

Table 1 Pathological changes and reproductive dysfunctions recognized for humans who were considered to have been exposed *in utero* to diethylstilbestrol (from Stillman, 1982)

	Pathological	Functional
Female progeny	Clear cell carcinoma ; Adenosis ; Cervicovaginal structural changes ;	Menstrual : cycle irregularities ; dysmenorrhea ; shorter menstrual flow ; Fertility potential : infertility ; ectopic gestation ; premature delivery ;
Male progeny	Uterine structural changes ; Tubal structural changes ; Testicular : cryptorchidism ; hypoplasia ; capsular induration ; Leydig cell hyperplasia	Semen analysis : decreased sperm concentration ; decreased sperm count decreased sperm motility and frequency of motile sperm ; Fertility <i>in vitro</i> : diminished potency of sperm penetration into hamster ovum

上記のホルモンの中でヒトに対する毒性が明らかにされているのが DES である. これは胎盤を通過して胎児に移行し, 細胞内においてエストロゲン受容体と結合して容易に核内に入る. Table 1 に示すように, DES を妊娠中に投与された母親から生まれた女兒に生殖機能障害, 異常妊娠あるいは腔の透明細胞腺癌などが, また, 男児には尿道下裂, 停留辜丸, 短小陰茎, 副辜丸嚢腫などの先天性泌尿生殖器異常の増加と, これらに起因した精子の運動性, 授精能の低下ならびに精子数減少などが認められている (Stillman et al., 1982).

これらの合成女性ホルモンを妊娠動物に投与すると, その経胎盤毒性は主として新生児における半陰陽性変化として認められる. これは遺伝的には雄である胎児の雄化が抑制された結果である. この種の変化に伴う生殖細胞の發育不全, 精子密度の減少, 妊性低下などの生殖障害は分子から組織レベルまで詳細に調べられ, 膨大な知見が蓄積されている (Table 2).

しかし, その後の世代における毒性発現については DES がマウスで継世代発癌性を示したという報告 (Newbold et al., 1998) 以外, ほとんどわかっていない. Newbold らは, CD-1 妊娠マウスに, DES を皮下注射して, 自然分娩させて得られた雌出生児を, 性成熟後に無処理雄マウスと交配させ, 次世代児を得た. 次世代児を成熟させ分娩を経験させた後 (生後 17—24 ヶ月) 調べると, 子宮腺癌を含む悪性生殖腺腫瘍が有意に増加していることが認められた. 彼らのデータは, DES の胎児曝露による継世代影響が, 癌として発現しうること示唆している.

2. 合成ホルモンの継世代影響

1) 胎内被曝による発生障害と生殖障害

ICR マウスの妊娠 9—16 日に EE (0.2, 1.0 mg/kg/day), EB (0.15, 0.3 mg/kg/day), DES (0.1 mg/kg/day) あるいは抗エストロゲンの tamoxifen (TAM, 0.5

Table 2 Toxic effects of prenatal exposure to synthetic hormones in reproductive systems of experimental animals

Synthetic hormones	Species	Effects
Ethinyl estradiol (EE)	Mouse	Ovotestis ^{a)} , Intra-abdominal testis associated with persistent ^{a)} Müllerian duct ^{b)} , Decreased in viability of the conceptus ^{c)} , Interruption of pregnancy ^{c)}
Estradiol benzoate (EB)	Mouse, Rat	Atrophy of seminiferous tubules ^{d)} , Atrophy of testis, epididymis and seminal vesicle ^{d)} , Inhibition of spermatogenesis ^{d)}
Diethylstilbestrol (DES)	Mouse, Rat	Ovotestis ^{e)} , Malformations of the genital tract ^{e)} , Feminized sexual development and maturation ^{e)} , Intra-abdominal retention and/or fibrosis and calcification of testis ^{e)} , Epididymal cysts ^{f)}
Tamoxifen (TAM)	Mouse	Inhibition of uterine development ^{g,h)}

a) : Yasuda et al., 1985, b) : Yasuda et al., 1988, c) : Yanagimachi and Sato, 1968, d) : Steinberger and Duckett, 1967, e) : McLachlan, 1977, f) : Iguchi and Takasugi, 1986, g) : Branham et al., 1985, h) : Branham et al., 1988

Table 3 Reproductive function of male mice treated prenatally with synthetic hormones

Synthetic hormones	Dose (mg/kg/day) ^{a)}	Copulation index (%)	Fertility index (%)	No. of implants/litter	Embryonic mortality ^{b)} (%)
Control	0	100	100	14.8	6.3
Ethinyl estradiol (EE)	0.2	90.9	95.0	14.1	9.1
	1.0	40.9	44.4	12.3	6.0
Estradiol benzoate (EB)	0.15	100	100	14.5	6.5
	0.3	95.5	100	12.6	7.8
Diethylstilbestrol (DES)	0.1	0	0	0	—
Tamoxifen (TAM)	0.5	100	100	14.5	7.4

a) : Daily administration of synthetic hormones into pregnant mice for 8 days

b) : An increase in embryonic mortality over the control level was taken as an indication of dominant lethals caused by a synthetic hormone in the germ cells

mg/kg/day) などの合成ホルモンを連日経口投与あるいは皮下注射し, 自然分娩させて雄出生児を得たが, これらの出生児には外表奇形は観察されなかった.

雄出生児の性成熟後に無処理雌マウスと交配させて生殖能力を検索した (Table 3). その結果, EE 1.0 mg/kg/day 群と DES 0.1 mg/kg/day 群では, 交尾率と授胎率の著しい低下がみられ, 生存胎児はほとんど得られなかった. EE 0.2 mg/kg/day 群および EB 0.3 mg/kg/day 群では交尾ならびに授胎などの生殖能力に影響はみられなかったが, 着床数の低下傾向がみられた. EB 0.15 mg/kg/day 群および TAM 0.5 mg/kg/day 群では生殖能力に何ら変化はなく処理効果は認められなかった.

交配終了後の剖検では, EE 1.0 mg/kg/day 群と DES 0.1 mg/kg/day 群に精巣および精巣上体などの生殖器の著しい萎縮, ミュラー管およびウオルフ管遺残精巣あるいは卵精巣 (ovotestis, Fig. 2) が高率に観察されたが, その他の群では内部生殖器に変化はなかった. さらに生殖器を病理組織学的に観察した結果, EE 1.0 mg/kg/day 群と DES 0.1 mg/kg/day 群では精細管お

よび精巣上体管の著しい萎縮がみられ, EE 0.2 mg/kg/day 群および EB 0.3 mg/kg/day 群では精細管および精巣上体管の軽度萎縮がみられた.

2) 胎児期に被曝した雄マウスの次世代胎児における先天異常の発生

胎生期に合成ホルモン暴露された雄出生児が性成熟するのを待って無処理雌と交配させて次世代胎児を得た. これらの胎児の外表奇形の有無を観察し, 奇形発生率を求めた. その結果, EE の 0.2 mg/kg/day 群および EB の 0.3 mg/kg/day 群で, 奇形発生率が無処理対照群と比較して有意に増加した. 一方, TAM 0.5 mg/kg/day では処理効果は認められなかった (Fig. 3). EB 0.15 mg/kg/day 群では, 奇形発生率は対照レベルであったので, この合成ホルモンの継世代効果には閾値があることも明らかになった.

EE 処理群あるいは EB 処理群で認められた奇形は, 口蓋裂, 矮小, 外脳症, 指肢の奇形など, いずれも ICR 系統のマウスで自然発生的に認められる外表奇形の型で

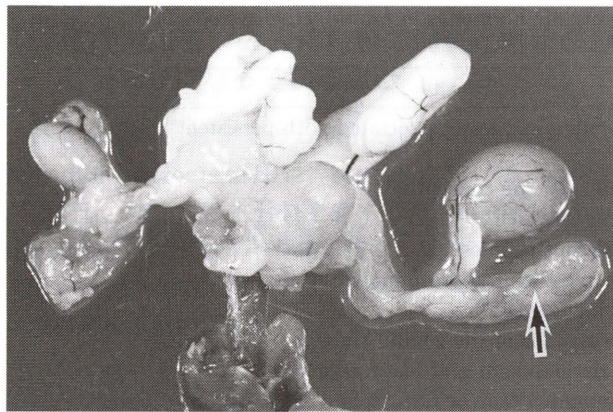


Fig. 2 A typical case of feminization of testis observed at the mature stage after prenatal treatment of mice with diethylstilbestrol at 0.1 μ g/kg/day for 8 days. Testis showed unilateral atrophy. Elongated configuration, which was characteristic of the epididymis, was absent in the epididymides. Epididymis had cysts (arrow). Seminal vesicles were usually enlarged, and a mice had a markedly dilated Müllerian remnant, which was resembled the uterus.

あった。EE 0.2 mg/kg/day 群および EB 0.3 mg/kg/day 群に認められた先天奇形のスペクトラムを、自然発生奇形のスペクトラムと、雄マウスを強力な変異原である ethylnitrosourea (ENU) で処理した時の次世代奇形について得られているデータ (Nagao, 1988; Nagao and Fijikawa, 1990) とともに示した (Fig. 4)。合成ホルモンによる父親処理により認められた次世代奇形のスペクトラムは、自然発生奇形のタイプ分布とほぼ一致した。

3) 継世代催奇形性と精巣毒性

マウス雄処理で次世代の奇形児出現を増加させることが明らかにされている物質は、いずれも強力な変異原である。また、次世代奇形として誘発される異常のタイプ分布は自然発生奇形のタイプ分布とほぼ一致する。本研究で、EE 処理と EB 処理で認められた次世代奇形のタイプ分布も自然発生奇形のタイプ分布と区別できなかった (Fig. 4)。これらの経験則とデータは、EE も EB も、胎生期の精巣原基において、始原生殖細胞に対して強力な変異原として作用したことを示唆する。しかし、EB 処理による次世代奇形の誘発には明瞭な閾値効果が認められた。これは、EE や EB が変異原として作用したという説明を困難にする。誘発突然変異についての DNA 修復は完璧ではないので、DNA 損傷に起因する効果に閾値は考えにくいからである。実際、ENU の胎生期処理による次世代奇形 (Wada et al., 1994) や特定座位突然変異 (Shibuya et al., 1996) は非閾値型の用量効果関係を示している。

前述した、Newbold ら (1998) は DES の継世代発癌効果の機構として、生殖細胞で生じたメンデル遺伝性の優

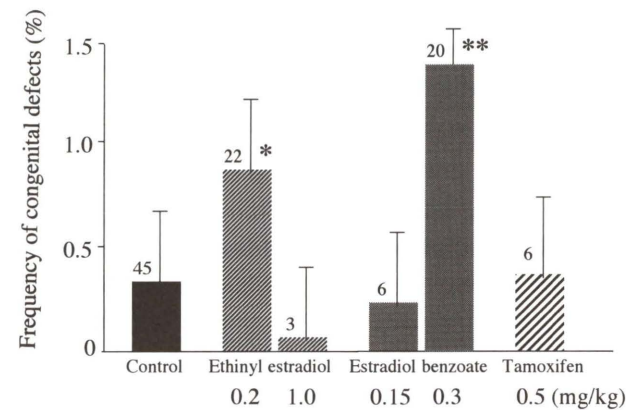


Fig. 3 Frequency of congenital malformations in the offspring whose sires were treated prenatally with synthetic hormones and mated with untreated females. Vertical lines represent S.D. The number attached to each column is total number of malformed fetuses detected.

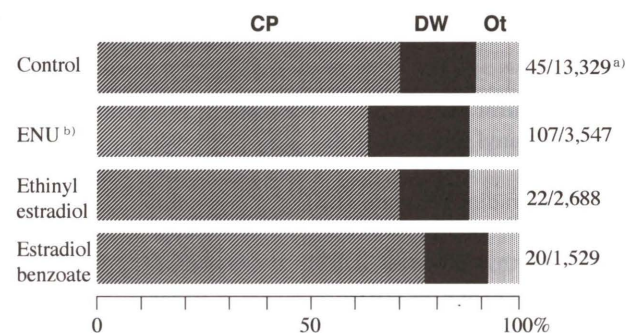


Fig. 4 Spectrum of malformations detected in the fetal offspring of male mice prenatally treated with synthetic hormones and a mutagen ethylnitrosourea (ENU).

CP: cleft palate, DW: dwarfism, Ot: others (exencephaly, open eyelid, limb deformity)

a): Total number of malformed fetuses versus total number of fetuses observed

b): Data from Nagao (1988)

性突然変異に加えて、遺伝子の脱メチル化、ミニサテライト DNA 配列の遺伝的不安定性を考えている。EE と EB の継世代催奇形性についても、上述した理由から、同様に多様な可能性が考えられる。いずれの機構であれ、閾値型の用量効果関係 (Fig. 3) は、ホルモン作用による細胞ホメオスタシスの破綻に付随する遺伝子発現の亢進と抑制、活性酸素の発生等々が引き金となって誘発された二次的なものであることを示唆する。

以上の論議は、生殖細胞 (始原生殖細胞) を合成ホルモンの遺伝的効果の一義的標的と想定して行ったもので、精巣に対する毒性との関わりでみると、別の可能性が考えられる。Table 4 に示しているように、継世代催奇形効果が認められた処理 (EE の 0.2 mg/kg/day と EB の 0.3 mg/kg/day) はいずれも精巣の雌化あるいは萎縮をもたらしており、無効であった処理 (EB の 0.15 mg/

Table 4 Testicular toxicity and transgenerational teratogenicity of synthetic hormones in mice

Synthetic hormones	Dose (mg/kg/day) ^{a)}	Testicular toxicity	Male-mediated teratogenesis
Ethinyl estradiol (EE)	0.2	+	+
	1.0	+ ^{b)}	ND
Estradiol benzoate (EB)	0.15	-	-
	0.3	+ ^{c)}	+
Tamoxifen (TAM)	0.5	-	-

a): Daily administration of synthetic hormones into pregnant mice for 8 days

b): A few number of atrophic tubules in the testis, and epididymal cysts were observed. These cysts resembled female-like structures which were homologous to oviduct. There was a duct along with vas deferens, and which was similar to the uterus

c): Unilateral dilatation of seminiferous tubules and epididymal duct were observed. Marked dilatation of a cyst was also found, and the cyst was lined with flattened epithelial cells

kg/day と TAM の 0.5 mg/kg/day) では、精巣毒性は認められていない。これらの結果より、私は精巣毒性の二次的効果として継世代影響の可能性を考えている。藤川 (1999) が指摘しているように、正常な精巣の生殖細胞系列には自然発生した突然変異を淘汰して、次世代に伝わる変異の数を抑えている機構が備わっているが、障害を被った精巣では、それらに対する修復機構が十分に機能しないのではないか。すなわち私は、本研究でみつけた合成ホルモンの継世代催奇形効果は、胚発生に影響する自然発生突然変異が正常レベル以上の頻度で次世代に伝わった結果ではないかと考えている。この可能性を作業仮説として、今後の研究で追求したい。

結 語

胎生期にエストロゲン系合成女性ホルモン処理を受けたため、精巣の部分的雌化や精細管萎縮を被った雄マウスの次世代で奇形胎児が対照レベル以上の頻度で出現した。精巣毒性が認められなかったマウスの次世代では継世代影響は認められなかった。現時点では、用いた合成ホルモンが生殖細胞において変異原として作用した可能性も、二次的にそのゲノムに遺伝的变化を誘発した可能性も否定できない。にもかかわらず、精巣毒性の結果、自然発生突然変異が正常レベル以上の頻度で次世代に伝わったために奇形が高頻度発生したとする作業仮説を提唱した。この仮説の当否を明らかにすることは、内分泌攪乱化学物質の後世代影響を正しく理解するのに貢献すると信ずるからである。

謝 辞

藤川和男博士より貴重なご助言をいただいた。なお本研究の一部は、科学技術振興調整費により実施した。

参考文献

Branham, W.S., D.M. Sheehan, D.R. Zehr, K.L. Medlock,

C.J. Nelson and E. Ridlon (1985) Inhibition of rat uterine gland genesis by tamoxifen, *Endocrinol.*, 117, 2238-2248.

Branham, W.S., D.R. Zehr, J.J. Chen and D.M. Sheehan (1988) Postnatal uterine development in the rat: Estrogen and antiestrogen effects on luminal epithelium, *Teratology*, 38, 29-36.

Iguchi, T. and N. Takasugi (1986) Polyovular follicles in the ovary of immature mice exposed prenatally to diethylstilbestrol, *Anat. Embryol.*, 175, 53-55.

McLachlan, J.A. (1977) Prenatal exposure to diethylstilbestrol in mice: Toxicological studies, *J. Toxicol. Environ. Health*, 2, 527-537.

Nagao, T. (1988) Congenital defects in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea, *Mutat. Res.*, 202, 25-33.

Nagao, T. and K. Fujikawa (1990) Genotoxic potency in mouse spermatogonial stem cells of triethylenemelamine, mitomycin C, ethylnitrosourea, procarbazine, and propyl methanesulfonate as measured by F₁ congenital defects, *Mutat. Res.*, 229, 123-128.

Newbold, R.R., R.B. Hanson, W.J. Jefferson, B.C. Bullock, J. Haseman and J.A. McLachlan (1998) Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol, *Carcinogenesis*, 19, 1655-1663.

Shibuya, T., N. Horiya, H. Matsuda, K. Sakamoto and T. Hara (1996) Dose-dependent induction of recessive mutations with N-ethyl-N-nitrosourea in primordial germ cells of male mice, *Mutat. Res.*, 357, 219-224.

Steinberger, E. and G.E. Duckett (1967) Hormonal control of spermatogenesis, *J. Reprod. Fert., Suppl.* 2, 75-87.

Stillman, R.J. (1982) In utero exposure to diethylstilbestrol: Adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance in male and female offspring, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 142, 905-921.

Wada, A., M. Sato, H. Takashima and T. Nagao (1994) Congenital malformations in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea at the embryonic stage, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 14, 271-279.

Yanagimachi, R. and A. Sato (1968) Effects of a single oral administration of ethinyl estradiol on early pregnancy in the mouse, *Fertil. Steril.*, 19, 787-801.

Yasuda, Y., T. Kihara, T. Tanimura and H. Nishimura

(1985) Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice, *Teratology*, 32, 219-227.
Yasuda, Y., I. Ohara, H. Konishi and T. Tanimura (1988)

Long-term effects on male reproductive organs of prenatal exposure to ethinyl estradiol, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 159, 1246-1250.

Environ. Mutagen Res., 21 : 273 - 280(1999)

シンポジウム

本稿は 1999 年 5 月 28 日, 東京の日本薬学会 長井記念館で開催された日本環境変異原学会主催の第 10 回公開シンポジウム「内分泌攪乱物質の作用機序と後世代影響—環境変異原研究との接点—」(企画: 菊川清見, 渋谷 徹, 藤川和男)で発表された(座長: 菊川清見)

ダイオキシンの継世代催奇性

藤川 和男

近畿大学原子力研究所 〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1

Transgenerational teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, a review

Kazuo Fujikawa

Atomic Energy Research Institute, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka 577-8502, Japan

Summary

Epidemiological studies in USA on the reproductive outcomes of Vietnam veterans exposed to Agent Orange, a mixture of herbicide contaminated with 2,3,7,8-TCDD (dioxin), have shown no clear evidence for an association between herbicidal exposure and the risk of fathering babies with congenital defects. Similarly, experimental evidence for male-mediated teratogenicity of dioxin is not clear at present. On the other hand, reliable negative data are available for dioxin clastogenicity in human spermatozoa *in vitro* and the clastogenicity and DNA-damaging effect in germ cells of male mice. However, germ-cell degradation has been reported in male mice exposed to dioxin, and this has been verified to occur as a consequent of Sertoli cell injury. These results and other relevant data are reviewed and discussed. Finally, need for further accumulation of animal data is pointed out so that a final conclusion on the genetic hazard of dioxin can be achieved.

(This paper, chaired by Kiyomi Kikukawa, was presented to the 10th JEMS Annual Symposium, "Endocrine Disruptor Mechanism and Posterity Effects-Concern with Environmental Mutagen Research", organized by Kiyomi Kikukawa, Tohru Shibuya, and Kazuo Fujikawa, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at The Pharmaceutical Society of Japan, Nagai Memorial Hall, May 28, 1999.)

Keywords : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, transgenerational teratogenicity, mutagenicity, testicular atrophy

緒 言

ベトナム戦争(1962-1971)の最盛期, 米軍はベトナムの密林に大量の枯葉剤を散布した。戦後, 米国に帰還した兵士達は, 子供の発生障害や発癌などの深刻な医学的問題を訴え始めた。やがて, 戦争中に使用された枯葉剤 Agent Orange(2,4-D と 2,4,5-T の混合物)に 2,4,5-T 合成の副産物として 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-

dioxin(以下, ダイオキシン)が含まれていることがわかった(Cadbury, 1997 参照)。枯葉剤散布地域で戦ったベトナム兵達の子供についても同様な問題が指摘されている(野村ら, 1999 参照)。このように, 多くの内分泌攪乱物質の中でダイオキシンに限って, 父親の被曝に起因する発生障害が懸念されている背景には, ベトナム戦争での枯葉剤の使用がある。

父母を問わず, 親世代の生殖細胞に対する放射線や薬物処理によって次世代の発生障害として発現する毒性を継世代催奇性という。実験動物では, Nomura(1975, 1982)の先駆的研究以来, この種の毒性が実在することは

受付: 1999 年 5 月 11 日 受理: 1999 年 8 月 27 日
©日本環境変異原学会

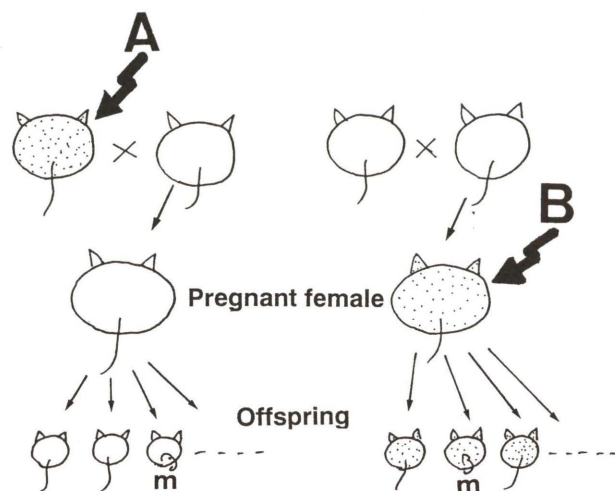


Fig. 1 Detection of malformations (m) after paternal treatment (A) or after treatment of pregnant females (B) with an agent as evidence of the transgenerational teratogenicity and the somatic adverse effect in developing embryos, respectively. Dotted mice represent individuals which are subjected to the whole-body exposure as a father, pregnant dam, or embryos.

広く認められてきている。以下、遺伝的影響としての継世代催奇性を体細胞影響としての催奇性と比較検討した後、ダイオキシンの継世代催奇性とその関連毒性を解説する。

1. 継世代催奇性と当世代催奇性

放射線あるいは化学物質の継世代催奇性を実験的に検索するには、処理を施した雄マウス (Fig. 1 A) あるいはラットを同系統の雌と交配させて得た次世代子孫 (胎児あるいは新生児) で異常体の出現頻度を調べる。この頻度が父親の被曝量に依存して対照以上に有意増加すると、当該処理が、継世代催奇性をもたらしたと判定する。ここで対照以上に増加した異常は被曝した父親の遺伝子を受け継いだ結果である。したがって、それは遺伝的影響のカテゴリーにはいる。事実、現在までに継世代催奇性が認められている物質はいずれも強力な変異原である (Nagao and Fujikawa, 1998)。一方、通常の催奇性試験では、妊娠雌を処理して (Fig. 1 B), 経胎盤的に被曝した胚が出生直前の胎児あるいは新生児になるのを待って、異常体が検出される。ここで対照頻度以上に用量依存的に増加した異常は、同じ世代内の毒性発現である。すなわち、それは当世代催奇性の結果で、体細胞影響のカテゴリーにはいる。当世代催奇性を有する物質 (いわゆる催奇剤) には変異原性物質も非変異原性物質も含まれる。

Fig. 1 に示したように、化学物質の継世代催奇性を調べる実験の処理対象にはもっぱら雄動物が用いられてきた。これは、雌処理では被曝物質の卵子細胞質や母体組

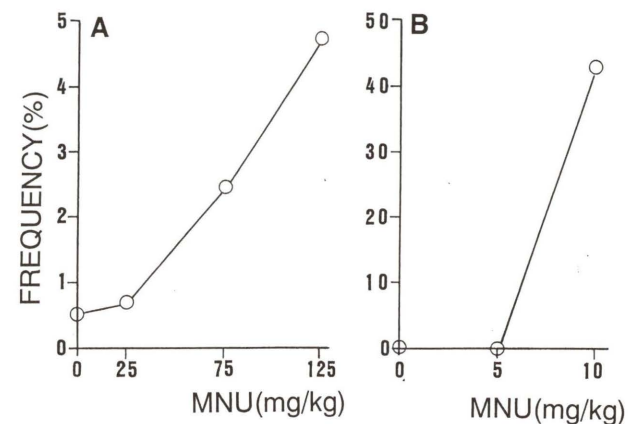


Fig. 2 Comparative induction of malformed fetuses in ICR mice by paternal treatment (A) and embryonal treatment (B) with methylnitrosourea (MNU). Data from Nagao (1987) and Nagao et al. (1991), respectively.

織中での残留や母体に対する毒性効果を介した発生障害が考えられるからである。当然、動物実験における継世代催奇性に関する情報は雄処理、とりわけ雄マウス処理の結果に偏っているが、本稿の主題に関する限りこれは問題ではない。ダイオキシンで疑われているのは、父親の被曝による次世代奇形の発生 (male-mediated teratogenesis) である。

後で詳しく述べるが、ダイオキシンの継世代催奇性はヒトでも実験動物でもはっきりしていない。しかし、当世代催奇性に関しては、マウスの系で明瞭な陽性効果が認められている (Birnbaum, 1991 参照)。一方、Fig. 2 に示したように、化学変異原 methylnitrosourea (MNU) は、マウス雄処理で明瞭な継世代催奇性を発揮し (A), 妊娠雌処理で強力な当世代催奇性 (B) を発揮する。図中の投与量効果関係より、奇形胎児を 5% の頻度で誘発するのに必要な MNU の腹腔内投与量は、雄親処理で 125 mg/kg, 妊娠雌処理ではその約 1/20 であったことがわかる。このように強力な変異原を用いても、雄親処理による奇形誘発効率が妊娠雌処理による効率よりも桁違いに低いのは、毒性作用の標的が、雄親処理では生殖細胞 DNA であるのに対して、妊娠雌処理では発生途上の胚全体であるからである。毒物に曝された個体群で、生殖細胞を介した発生障害のリスクは体細胞影響としての発生障害のリスクよりもはるかに低いのである。人類は、これをすでに経験済みである。すなわち、広島・長崎の胎内被曝者の中である種の発生障害が多発したが、被曝者の子供における周産期異常の頻度は非被曝者の子供における頻度とほぼ同じであった (Kondo, 1993 参照)。

2. 疫学調査

1983 年、ホーチミン市で開催された国際会議で、ベトナム戦争で枯葉剤散布地域で戦った後、北部の非散布地

域に帰ってきたベトナム兵の子供達に、非散布地域で戦ってきた兵士の子供達と比べて高い頻度で口蓋裂や無脳症等の発生障害が発生しているという調査結果がベトナムの研究者達によって報告された (Constanble and Hatch, 1985; Sterling and Arundel, 1986 参照)。ほぼ時を同じくして、Operation Ranch Hand, すなわち、枯葉剤作戦に従事した米国ベトナム帰還兵の子供達の調査結果の第 1 報が学術雑誌に報告された (Erickson et al., 1984)。その後も、出生記録の調査、インタビュー、追跡調査等の方法を用いて、米国におけるベトナム帰還兵の生殖に関する疫学研究は続行され、その結果が次々報告されてきたが、最近の報告 (Michalek et al., 1998) に至るまで、枯葉剤被曝と発生障害の因果関係は認められていない。ただし、ある種の神経管形成不全の発生と枯葉剤被曝の間に関連があることを示唆する結果は、Erickson et al. (1984) 以来、繰り返し得られている (Centers for Disease Control Vietnam Experience Study, 1988; Wolfe et al., 1994)。この点に関して、米国学士院の委員会は、その 1996 年報告で、下記のような結論を下している (Institute of Medicine, 1996)。

「3つの疫学研究 (空軍による Ranch Hand 研究、防疫センター CDC による Vietnam Experience Study, および CDC Birth Defects Study) は、枯葉剤被曝と子供における二分脊髄に関して増加したリスクの間に関連があることを示唆している。これらの研究は、比較的质量が高いものであるが、思い出しの歪みがあった可能性、無回答による歪み、サンプルサイズが小さいこと、および被曝の分類ミスを含む方法論上の欠点を有する。加えて、同様な関連が胎生学上類縁の無脳症について認められなかったことが気になる。」

なお、当委員会は、ベトナムや米国の枯葉剤被曝者および他の枯葉剤関連の疫学研究を評価する目的で設置されているものである。この委員会は、二分脊髄以外の発生障害、自然流産、周産期死、死産等に関しては、枯葉剤被曝との関連性の有無を決めるには、証拠が不適切で不十分という結論を下している (Institute of Medicine, 1996)。

3. 動物実験一過去の研究より

1) 変異原性と DNA 損傷性

すでに述べたように、実験動物で継世代催奇性を示すことが知られている物質はすべて強力な変異原である。ダイオキシンはこの範疇にはいる毒物ではない。なぜなら、ショウジョウバエの伴性劣性致死試験 (Zimmering et al., 1985)、マウスの骨髓細胞における小核、染色体異常および姉妹染色体交換を調べた試験 (Meyne et al., 1985)、マウスの毛色スポットテスト (Fahrig, 1993) 等の *in vivo* 試験でダイオキシンの明瞭な変異原性効果が認められなかったからである。実際、IARC (1997) は、*in*

vitro 試験、*in vivo* 試験を問わず、過去の変異原性試験の結果から総合的に判断して、ダイオキシンを変異原性を有さない発癌物質としている。

ところが、動物体内でのダイオキシンの変異原性を示唆するデータが、最近、Schiestl et al. (1997) によって報告された。彼らは、*pink-eye* 座内 DNA 重複による不安定的変異 p^{un} をホモで持つマウス胎児を、経胎盤的にダイオキシンで処理し、それらが出生するのを待って、 p^{un} の復帰変異による野生型毛色スポットの有無を調べた。彼らが有意な頻度で得た復帰変異スポットは、DNA 変化以外の別の解釈も可能である。しかし、次の 3つの研究結果も考慮すると、ダイオキシンが何らかのメカニズムで、細胞の組換え機構を起動させる可能性は否定できない。①同じ復帰変異スポットテストで調べた 2 種の polychlorinated biphenyl が投与量依存的な陽性効果を示している (Schiestl et al., 1997)。②マウス毛色 (前進突然変異) スポットテストにおいて、ダイオキシンは ethylnitrosourea (ENU) と同時処理で、相同染色体組換えによる変異スポットの頻度を、ENU 単独処理群以上に増加させた (Fahrig, 1993)。③培養細胞でダイオキシンは弱いながらも姉妹染色体交換の誘起能を示した (Nagayama et al., 1994; Ikushima et al., 1996)。

上記のような可能性が否定できない別の理由は、ダイオキシン投与を受けたラットの肝細胞において、DNA との共有結合や付加体形成は認められていないが、DNA 単鎖切断や塩基の酸化損傷の生成に関しては明瞭な陽性結果が得られているからである (Table 1)。マクロファージを主体とする腹腔内遊離細胞でも DNA 単鎖切断を誘発する (Table 1, Fig. 3)。投与量との関係が詳しく調べられた遊離細胞でみてみると、単鎖切断の生成には、明瞭な閾値効果が認められ、生成量は LD_{50} 相当用量でせいぜい対照の数倍にすぎない (Fig. 3)。これは単鎖切断がダイオキシンの二次的作用で起きたことを示唆する。事実、単鎖切断も塩基損傷も、ダイオキシンが Ah レセプターを介して、P 450 関連遺伝子の転写を誘導した結果生じた、活性酸素に起因すると考えられている (Tritscher et al., 1996; Park et al., 1996)。

2) 継世代催奇性と優性致死効果

肝心の継世代催奇性については、2つの研究報告がある。その一つは、枯葉剤 (2,4-D と 2,4,5-T) と混ぜて、ダイオキシンを 0.16, 1.2 あるいは 2.4 $\mu\text{g/kg/日}$ の用量率で 8 週間、雄マウスに経口投与した後、非処理雌と交配して得た次世代胎児で、外表面、骨格および内臓の奇形を調べたものである (Lamb et al., 1981)。もう一つは、雄ラットにダイオキシンを 25 $\mu\text{g/kg}$ 静脈注射した後、10 週間にわたり週 1 回 5 $\mu\text{g/kg}$ の静注を繰り返した群と、75 $\mu\text{g/kg}$ 静注後、同じく 10 週間、週 1 回 15 $\mu\text{g/kg}$ の静注を繰り返した群の次世代胎児で骨格異常を調べた

Table 1 DNA damaging effects of orally applied 2,3,7,8-TCDD in rat somatic cells

Somatic cell	Damage	Evidence	Treatment
Hepatocyte	Covalent bond ^{a)}	negative	7.5 μ g/kg
	Adduct formation ^{b)}	negative	1 μ g/kg/day, 6 months
	Single strand breaks ^{c)}	positive	25 μ g/kg
	8-Oxo-deoxyguanosine ^{d)}	positive	0.1 μ g/kg/day, 30 weeks
Peritoneal lavage cell	Single strand breaks ^{e)}	positive	25 μ g/kg

a)~e), Data from Poland and Glover (1979), Randerath et al.(1988), Wahba et al. (1989), Tritscher et al.(1996) and Alsharif et al.(1994), respectively.

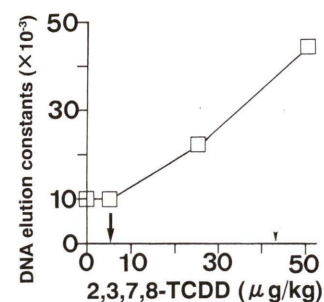


Fig. 3 Production of DNA single strand breaks in peritoneal lavage cells in female SD rats after oral administration of 2,3,7,8-TCDD (data from Alsharif et al., 1994). Arrow points a threshold dose, and arrow head the LD₅₀ for SD females (Stahl et al., 1992).

ものである(Chahould et al., 1991). いずれの試験でも、雄親処理に起因する奇形発生は認められなかった。同時に調べられた、優性致死効果、すなわち、生殖細胞で生じた突然変異による着床後期胚の致死についても陰性であった。着床率も対照レベルであった。Lamb et al. (1981)のマウスの実験では、次世代胎児の性比も調べられたが、この指標に関しても有意な投与効果は認められていない。ダイオキシンを雌ラットに対して、4あるいは8 μ g/kg/日の用量率で妊娠6—15日目までの10日間経口投与して得た雌雄の新生児が成熟するのを待って、同処理群内で交配させて、次世代胎児の生存率を調べた研究(Khera and Ruddick, 1973)でも優性致死効果は認められていない。これらの実験は複数の投与群を設けて行われ、調査した次世代個体数も多いので、得られた陰性データは、ダイオキシンが継世代毒性を有するならば、その閾値効果を示唆する証拠となる。

4. 最新情報

以上みてきたように、ヒトにおけるダイオキシンの継世代催奇性ははまだ明らかでないが、周辺情報はかなり蓄積している。しかし、最も重要な生殖細胞におけるダイオキシンの毒性についての知見は、上述のように非常に限られていた。以下紹介する我が国の研究者達の最近の仕事はこの点で世界の最先端にある。彼らのもたらした新知見は、Table 2に概要をまとめておいた。

1) ヒト精子に対する作用

上口と石井(1999)は、5名のドナーから得たヒト精子を2—3群に分け、1群をダイオキシンを含む培養液、1群を対照培養液、あるいはさらに1群を設けて、溶媒として用いたDMSOを含む培養液で処理した後、ハムスター卵へ媒精し、受精卵が第一卵割中期になるのを待って、ヒト染色体の構造異常を調べた。ダイオキシン処理は受精率低下をもたらす毒性濃度(最高5 μ g/ml)で行ったにも関わらず、いずれのドナーの精子にもダイオキシン処理による染色体異常の発生は認められなかった。精子の染色体異常の誘発に関して、ヒト精液のダイオキシン汚染は心配する必要はないことを、彼らの研究結果は教える。

2) マウス生殖細胞に対する作用

井上ら(1999)は、30%致死用量あるいはそれ以上の毒性用量に相当するダイオキシンのマウス腹腔内投与を行い、精原細胞から成熟精子までの各発育段階にある生殖細胞におけるDNA損傷を、不定期DNA合成とDNA単鎖切断を指標にして調べた。いずれの指標に関しても、ダイオキシンの処理効果は認められなかった。彼らは、染色体異常の誘発についても調べたが、同様に陰性であった。発育途上の生殖細胞とダイオキシンが接触することは、ダイオキシンを精巣内に直接注入して、それらがダイオキシンと結合したまま精子期に達することから、確かめている。このように彼らは、DNA損傷性と染色体損傷性で一致して信頼できる陰性結果を得た。したがって、彼らが用いた投与量(100—300 μ g/kg)は、個体致死用量ではあっても、精巣において酸化ストレスをもたらす用量としては、閾値以下であることを示唆する。

それでも、ダイオキシン投与後、数週間すると、生殖細胞が激減した。これはセルトリ細胞の傷害の結果であることも井上ら(1999)は明らかにした。この傷害は投与後24時間目ですでに認められている。セルトリ細胞は、精細管外のライディヒ細胞と精巣外からのホルモン情報を受けて、精細管内で生殖細胞の生産と発育を支えている体細胞性成分である(Fritz, 1990参照)。

Table 2 Transgenerational teratogenicity of 2,3,7,8-TCDD and related effects in experimental systems, update of the results by Japanese scientists

Effect	Evidence	Ref.
Congenital defects in F ₁ offspring of male mice	suggestive ^{a)}	Nomura et al.(1999)
Dominant lethal mutations in male germ cells of mice	suggestive ^{b)}	Nomura et al.(1999)
Reduced fertility of human spermatozoa <i>in vitro</i>	positive ^{c)}	Kamiguchi and Ishii (1999)
Chromosome aberrations in human spermatozoa <i>in vitro</i>	negative ^{d)}	Kamiguchi & Ishii (1999)
Chromosome aberrations in male germ cells of mice	negative ^{e)}	Inoue et al.(1999)
DNA damage in male germ cells of mice	negative	Inoue et al.(1999)
Degeneration of Sertoli cells in mice	positive ^{f)}	Inoue et al.(1999)

- a) : Dose-dependent, but insignificant, increase in the incidence of malformed fetuses; significant increase in the incidence of fetuses with respiratory distress syndrome in two different strains
b) : Significant decrease in the surviving fraction of fetal offspring after a high dosing to paternal mice
c) : Dose dependent reduction to a 60% level of control at doses up to 2 μ g/ml
d) : No significant effect at doses toxic for fertility
e) : No significant effect at lethal doses
f) : Both histopathological evidence and dose-response data are available

3) マウスにおける継世代催奇性

過去の同様な研究(Chahould et al., 1991; Lamb et al., 1981)における長期間処理法とは異なり、野村ら(1999)は単回腹腔内投与法を雄マウスに対して採用した。投与群は2群設けた。高い方の用量は、井上ら(1999)が用いた毒性用量(100 μ g/kg)と同じで、低い方はその半分。継世代影響の形態的指標とし、次世代胎児の外表異常、矮小および内臓奇形を観察した。また、機能的障害(仮死)についても調べた。この指標は、ENU処理を受けた父親マウスの精原幹細胞に由来する次世代胎児で確認された新たな継世代影響である(Nomura et al., 1990)。統計的に有意な処理効果は、この指標で繰り返し得られた。ただし、その頻度の投与量依存性は明らかでない。形態的異常については、頻度は有意ではないが、高投与量群で、対照群ではまれな複合奇形が複数出現した。同じ高投与量群では、生存胎児頻度の有意な減少がみられた。精子数の減少に起因すると思われる着床率の有意な低下も高投与量群で認められた。

ダイオキシンの継世代催奇性は生物学的にありうるのか(biological plausibility)という点に関して、前述した米国学士院の委員会は、「結論を下すには動物実験に限られている」という見解を表明している(Institute of Medicine, 1996)。この見解は、野村ら(1999)の研究でも3例目であり、また、問題の毒性を示唆するにとどまっているので、現時点でも妥当であろう。結論は今後の研究に待ちたい。

5. 精巣毒性

では、ダイオキシンの生殖毒性に関して、いったい何がはっきり分かっているのか? それは、広範な動物種で認められているという点で、精巣の萎縮である(IARC, 1997参照)。定量的研究が最も進んでいるラットにおける精巣毒性について、井上ら(1999)の研究結果から新たにみえてきた点を次にまとめる。

胎児期から授乳期にかけて母体からのダイオキシンに暴露されたラットが性成熟するのを待って、精巣を組織学的に検討したMably et al.(1992)は、精子数の低下がみられた投与群でも、セルトリ細胞と精母細胞の数の比が対照とほぼ同じであったと報告している。これは、ラットにおいても、ダイオキシンによる精子数減少はセルトリ細胞傷害の結果であることを示唆する。El-Sebeawy et al.(1998)が報告した思春期ラット処理によるデータは、精子生産に対するダイオキシンの投与量に明瞭な閾値があることを示している。Mably et al. (1992)の精子生産率のデータから閾値を推定すると、思春期処理の場合の約1/10となった(Table 3)。精子生産率を対照の80%レベルまでに下げるのに必要な投与量も、思春期処理の場合と比べて胎児—授乳期処理では約1/10となったので、両時期の処理は同じメカニズムで(すなわち、セルトリ細胞の傷害を介して)精巣毒性をもたらすと考えてもいい。性成熟の程度に応じた閾値用量の違い(Table 3)から、出生前後の時期の未成熟セルト

Table 3 Dosage effect of 2,3,7,8-TCDD on daily sperm production in rats in relation to the sexual maturation

Exposure stage	Threshold dose ^{a)} ($\mu\text{g/kg}$)	Dose for 80% level of control ($\mu\text{g/kg}$)
In utero-lactational ^{b)}	0.01	0.1
Pubertal ^{c)}	0.1	1
Mature ^{d)}	≥ 50	ND

- a) : A dose for single i. p. injection below which no adverse aftereffect would be seen on the production rate of sperm at the maturing or matured stage
b) : Days-7 to 21 after birth ; the dose values are for Holtzman female rats on day 15 of gestation (data from Mably et al., 1992)
c) : Day 21 of SD rats after birth (data from El-Sabeawy et al., 1998)
d) : Probably around 10 weeks as judged from the body weights of SD rats used, i. e., 300-350 g (data from Johnson et al., 1992).ND, no data available for the dose estimation

り細胞がダイオキシンの作用を最も受けやすいことが示唆される。

ダイオキシンによる精巣萎縮は、セルトリ細胞の傷害を介して発現するという点で、放射線や ENU などの変異原による精巣萎縮と決定的に異なる。変異原の精巣毒性の主要標的は生殖細胞である。例えば、胎児期に高用量の ENU 処理を受けたマウス成体の精巣では、生殖細胞はほとんどみられなかったが、セルトリ細胞は精細管壁に沿って正常に配列しているのが認められた(Nagao et al., 1996)。ラット精巣における、放射線による生殖細胞の直接死誘導と 2, 5-hexanedione 等によるセルトリ細胞障害を介した間接死誘導の制御機構が全く異なることは最近 Lee et al.(1999)が明らかにしている。

6. 環境変異原研究との接点

動物個体丸ごと処理で、生殖細胞変異原性を発揮する物質は体細胞でも変異原性効果を示す(藤川, 1989)。この経験則に拠れば、ダイオキシンが継世代毒性を有する可能性はきわめて低い。実際、マウス生殖細胞で DNA 損傷を誘発しなかった(Table 2)。精巣毒性に関しても、前章で述べたように、ダイオキシンが変異原として振る舞っている証拠はない。しかし、野村ら(1999)の研究で得られたデータ(Table 2)をみると、こうした経験則や陰性結果から、ダイオキシンの継世代催奇性について安易に結論を下すわけにはいかない。この毒性に関する実験的検討は明瞭な結論が得られるまで続行されるべきであろう。なにしろ、問題の毒性はヒトですでに懸念されている。環境因子の遺伝的影響の研究にとっても、既存のテスト系で変異原性が認めにくい物質の継世代催奇性の実験的検討は、次の2つの理由からも意義がある。

まず第一に、継世代催奇性効果について調べられた物質が、少数の例外を除いて、既知変異原に限られている。そのため、メンデル遺伝性の突然変異を指標とする現行の試験系では検出できない、非コード領域 DNA の構造

変化や遺伝子の脱メチル化のようなエピジェネティック変化も継世代催奇性の原因として考える余地が残されている。

第二に、精子生産に支障をきたすほど傷害をうけた精巣で、遺伝的に正常な精子が、正常精巣におけるのと同じように、生産されるかどうかについて、我々は全く無知である。正常精巣の生殖細胞系列には、自然発生した遺伝子突然変異を淘汰して、次代に伝わる変異の数を低く抑える機構が備わっている(Walter et al., 1998)。あるタイプの染色体異常に対しては、それを担う細胞を還元分裂前に全減させる機構が備わっている(Odorisio et al., 1998)。これらの変異淘汰機構と DNA 修復機能が、萎縮した精巣でも正常に作動しているかどうかを実験的にはっきりさせることは、ダイオキシンの限らず、生殖器系への障害作用が懸念されている内分泌攪乱物質の継世代毒性を考える場合、貴重な情報をもたらす。

結 語

ダイオキシンの継世代催奇性はヒトでも実験動物でもいまだにはっきりしていない。さらなる動物実験の積み重ねが必要である。しかし、ダイオキシンが生殖細胞に対して直接的な DNA 毒性を示さないことがわかった意義は大きい。この新知見は、ダイオキシンの継世代影響が、例えあるとしても、その有効暴露量には閾値があることを教える。

Neubert(1997/98)は最近の総説を次のような言葉で結んでいる。「蔓延しているダイオキシン恐怖症も有害な健康影響を引き起こす一因として決して無視してはいけない」。ダイオキシン恐怖症を克服するためにも、実験データの積み重ねが求められている。

謝 辞

公開シンポジウムでの発表にあたり、野村大成、井上雅雄、上口勇次郎の各先生から未発表資料を貸して頂い

た。本稿の作成にあたっては、文献収集で長尾哲二博士に助けて頂いた。記して深謝する。

参 考 文 献

- Alsharif, N. Z., W. J. Schlueter and S. J. Stohs (1994) Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat peritoneal lavage cells, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 26, 392-397.
Birnbbaum, L. S.(1991) Developmental toxicity of TCDD and related compounds : Species sensitivities and differences, In : Biological Basis for Risk Assessment of Dioxins and Related Compounds (Banbury Report 35), CSH Press, Cold Spring Harbor, New York pp. 51-67.
Cadbury, D.(1997) The Feminization of Nature, Penguin Books, Middlesex.
Centers for Disease Control Vietnam Experience Study (1988) Health status of Vietnam veterans III. Reproductive outcomes and child health, JAMA, 259, 2715-2719.
Chahoud, I., R. Krowke, G. Bochert, B. Bürkle and D. Neubert (1991) Reproductive toxicity and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 2. Problem of paternally-mediated abnormalities in the progeny of rat, Arch. Toxicol., 65, 27-31.
Constable, J. D. and M. Hatch (1985) Reproductive effects of herbicide exposure in Vietnam : Recent studies by the Vietnamese and others, Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 5, 231-250.
El-Sabeawy, F., S. Wang, J. Overstreet, M. Miller, B. Lasley and E. Enan (1998) Treatment of rats during pubertal development with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters both signaling kinase activities and epidermal growth factor receptor binding in the testis and the motility and acrosomal reaction of sperm, Toxicol. Appl. Pharm., 150, 427-442.
Erickson, J. D., J. Mulinare, P. W. McClain, T. G. Fitch, L. M. James, A. B. McClearn and M. J. Adams (1984) Vietnam veterans' risks for fathering babies with birth defects, JAMA, 252, 903-912.
Fahrig, R.(1993) Genetic effects of dioxins in the spot test with mice, Environ. Health. Perspect., 101 (Suppl. 3), 257-261.
Fritz, I. B.(1990) Cell-cell interactions in the testis : a guide for the perplexed, In : Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis (Banbury Report 34), CSH Press, Cold Spring Harbor, New York pp. 19-34.
藤川和男(1989)子孫に伝わる突然変異と伝わらない突然変異 : ショウジョウバエによる研究, 環境変異原研究, 11, 1-11.
IARC (1997) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 69, Polychlorinated Dibenzopara-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans, IARC, Lyon.
Ikushima, T., S. Imai and Y. Ishi (1996) Induction of sister chromatid exchanges by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in cultured mammalian cells, Environ. Mutagen. Res., 18, 161-163.
井上雅雄, 栗原孝行, 上田忠司, 野村大成(1999)ダイオキシンのマウス生殖細胞への影響, 環境変異原研究, 21 : 197-200.
Institute of Medicine (1996) Veterans and Agent Orange, Update 1996, National Academy Press, New York.

Johnson, L., R. Dickerson, S. Safe, C. Nyberg, R. Lewis and T. H. Welsh (1992) Reduced Leydig cell volume and function in adult rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin without a significant effect on spermatogenesis, Toxicology, 76, 103-118.

- 上口勇次郎, 石井 裕(1999)ダイオキシンの遺伝的影響 : ヒト精子染色体に及ぼす影響の観点から, 環境変異原研究, 21 : 201-205.
Khera, K. S. and J. A. Ruddick (1973) Polychlorodibenzo-*p*-dioxins : perinatal effects and the dominant lethal test in Wistar rats, In : E. H. Blair (ed.), Chlorodioxins : Origin and Fate, Advances in Chemistry, Ser. 120, American Chemical Society, Washington, pp. 7-84.
Kondo, S.(1993) Health Effects of Low-level Radiation, Kinki Univ. Press, Osaka/Medical Physics Publ., Madison.
Lamb, J. C., J. A. Moore, T. A. Marks and J. K. Haseman (1981) Development and viability of offspring of male mice treated with chlorinated phenoxy acids and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, J. Toxicol. Environ. Health, 8, 835-844.
Lee, J., J. H. Richburg, E. B. Shipp, M. L. Meistrich and K. Boekelheide (1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell *versus* germ cell injury of the testis, Endocrinology, 140, 852-858.
Mably, T. A., D. L. Bjerke, R. W. Moore, A. Gendron-Fitzpatrick and R. E. Peterson (1992) *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability, Toxicol. Appl. Pharm., 114, 118-126.
Meyne, J., D. C. Allison, K. Bose, S. W. Jordan, P. F. Ridolpho and J. Smith (1985) Hepatotoxic doses of dioxin do not damage mouse bone marrow chromosomes, Mutat. Res., 157, 63-69.
Michalek, J. E., A. J. Rahe and C. A. Boyle (1998) Paternal dioxin, preterm birth, intrauterine growth retardation, and infant death, Epidemiology, 9, 161-167.
Nagao, T (1987) Frequency of congenital defects and dominant lethals in the offspring of male mice treated with methylnitrosourea, Mutat. Res., 177, 171-178.
Nagao, T. and K. Fujikawa (1998) Modified susceptibility to teratogenesis in the offspring of male mice exposed to mutagens, Cong. Anom., 38, 1-8.
Nagao, T., Y. Morita, Y. Ishizuka, A. Wada and M. Mizutani (1991) Induction of fetal malformations after treatment of mouse embryos with methylnitrosourea at the preimplantation stages, Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 11, 1-10.
Nagao, T., M. Sato, H. Marumo, T. Shibuya and K. Imai (1996) Testicular development and fertility of mice treated prenatally with *N*-nitro-*N'*-ethylurea at various gestational stages, Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 16, 183-198.
Nagayama, J., M. Nagayama, T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda and Y. Masuda (1994) Effects of highly toxic organochlorine compounds retained in human body on induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes, Chemosphere, 29, 2349-2354.
Neubert, D.(1997/98) Reflections on the assessment of the toxicity of "dioxins" for humans, using data from experimental and epidemiological studies, Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 17, 157-215.

- Nomura, T. (1975) Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethane treatment, *Cancer Res.*, 35, 264-266.
- Nomura, T. (1982) Parental exposure to X-rays and chemicals induces heritable tumors and anomalies in mice, *Nature*, 296, 575-577.
- Nomura, T., H. Gotoh and T. Namba (1990) An examination of respiratory distress and chromosomal abnormalities in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea, *Mutat. Res.*, 229, 115-122.
- 野村大成, 中島裕夫, 李利亜, 福留優子, R. Baskar, 梁 治子, 具在妍, 森景子 (1999) タイオキシンの遺伝的影響の問題点—継世代的影響について—, *環境変異原研究*, 21, 207-211.
- Odorisio, T., T. A. Rodriguez, E. P. Evans, A. R. Clark and P. S. Burgoyne (1998) The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis, *Nature Genet.*, 18, 257-261.
- Park, J. K., M. K. Shigenaga and B. N. Ames (1996) Induction of cytochrome P4501A₁ by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or indol (3,2-b) carbazole is associated with oxidative damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2322-2327.
- Poland, A. and E. Glover (1979) An estimation of the maximum *in vivo* covalent binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to rat liver protein, ribosomal RNA, and DNA, *Cancer Res.*, 39, 3341-3344.
- Randerath, K., K. L. Putman, E. Randerath, G. Mason, M. Kelley and S. Safe (1988) Organ-specific effects of long term feeding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on I-compounds in hepatic and renal DNA of female Sprague-Dawley rats, *Carcinogenesis*, 9, 2285-2289.
- Schiestl, r. H., J. Aubrecht, W. Y. Yap, S. Kandikonda and S. Sidhom (1997) Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced intrachromosomal recombination *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, 57, 4378-4383.

- Stahl, B. U., A. Kettrup and K. Rozman (1992) Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-*p*-dioxins (CDDs) and their mixture. Part. I: Acute toxicity and toxic equivalent factors (TEFs). *Arch. Toxicol.*, 66, 471-477.
- Sterling, T. D. and A. Arundel (1986) Review of recent Vietnamese studies on the carcinogenic and teratogenic effects of phenoxy herbicide exposure, *Int. J. Health Serv.*, 16, 265-278.
- Tritscher, A. M., A. M. Seacat, J. D. Yager, J. D. Groopman, B. D. Miller, D. Bell, T. R. Sutter and G. W. Lucier (1996) Increased oxidative DNA damage in livers of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treated intact but not ovariectomized rats, *Cancer Lett.*, 98, 219-225.
- Wahba, Z. Z., T. W. Lawsson, W. J. Murray and S. J. Stohs (1989) Factors influencing the induction of DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), *Toxicology*, 58, 57-69.
- Walter, C. A., G. W. Intano, J. R. McCarry, C. A. MyMahan and R. B. Walter (1998) Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10015-10019.
- Wolfe, W. H., J. E. Michalek, J. C. Miner, A. J. Rahe, C. A. Moore, L. L. Needham and D. G. Patterson, Jr. (1994) Paternal serum dioxin and reproductive outcomes among veterans of operation Ranch Hand, *Epidemiology*, 6, 17-22.
- Zimmering, S., J. M. Mason, R. Valencia and R. C. Woodruff (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila* II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program, *Environ. Mutagen.*, 7, 87-100.

Environ. Mutagen Res., 21: 281-285 (1999)

シンポジウム

本稿は1999年5月28日、東京の日本薬学会 長井記念館で開催された日本環境変異原学会主催の第10回公開シンポジウム「内分泌攪乱物質の作用機序と後世代影響—環境変異原研究との接点—」(企画: 菊川清見, 渋谷 徹, 藤川和男)で発表された(座長: 菊川清見)

内分泌攪乱化学物質がもたらす遺伝的不安定性 —組換え型遺伝子突然変異について—

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Genomic instability induced by endocrine disruptor chemicals

Masamitsu Honma

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Endocrine disruptor chemicals (EDCs) such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) have become significant environmental pollutants from industrial processes. They can affect hormonal receptors agonistically or antagonistically and can disrupt endocrine systems, leading to disorders including sexual organ aplasia, spermatogenic and oogenic hypoplasia, genital cancers, and others. Although most EDCs yielded a negative response in most short-term genotoxicity assays including the Ames (*Salmonella*) test, some induced genomic instability by elevating the frequency of recombination. Thus, EDCs do not seem to act as classical genotoxins. We briefly review here the recombinogenic activity of EDCs and its association with carcinogenesis, and suggest a need for systematic methods to screen, rank, and identify the genotoxicity of EDCs.

(This paper, chaired by Kiyomi Kikukawa, was presented to the 10th JEMS Annual Symposium, "Endocrine Disruptor Mechanism and Posterity Effects-Concern with Environmental Mutagen Research", organized by Kiyomi Kikukawa, Tohru Shibuya, and Kazuo Fujikawa, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at The Pharmaceutical Society of Japan, Nagai Memorial Hall, May 28, 1999.)

Keywords: endocrine disruptor chemicals (EDCs), recombination, thymidine kinase (*tk*) gene mutation, mouse lymphoma assay (MLA), promotion

緒 言

環境中に存在したり、われわれの日常生活で容易に接触し、摂取する可能性がある汚染物質として、内分泌攪乱化学物質(EDCs)への関心が高まっている。EDCsの持つ生物学的影響に関しては、野生動物における生殖系の形成異常とEDCsの暴露との相関性から、生態系やヒトの健康に影響を与える怖れがあると警告されている。また、最近の生化学的研究からこれらEDCsは各種ホル

モンレセプターにアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し、各種内分泌系の正常な働きを狂わせ個体レベルの障害に発展させる可能性が指摘されている。それは例えば、発生における生殖器官形成の障害、精子または卵子の形成異常、子宮内膜症、乳癌、その他の生殖系の癌、脳神経系および行動の障害などである。このように現在、生殖器官や内分泌器官、またはそれら器官に由来する細胞を用いた研究から、EDCsの持つ生理学的作用に関するデータは蓄積されつつある。一方、生殖器官に対する影響は、生殖細胞遺伝子への影響が懸念されるにもかかわらず、EDCsの遺伝的影響についてはほとんど理解されていない。また、EDCsのいくつかは発ガン性や

受付: 1999年7月16日 受理: 1999年8月27日
©日本環境変異原学会

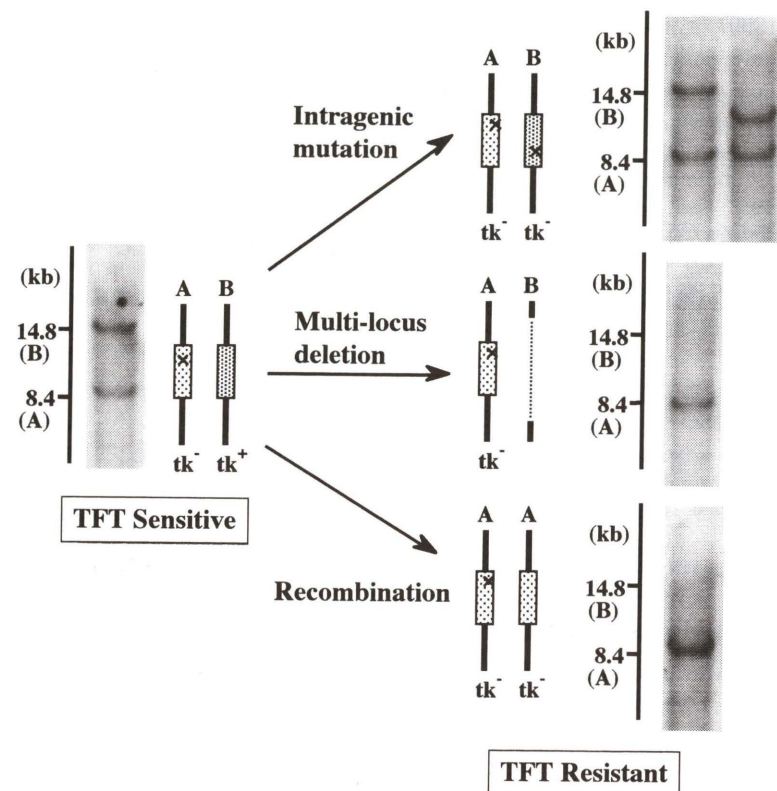


Fig. 1 A model of mechanism of mutation at the heterozygous *tk* locus in TK6 cells and typical results of Southern analysis performed with a human *tk* cDNA probe. The Southern-hybridization provided 14.8-kb (B) and 8.4-kb (A) allelic pair bands corresponding to the functional and nonfunctional *tk* allele, respectively.

催奇形性を持つ可能性が指摘されているが、既存の遺伝毒性試験では遺伝子に対する直接の作用は検出できないため体細胞遺伝子に対する影響についても不明な点が多い。

最近、放射線やいくつかの化学物質に関しては、遺伝子 DNA に直接損傷を与えず、細胞内のホメオスタシスを乱し、遺伝的不安定性を誘発している可能性が指摘されている。DNA の複製、修復、組換え、染色体の分配、再構築等の機構に外来性因子が何らかの影響を与えれば直接 DNA に損傷を与えなくとも遺伝子や染色体に異常をもたらす可能性がある。この中でも我々は染色体上で起こる相同組換え、非同源組換え機構に注目している。ほ乳類細胞における組換え機構に関してはいまだ不明な点が多いが、ヒト癌や遺伝性疾患での遺伝子解析の研究から、組換え機構および、その異常が、これら疾患の原因の一部を担っていることは明らかとなっている。また、組換え反応の一部は染色体構造の変化や、通常の遺伝子突然変異を伴わないことがあり、従来考えられている遺伝子突然変異の概念と性質を異にする。本稿では、主に染色体間相同組換え反応を検出する常染色体遺伝マーカーを用いた劣性型遺伝子突然変異検出系の特徴と、環境変異原研究や癌研究におけるその重要性を解説し、EDCs 等の非 DNA 損傷性変異原物質のもたらす突然変異誘発機構について、これまでの我々の知見を基に紹介する。

1. チミジンキナーゼ(*tk*)遺伝子を利用した遺伝子突然変異検出系と、組換え型遺伝子突然変異

核酸代謝酵素である thymidine kinase の遺伝子(*tk*)に突然変異を持つ細胞は trifluorothymidine(TFT)抵抗性となるため、hypoxanthine phosphoribosyl transferase(*hprt*)遺伝子と同様に薬剤耐性を指標した遺伝子突然変異系として利用することができる。ただし、*tk* 遺伝子は常染色体性であるため、現実的にはヘテロの状態が存在し、ターゲットとなる活性型アリルが 1 コピーとなった細胞を用いる必要がある (Fig. 1)。現在、この *tk* 遺伝子突然変異を検出できる系としてはヒトリンパ芽球細胞 TK 6 と (*tk* は 17 番染色体長腕に存在)、マウスリンパ腫 L 5178 Y 細胞 (*tk* は 11 番染色体に存在)を用いた系が確立されている (Liber et al., 1989; Clive and Spector, 1975)。特に後者の系はマウスリンフォーマ試験 (Mouse Lymphoma Assay, MLA) といわれ、最近、医薬品安全性試験のための国際的ガイドライン (ICH) において遺伝毒性試験の一つとして採用が認められた (ICH 4, 1997)。

これら遺伝子突然変異検出系の特徴の 1 つに、従来の *hprt* や ATPase 遺伝子の突然変異検出系と異なり、点突然変異等の小さな DNA 変異だけでなく、染色体レベルにおよぶ大きな欠失型の変異までも検出できることが挙げられる。理論的には *tk* 遺伝子内の数ベース程度の

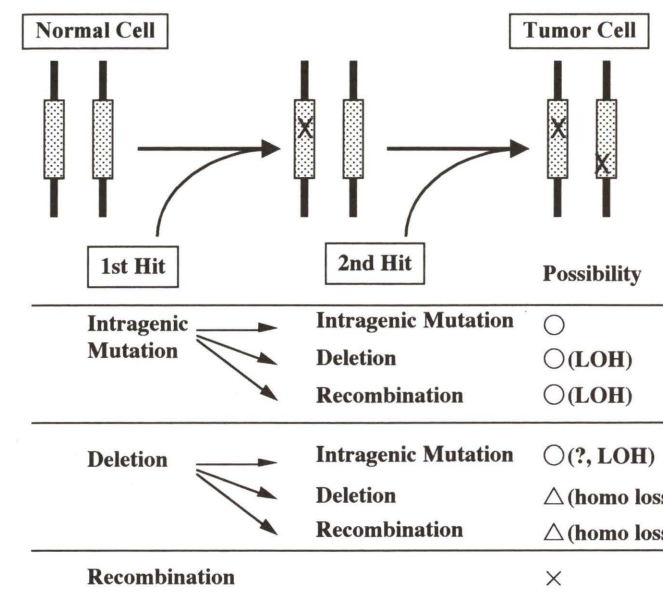


Fig. 2 A two-hits model for a tumor suppressor gene

欠失から染色体 1 本丸ごと (>100 Mb) の消失まで検出可能であり、このため従来のエームス試験で検出される mutagen と、染色体異常試験で検出される clastogen の両者をカバーする広域スペクトルを有する試験系とされている。もう一つの特徴としては、常染色体性であるため相同の *tk* アリル間で組換えがおこり、活性型 *tk* アリルがホモとなった変異体も検出することができることである。これが組換え型変異体である (Fig. 1)。このような欠失型、組換え型変異体は *tk* 近傍に存在する多型性マーカーを用いることにより、異形接合性消失 (loss of heterozygosity, LOH) として検出することができる (Yandell et al., 1986; Li et al., 1992)。Fig. 1 に TK 6 細胞の *tk* 遺伝子近傍に存在する *SacI* 部位の多型性を利用した TK 変異体の解析例を示す。活性型アリルの相当する 14.8 kb のバンドの消失により LOH を検出でき、残った不活性型アリルに相当する 8.4 kb のバンドの濃さ (コピー数) から欠失が組換えかを判定できる。すなわち欠失の場合はヘミ型 LOH であり、組換えの場合はホモ型 LOH となる。LOH は p 53 や Rb などの癌抑制遺伝子高頻度で観察される変異の一つであり、その多くは単純に遺伝子の欠失によるものと信じられてきた。しかしながら、多くのヒト癌組織における遺伝子解析により、広範な染色体領域で LOH がおきても、染色体に構造変化はみられないことや、Fig. 1 で示したようなホモ型 LOH が高頻度に観察されることから、LOH のかなりの部分は組換えに由来することが明らかとなっている (Lasko and Cavenee, 1991)。事実、TK 6 細胞で観察される *tk* 遺伝子の突然変異の 50% は組換え型 LOH である (Honma et al., 1997 a)。このように染色体間の組換え反応はヒト癌化過程における重要な遺伝子変化の一つでありながら、その実体についてはほとんど明らかに

されていない。我々は、この *tk* 遺伝子での突然変異検出系を利用し、組換え機構、組換えを制御する内的因子、および組換えを誘発もしくは抑制する外的因子などの研究を行っている (Honma et al., 1997 b)。

tk 遺伝子に生じる突然変異は、癌抑制遺伝子で生じる劣性型の突然変異のモデルと考えられる。一般に癌抑制遺伝子は、2 つの突然変異がそれぞれの対立遺伝子に生じる 2 段階ヒット説によって癌化を導くことが知られている。ヘテロの *tk* 遺伝子の不活性アリルにあらかじめ存在する変異は第 1 ヒットに相当するため、本系は第 2 ヒットを検出する系ということが出来る。その第 2 ヒットとして点突然変異と、欠失、組換えによる LOH 型突然変異が起こりうる。一方、第 1 ヒットの方に注目すると、同様に点突然変異と、欠失は第 1 ヒットになりえても、組換えは第 1 ヒットとして突然変異を誘発しないことが理解される (Fig. 2)。正常な遺伝子同士での相同組換えは何ら変異をもたらさないためである。言い換えれば、ここでの組換えは最初に第 1 ヒットとして点突然変異がなければ、がん化を導くような変異にはつながらないことを意味する。これは、化学発がんにおける 2 段階発がん過程のセオリーに似ている。イニシエーターとして最初に点突然変異があり、そしてプロモーターとして相同組換えが、その変異をホモ化することにより 2 つのヒットを成立させる。相同組換えそのものは変異をもたらさないが、イニシエーションとしての最初の変異を増幅させるという点で、これは一種のプロモーション作用と考えることができる。したがって、通常の遺伝毒性試験において陰性を示す化合物であっても *tk* を用いた突然変異試験において陽性を示した場合、その化合物は組換え型の突然変異を優先的に引き起こすということは充分に考えられる。このような化合物は遺伝子攪乱物質といえ

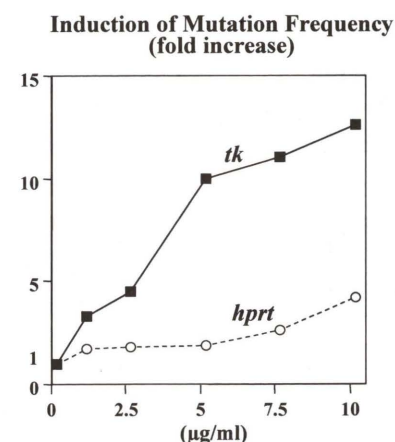


Fig. 3 Induced mutation frequencies at the *tk* and *hprt* loci in human TK6 cells treated with 1.0-10 μ g/ml TPA.

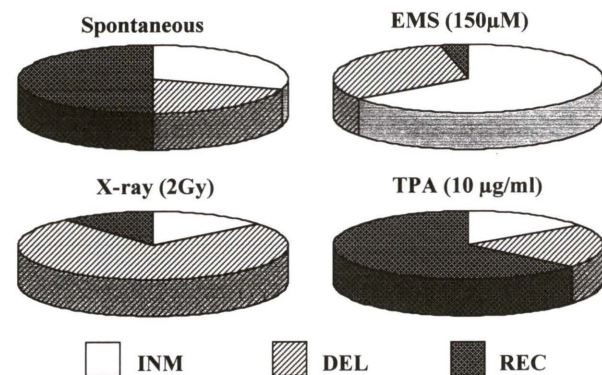


Fig. 4 Spectra of spontaneous, X-ray (2 Gy), EMS (150 μ M), and TPA (10 μ g/ml)-induced mutations at the *tk* locus in TK6 cells. INM: intragenic mutations, including point mutations, small deletion, and small insertions; DEL: large deletion (hemizygous LOH); REC: recombination (homozygous LOH).

るかもしれない。

2. 染色体間組換え反応に対する発がんプロモーターおよびEDCsの作用

tk 遺伝子突然変異検出系の一つであるヒトリンパ芽球細胞株 TK 6 を利用して、代表的な発がんプロモーターである TPA の組換え活性を検討した (Honma and Little, 1995). TPA についてはこれまで、遺伝子突然変異陰性、染色体異常陽性、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange, SCE) 陽性と、遺伝毒性については不明な点が多かった。Fig. 3 は TPA による突然変異誘発性を *hprt* 遺伝子、*tk* 遺伝子の両方で比較したものである。*tk* の突然変異が用量依存的に誘発されるのに対して *hprt* の突然変異の誘発は顕著ではなかった。このことは TPA が LOH 型の突然変異を優先的に誘発することを予想させる。Fig. 4 に TK 変異体をサザン法によって解析した突然変異のスペクトルを示す。自然誘発の変異体ではその約 30% が点突然変異、20% が欠失型 LOH、残り 50% が組換え型 LOH を示したのに対して、典型的な変異原である EMS は点突然変異を、X 線は欠失型 LOH を主として引き起こした。これらは EMS によるアルキル化作用、X 線の持つ 2 本鎖切断作用を反映しているものと考えられる。一方、TPA はこれら変異原とは対照的に組換え型 LOH を優先的に誘発した。このことから、TPA が組換え反応を誘発すること、その組換え作用がプロモーション作用の一つとしてがん化に関与している可能性が示された。

EDCs とされているいくつかの化合物についても、*tk* 遺伝子を利用した遺伝子突然変異試験のひとつである MLA を用いて遺伝子突然変異の誘発性を検討した。ここでは、MLA の国際共同研究の中で行った 3 つの EDCs, diethylstilbestrol (DES), bisphenol A, zear-

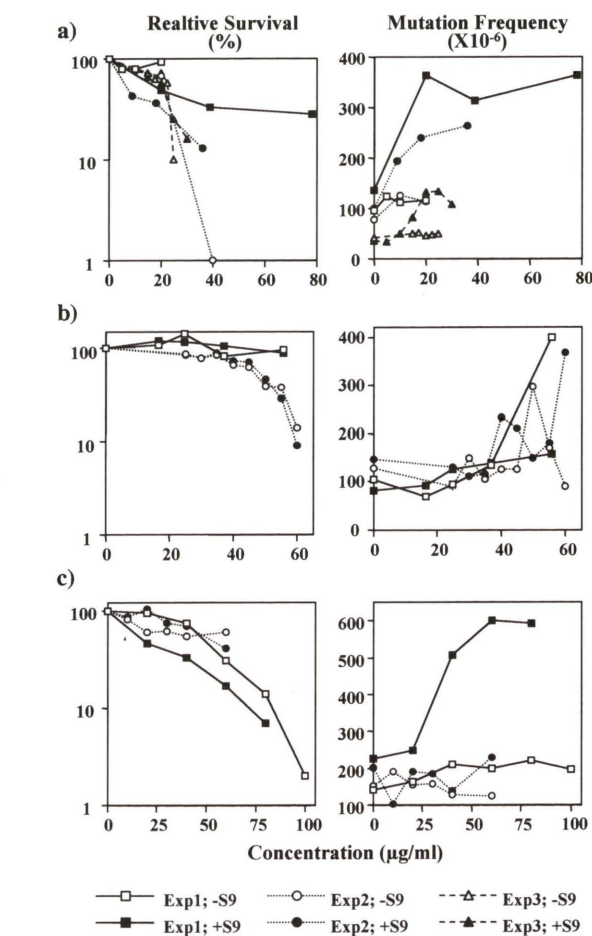


Fig. 5 Relative survival and mutation frequencies in the MLA after a 3 h treatment of each chemical. Each chemical was tested by 2 or 3 laboratories (Exp. 1, 2, 3). Open and closed symbols are from experiments without and with S9 mix, respectively.

alenone の結果を示す (Honma et al., 1999 a; 1999 b). これら化合物はすべてエームス試験陰性、染色体異常試験に関しても陰性、もしくは弱い陽性反応を示すのみで遺伝毒性に関してはいまだはっきりと結論が出ていない。3 種類の化合物の細胞毒性 (Relative survival), 突然変異頻度 (Mutation frequency) を Fig. 5 に示す。

DES のみ S9 存在下で再現性のよい突然変異誘発性を示したのに対して、bisphenol A, zearalenone に関しては増加傾向がみられるものの、再現性が得られなかった。現在、この 2 つの EDCs に関しては再試験を実施している。

EDCs の遺伝的影響については不明な点が多く、必ずしもすべての EDCs が組換え反応を誘発するとは限らない。また、EDCs の持つ発がん作用にどれほどこの組換え反応が関与しているかについても今後の多くの研究が必要とされる。しかしながら、現存する遺伝毒性試験の中で最も突然変異スペクトルが広く、感度のよい MLA 試験のデータを蓄積しながら、EDCs の遺伝的影響につ

いてそのメカニズムを追求することは、EDCs の遺伝的リスクを考慮するうえでも重要と考えられる。

結 語

EDCs による遺伝的影響に関しては、ハーバード大学の Schiestl らが polychlorinated biphenyl (PCB) や 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) が染色体間の組換え頻度を上昇させることにより染色体欠失等の異常を引き起こすことを、酵母、ヒト培養細胞、マウス受精細胞を用いた実験で証明している (Schiestl et al., 1997). これまで TCDD の発ガン性に関してはホルモンまたは Ah レセプターを介した非遺伝的な影響によるものと考えられてきたが、これらの事実は EDCs がホルモンレセプター非依存的に遺伝的影響を与える可能性を示している。また、EDCs の持つ遺伝子への影響はそれほど大きくないにせよ、他の環境変異原との相互作用により、お互いの効果を増強、減弱させる可能性もある。最近、ビクトリア大学 (カナダ) の Glickman らのグループは、きわめて発ガン性の高い aflatoxin B 1 のマウスにおける遺伝子突然変異誘発を TCDD が顕著に抑制することを報告している (Thornton et al., 1999). TCDD が薬物代謝酵素を誘発し、aflatoxin B 1 の作用をすみやかに解毒するためと考えられるが、環境変異原の種類によっては逆に毒性を高める作用もあることも考えられ、EDCs の持つ複雑な遺伝的影響を伺い知ることができる。

このような事実から EDCs の遺伝的影響を系統的に解明することは重要と考えられる。種々の生物種の生殖細胞および体細胞を実験材料とし、EDCs 等によって誘発される DNA 傷害、突然変異、染色体異常、形質転換能、細胞死、催奇形性、および発がん性と関係する広範な遺伝的影響を検出する系を構築し、現在、EDCs と考えられている多くの化学物質の影響を検討する必要性を強く感じる。さらに、これらの作用を分子生物学的・細胞遺伝学的手法により解析することにより、EDCs の持つ遺伝子攪乱機構を解明し、そこで得られた知見から EDCs による遺伝病や発がんに対するリスク評価に役立てるべきである。今後、環境変異原学会においてもこれら問題に積極的に取り組み、行政もその研究の重要性を認識し、研究に対して強いバックアップをすることを期待する。

参考文献

- Clive, D. and J. F. S. Spector (1975) Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the *tk* locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.*, 31, 17-29.
- Honma, M. and J. B. Little (1995) Recombinagenic activity of

- the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human lymphoblastoid cells, *Carcinogenesis*, 16, 1717-1722.
- Honma, M., M. Hayashi and T. Sofuni (1997a) Cytotoxic and mutagenic responses to X-ray and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mutat. Res.*, 374, 89-98.
- Honma, M., L.-S. Zhang, M. Hayashi, K. Takeshita, Y. Nakagawa, N. Tanaka and T. Sofuni (1997b) Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4774-4781.
- Honma, M., M. Hayashi, H. Shimada, N. Tanaka, S. Wakuri, T. Awogi, K. I. Yamamoto, N.-U. Kodani, Y. Nishi, M. Nakadate and T. Sofuni (1999a) Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test, *Mutagenesis*, 14, 5-22.
- Honma, M., L.-S. Zhang, H. Sakamoto, M. Ozaki, K. Takeshita, M. Momose, M. Hayashi and T. Sofuni (1999b) The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay, *Mutagenesis*, 14, 23-29.
- ICH4 (1997) Technical workshop III: Non-clinical safety testing for new medical products, Session 1: Genotoxicity. In D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G. (eds.), *Proceedings of the fourth international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, Brussels, 1997. The Queen's University, Belfast, pp. 236-261.
- Lasko, D., and W. Cavenee (1991) Loss of constitutional heterozygosity in human cancer, *Ann. Rev. Genet.*, 25, 281-314.
- Li, C.-Y., D. W. Yandell, and J. B. Little (1992) Molecular mechanism of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells *in vitro*, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18, 77-87.
- Liber, H. L., D. W. Yandell, and J. B. Little (1989) A comparison of mutation induction at the *tk* and *hprt* loci in human lymphoblastoid cells; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal *tk* locus, *Mutat. Res.* 216, 9-17.
- Schiestl, R.H., J. Aubrecht, W. Y. Yap, S. Kandikonda and S. Sidhom (1997) Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induce intrachromosomal recombination *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, 57, 4378-4383.
- Thornton, A.S., Y. Oda, G. R. Stuart, J. Holcroft, J. G. de Boer and B. W. Glickman (1999) Protective effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female, but not male big blue transgenic rats treated with aflatoxin B1, *Environ. Mol. Mutagen.* 33 (suppl. 30), 63.
- Yandell, D. W., T. P. Dryja and J. B. Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 12, 255-263.

本稿は1999年5月28日、東京の日本薬学会 長井記念館で開催された日本環境変異原学会主催の第10回公開シンポジウム「内分泌攪乱物質の作用機序と後世代影響—環境変異原研究との接点—」(企画：菊川清見, 渋谷 徹, 藤川和男)で発表された(座長：藤川和男)

内分泌攪乱物質と生殖機能

堤 治^{1,2}

¹ 東京大学医学部分院産科婦人科 〒112-8688 東京都文京区目白台 3-28-6

² 科学技術財団 CREST

Endocrine disruptor and reproductive function

Osamu Tsutsumi^{1,2}

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Branch Hospital, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8688

² CREST, Japan Science and Technology, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

Summary

Endocrine disruptors are resistant to degradation and are ubiquitous environmental pollutants that become concentrated in animal tissues, climb the food chain, accumulate in adipose tissue and are excreted in breast milk in large amounts. Examination of human follicular fluid revealed the presence of polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) at concentrations of approximately 1 pg/ml (0.01 pg TEQ/ml). To study their possible action, two-cell mouse embryos were cultured in the presence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), the most toxic congener, at concentrations between 0.5 and 100 pM and evaluated at 24-h intervals for their development to the eight-cell and blastocyst stages. TCDD at 1, 2, and 5 pM significantly reduced the percentage of embryos reaching the eight-cell stage. However, blastocyst formation of the surviving eight-cell embryos was accelerated, with the number of cells in the blastocysts increased in a dose-dependent manner. Findings suggest that PCDDs and PCDFs may be present in human reproductive fluid and may exert some stage-specific effects on early embryonic development. Recent limited evidence has suggested a link between TCDD exposure and endometriosis. We examined the presence of messenger RNAs of AhR, Arnt, CYP1B1 and p62(dok) in the endometrium and compared their amounts in cases of endometriosis versus nonendometriosis in order to gain insight into the possible involvement of TCDD in the pathogenesis of endometriosis, using semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (RT-PCR). The expression of AhR and dioxin-related genes in the endometrium did not differ in women with or without endometriosis which does not provide clear cut evidence for a role of TCDD in the pathogenesis of endometriosis. In addition, we found that breast feeding does not seem to increase the potential for developing endometriosis which suggests that any dioxin that may be introduced into the body through breast feeding does not harm, at least in the endometrium. However, the amount of pollutants in food and milk should be closely monitored and the release or dumping of dioxin-containing waste should be minimized as much as possible.

(This paper, chaired by Kazuo Fujikawa, was presented to the 10th JEMS Annual Symposium, "Endocrine Disruptor Mechanism and Posterity Effects-Concern with Environmental Mutagen Research", organized by Kiyomi Kikukawa, Tohru Shibuya, and Kazuo Fujikawa, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at The Pharmaceutical Society of Japan, Nagai Memorial Hall, May 28, 1999.)

Keywords : dioxin, endometriosis, embryo development, estrogen receptor, Ah receptor

受付：1999年9月8日 受理：1999年9月27日

©日本環境変異原学会

結 言

内分泌攪乱物質は生体内の正常なホルモン作用を攪乱し、野生動物では生殖異常の原因とされる(Colborn et al., 1996; 堤, 1999)。実験動物においても継代的生殖機能への影響や、子宮内膜症との関連が示唆されている。ヒトの生殖機能も内分泌攪乱物質に敏感と予測され、昨今問題になっている人類の精子数減少や子宮内膜症の増加が内分泌攪乱物質による可能性が論じられている。しかし内分泌攪乱物質のヒトの体内負荷量と不妊症や子宮内膜症等を含めた生殖機能に及ぼす影響は明らかではないのが現状である。我々は内分泌攪乱物質のヒトへの汚染の程度を疾患との関連で評価し、量-反応関係を明らかにすることが急務であると考えている。ここではヒト生殖器官への汚染の例として卵胞液中のダイオキシンの検出成績を述べる。また着床前初期胚発育を低レベルのダイオキシン汚染評価法として用いたところ興味深い成績を得たので報告する。さらに初期胚におけるエストロゲン受容体発現様式等最新の分子レベルの解析成績についても紹介することにする。

1. ダイオキシンの生殖器官への汚染

ダイオキシンの1日耐容量としては、従来厚生省が10 pg/kg 体重と設定していたが、98年にはWHOが1ないし4 pg/kgを提唱した。それを受け本邦でも今99年7月に新基準として4 pg/kg/dayが設定された。日本人の平均的ダイオキシン摂取量は2-3 pg/kgとされており、人体への汚染は避けられない問題になっている。我々は生殖器官へのダイオキシン汚染を評価するために、ヒト卵胞液中のダイオキシンの検出をガスクロマトグラフィーマスマスベクトロメトリー(GC・MS)法により試みた(Tsutsumi et al., 1998)。

体外受精は不妊症の治療として定着し、国内でも年間5万件以上を数えている。通常卵子を得るために経腔的に卵胞を穿刺して卵胞液を吸引する。その際の卵胞液を患者の同意を得たうえで試料とした。抽出操作後GC・MS法により各種ダイオキシン類すなわち polychlorinated dibenzo-dioxin (PCDD) および polychlorinated dibenzo-furan (PCDF) を検出定量した。その結果、多数種のPCDD および PCDF の異性体が検出され、内部標準試薬により定量した。

ダイオキシン類(各種PCDD および PCDF)の合計濃度は約1 pg/mlであった。これらのダイオキシン類はそれぞれの相対毒性(toxic equivalency factor: TEF)で評価され、通常最も毒性の高い2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)の毒性に換算して表される(Couture et al., 1990)。卵胞液中のダイオキシン類は0.01 pg TEQ/mlであった。これはモル濃度に換算すると0.031 pMとなる。

この成績からダイオキシンの汚染は生殖器官にも及ぶ

ことが示されたが、この濃度は血液中より低く、卵胞中への特異的蓄積はないと考えられる。しかしながら卵子は卵胞液中で発育し、ダイオキシン汚染の影響を直接受けるともいえる。したがってヒトにおいてダイオキシン汚染が進むことは当然卵子の汚染程度が高くなることを意味し、一定限度以上となった時は受精障害、不妊、流産、胎児異常等の原因となりうるものが危惧される。その限界がどこに引かれるかは後に考察することにするが、いずれにしてもダイオキシン汚染を現在以上に拡大しないよう努力すべきであることは明白であろう。

Jarrellら(1993)はカナダの3つの都市で得られた体外受精時の卵胞液中各種内分泌攪乱物質濃度を測定した。その結果、クロルデン、ジクロロクロロエチレン、オキシクロルデン、ヘキサクロロベンゼン、およびPCBの5つの有機塩化類を検出しその濃度を測定した。PCBの測定結果を血液中および卵胞液中の濃度を3つの地域別に示した。血液中と同程度に卵胞液中にもPCBは検出され両者間に相関を認める。そのレベルは低く卵胞液中濃度と受精率等体外受精成績との相関を認めなかった。興味深いことには、血液中と同様に卵胞液中濃度には地域による汚染レベルの差が確認された。ただし地域間では体外受精の成績には影響を認めなかった。この成績からも内分泌攪乱物質は卵胞液をも汚染するが、現状では卵のクオリティー等に影響を与えるには至っていないと推論できる。

2. ダイオキシンの胚発育への影響

胚発育は一般的に外因性物質の影響を受けやすい。我々はダイオキシンの胚発育への影響をマウス2細胞期胚を用いて検討した(Tsutsumi et al., 1998)。マウスの場合排卵誘発剤(PMS-hCG)を用いた過排卵処置を施すと同じ発育段階にある受精卵を多数個(一匹当たり20-30胚)を得ることができる。そこで過排卵処置マウスを交配後、2細胞期胚を卵管より回収して実験に供した。胚は95%空気、5%CO₂、37℃のもとで、TCDDを各種濃度(0.5-100 pM)添加した培養液中で発育させ、24時間後の8細胞期胚、48時間後の胚盤胞形成率を得た。また胚盤胞に達したもののについては核染色を施したうえで構成する細胞数を算定した。

2細胞期の8細胞期への発育率は無添加対照群では約50%であったが、TCDDを1-5 pM添加した時、発育率は無添加対照群に比べて、有意に抑制された(Fig.1, ○)。この作用は10-100 pMでは消失し、むしろ対照群より高い値を示した。これよりTCDDは低濃度では2細胞期から8細胞期への胚発育に抑制的に作用することが示された。通常2細胞期から8細胞期の胚発育を抑制する物質は胚盤胞への発育をさらに抑制する。ところが2細胞期胚から胚盤胞への発育率では1-5 pMで観察された抑制効果は認められなかった(Fig.1, ●)。そこで、

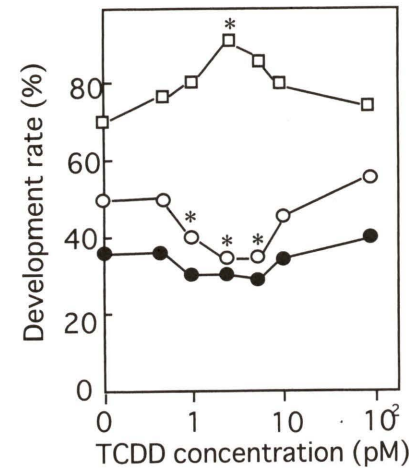


Fig. 1 Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the development of 2-cell mouse embryos.

Two-cell embryos were cultured in the presence of the indicated concentrations of TCDD and evaluated at 24 h intervals for their development to 8-cell embryos (○) and blastocysts (●). Percentage of blastocysts developed from 8-cell embryos in the latter 24 h is also illustrated (□). * indicates $p < 0.01$, as compared with that of control embryos not exposed to TCDD. Results are the summation of eight independent analyses; each group consisted of 200-400 embryos.

8細胞期胚の胚盤胞への発育率をみるとFig.1の□で示すように、TCDDは胚盤胞形成に促進的に作用した。これよりTCDDの胚発育に対する作用は胚発育時期に特異的にかつ特定の濃度域で抑制的ないし促進的に作用することが示唆された。内分泌攪乱物質の作用は必ずしも用量反応性を示さず、いわゆる域値の概念がないこと(Daston, 1993)が特徴とされるが、ダイオキシンの初期胚に対する作用にも当てはまると考えられる。

初期胚は母体の卵管や子宮内を浮遊しつつ発育している。母体の卵管液、子宮腔液のダイオキシン等の内分泌攪乱物質汚染の直接的曝露を受けている。体外培養(*in vitro*)の実験は体内(*in vivo*)でおこっていることとの質的差異があることが指摘されるが、初期胚については*in vivo*の現象を*in vitro*で再現しているといえよう。また通常成体細胞を用いたTCDDの*in vitro*における作用域はナノモルレベルであることから、胚のTCDD感受性は高い。ダイオキシン汚染で最初に問題になるのが胚発育とも考えられる。

TCDDの胚発育への直接作用を胚盤胞の細胞数の面から検討した成績も興味深い。形態的にはTCDD添加による胚盤胞は対照群と同様でどちらも区別できかねたが、細胞数はTCDDの用量反応的に有意の増加を認めた(Fig.2)(Tsutsumi et al., 1998)。これよりダイオキシンは初期胚発育に直接作用を持つことが裏付けられ、少なくとも8細胞期以降の胚への低濃度での影響は単なる毒性ではなく、細胞の増殖や分化を促進することにあ

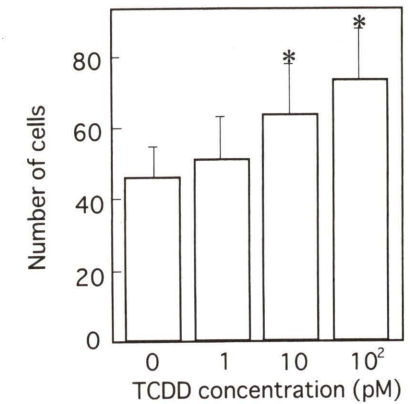


Fig. 2 Dose-response relation between concentration of 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and the number of cells in the blastocysts developed from 2-cell embryos *in vitro*. Results are expressed as a mean \pm SD.

* indicates $p < 0.01$, as compared with blastocysts not exposed to TCDD.

ると考えられた。

3. 胚作用の分子機構

TCDDの細胞の増殖や分化を促進作用としては、胎児の口蓋部におけるものが知られている(Abbott et al., 1990)。この作用は口蓋裂の発生に直接関与し、興味深いことに、ダイオキシンが胎盤を通過して、直接胎児自身のAhR (arylhydrocarbon receptor, ダイオキシンレセプター)(Schmidt et al., 1993)に作用するためと考えられている。その根拠としては、AhRのノックアウトマウスにおいてはTCDD投与によって口蓋裂が生じないこと(Mimura et al., 1997)が明らかにされている。

TCDDの初期胚発育への作用メカニズムは明らかではないが、AhRは初期胚にも検出されることから(Peters et al., 1995)、AhRの関与は示唆される。またTCDDはepidermal growth factor (EGF)のレセプターをダウンレギュレートすることが知られており(Madhukar et al., 1984)、TCDDの胚発育への制御機構にはEGF作用を介している可能性も考えられる。TCDDがEGF同様マウス新生仔期に眼瞼開裂や歯牙の発育を促すことも報告されている(Madhukar et al., 1984)。

ダイオキシン類はエストロゲンレセプターそのものに直接結合せず、先に述べた特異的レセプターであるAhRを有する。したがってダイオキシン類は、AhRと結合し、直接的ないしエストロゲン作用経路を攪乱し、内分泌攪乱物質としての性質を示すと考えられる。従来エストロゲンレセプター(ER)は単一と考えられていたが、ER β が発見同定されて既知のER α と2つの受容体が存在することが明らかになった。マウス初期胚にはAhRのみならず(Peters et al., 1995 b)、エストロゲンレセプター α と β のmRNAがともに発現していることをRT-

Table 1 ダイオキシン(TCDD)によるアカゲザル子宮内膜症の発症と重症化*

投与量	総計	子宮内膜症		進行期別			
		無	有	I	II	III	IV
0(対照群)	6	4(67%)	2(33%)	2	0	0	0
126pg/kg	7	2(29%)	5(71%)	2	0	2	1
630pg/kg	7	1(14%)	6(86%)	0	1	1	4

TCDDの投与により子宮内膜症の発症率および重症度が用量反応的に増加する。*Rierらによる(進行期はrAFS分類)

PCR法により最近明らかにした(Hiroi et al., 1999)。両者ともに2細胞期の胚に発現が認められるが、8細胞期では認められない。その後胚盤胞期では再び発現する。発現量が受精卵のレベルから一旦減少して胚盤胞への発育に伴い増加することは、マターナル(母由来)なメッセージから自己発現への転換が着床前の発育過程で起こることを意味する。初期胚においてもダイオキシン作用のカスケードが存在し、エストロゲン作用をそのレセプターの種類の多様性や発現量調節等のレベルで影響を与えることが想像され、今後の興味ある研究課題である。

4. 子宮内膜症

ダイオキシンの成体への作用としては発癌も考えられるが、最も大きな問題とされるのは子宮内膜症である。この20ないし30年の間に増加の一途をたどっているといわれる子宮内膜症は、現在約12万人以上の女性が診療を受けている。エストロゲン依存性疾患である子宮内膜症の発症や増悪に環境中に増加しているダイオキシンが関係しないかという推論がある。

子宮内膜症とダイオキシンとの関連が特に注目を集めたのは、Rierら(1993)の報告による。これはサルを用いて4年間ダイオキシンを投与、その後10年間経過を観察したところ無投与群、連日126 pg/kg投与群、630 pg/kg投与群で子宮内膜症の発生率はそれぞれ33%、71%、86%と確認した(Table 1)。重症度も用量反応的に増加した。なお630 pg/kg群では腸管狭窄など子宮内膜症が原因で死亡したものも含まれている。

マウス、ラットを用いた研究でもダイオキシンが実験的子宫内膜症の発育に関係するという成績もある。子宮内膜症の患者の血液中のダイオキシン濃度を測定したところ、健常者より患者で高いとする報告もある。しかしヒト血中有機塩素量は子宮内膜症と関係ないという否定的データもある。一般に体内負荷量と血液中のダイオキシン量は相関するといわれるが、蓄積量の多い脂肪組織における評価が重要になる。

ダイオキシンとAhRを介して作用するとされているコプラナーPCBを同系のサルに投与したArnoldらは無処置群(6/16; 37%)より投与群(16/64; 25%)で子宮内膜症の発生率が低い傾向にあり、投与量と内膜症の進

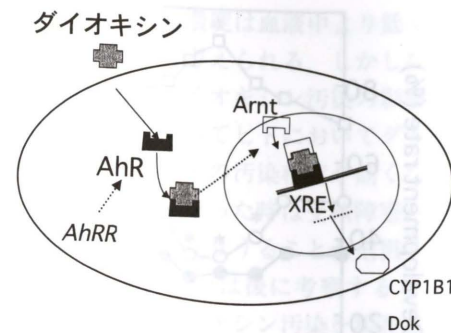


Fig. 3 ダイオキシン作用の分子機構

ダイオキシンは細胞内のダイオキシンレセプター(AhR)と結合して複合体を形成し、さらにArnt(Ah receptor nuclear translocator)と結合して核内に入り、遺伝子上流に存在するXRE(xenobiotic responsive element)に結合して転写を促進する。CYP1B1やDok等の遺伝子活性化が知られている。

行度との関連もみられなかったと報告した。最近の研究でヒト子宮内膜におけるAhRの局在や発現も検討され、月経周期による変動と子宮内膜機能との関連が示唆されている(Kuchenhoff et al., 1999)。我々は子宮内膜症の発症とダイオキシンの関連を明らかにする目的で、子宮内膜のAhRや関連遺伝子の発現量を患者と対照で比較したが、2群間に差異を認めなかった。

サルの子宮内膜症発症のメカニズムとして、ダイオキシンがAhRと結合しサイトカインなどの遺伝子に作用することが挙げられている。子宮内膜の増殖、分化にはIL-1, IL-6, TNF等のサイトカインが関与しており、それを制御するのはエストロゲン等の性ステロイドである。これよりダイオキシンによる内膜症発症は内分泌攪乱の結果生じたサイトカイン制御異常が原因であるとされる。ただし、ダイオキシンはサルにおいて生殖能の低下、流産、死産と関係することが知られており、Rierの実験においてダイオキシン投与群では生殖能が低下しその結果として間接的な機序によって子宮内膜症が発症したことも否定できない。いずれにせよヒトの子宮内膜症とダイオキシンの因果関係を結論づけるのは尚早である。

5. ダイオキシンの分子作用

ダイオキシンは細胞内のAhRと結合して複合体を形成し、核内に入る(Fig. 3)。核内ではAh receptor nuclear translocator(Arnt)と結合してヘテロダイマーを形成し、応答遺伝子上流に存在するXRE(xenobiotic responsive element)に結合して転写を促進する(Schmidt et al., 1993; Matsushima et al., 1993)。他の環境ホルモンの多くが、エストロゲンレセプターと結合することに比べてダイオキシンは特別な存在であるといえることができる。

自然界には存在しなかったダイオキシンに対する特異的レセプターが存在することの意味は不明であり、AhR

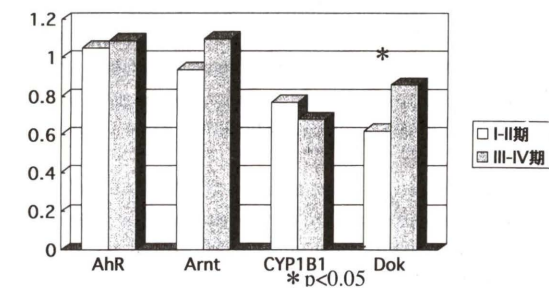


Fig. 4 子宮内膜症患者のダイオキシン関連遺伝子発現量の比較

の内在性の基質も特定されていない。異物に対する生体の反応という見方もできるが不明点が多い。現象としては転写因子として働き、チトクロームP450遺伝子の誘導等を行う(Sogawa et al., 1997)。また最近AhRにより誘導され、AhRの機能を抑制するAhR repressor(AhRR)の存在も明らかになり(Mimura et al., 1999)、ダイオキシンのエストロゲン作用ないし抗エストロゲン作用を示す分子機構が明らかになりつつある。

これらのダイオキシンに関連する遺伝子発現はヒトの各種細胞でも明らかになりつつある。最近子宮内膜症の関連からヒト子宮内膜におけるAhR、Arnt等の遺伝子発現を検索したところ、いずれの検体からも遺伝子発現を認めた(Igarashi et al., 1999)。性周期や子宮内膜症の有無では大きな差異はないが、喫煙によるAhR発現量の減少の可能性や子宮内膜症のステージによる変化(Fig. 4)が示唆された。内分泌攪乱化学物質の研究のみならず、子宮内膜症の解明においても一つの新しいアプローチとなると思われる。

6. ダイオキシン耐容量と母乳

ダイオキシン等の内分泌攪乱物質の人体への汚染は生殖器官へも及び、ここでみたようにヒト卵細胞も汚染の対象となる。汚染の程度は低く、直接的に生殖機能の異常を起こすとは考えない。ただしダイオキシンは低濃度でも胚への直接作用を持つことから、内分泌攪乱物質の環境中の排出、蓄積を減少させ、ヒトへの汚染を防いでいく必要はあると考える。1日耐容量が従来の10 pg/kg体重から4 pg/kgに引き下げられたが、生殖機能への影響を十分考慮してさらに基準の検討を続ける必要がある。また基準がクリアできるような行政努力により、国民の不安が解消できる日が早く来ることを希望する。産婦人科領域では母乳の汚染も問題になる。日本の現状として母乳により乳児には50-100 pg/kg/dayのダイオキシン暴露が想定される。我々は最近、ダイオキシンはサルの実験で微量(126 pg/kg/day)でも子宮内膜症の病因となりうる可能性を鑑み、母乳哺育が後々の子宮内膜症の発症リスクとなりうるかを日本子宮内膜症協会会員の方々や東京大学病院の患者および一般ボランティア女性を対象としたアンケート調査で明らかにしようとした

Table 2 乳児期の栄養方法(母乳ないし人工乳)の子宮内膜症発症に与える影響

対象	合計	母乳哺育	混合	人工乳
非内膜症	2281	1550(68.0%)	427(18.7%)	304(13.3%)
内膜症*	567	289(51.0%)	177(31.2%)	101(17.8%)

*P<0.001

(Table 2)。その結果、月経困難症などの症状を持たないものを健常群の母乳哺育率が68%に対して腹腔鏡・開腹手術による子宮内膜症群、患者では51%と健常者で母乳哺育率が高かった(Tsutsumi et al., 1999)。これより母乳哺育により相対的に高いダイオキシンの被曝を受けることは子宮内膜症発症のリスクとはならないことが示唆された。逆に母乳は子宮内膜症の発症を予防する可能性もあり、母乳が優れた栄養源でありかつ、少なくとも過去において安全性に問題がなかったことを支持するデータと考えられる。現状では母乳中のダイオキシンが何らかの悪影響をもたらすという客観的データがあるわけではなく、母乳を禁止あるいは制限する必要はないと思われる。しかしながら、先に示したように母乳等から次世代にわたった微量のダイオキシンが各種機能に障害を与えている成績を見ると、母乳をこれ以上の汚染から守り、その安全性を検証する取り組みも必要と考えられる。

参考文献

- Abbott, B. D. and L. S. Birnbaum (1990) Rat embryonic palatal shelves respond to TCDD in organ culture, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 106, 418-432.
- Corborn, T., D. Dumanoski and J. P. Myers (1996) *Our stolen future*. Penguin Book USA Inc., New York.
- Couture, L. A., B. D. Abbott and L. S. Birnbaum (1990) A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism, *Teratology*, 43, 619-627.
- Daston, G. P. (1993) Do thresholds exist for developmental toxicants? A review of the experimental and theoretical evidence, In: Kalter H. (ed.) *Issues and Reviews in Teratology*, Plenum Press, 6, 169.
- Hiroi, H., M. Momoeda, S. Inoue, F. Tsuchiya, H. Matsumi, O. Tsutsumi, M. Muramatsu and Y. Taketani (1999) Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantation mouse embryos, *Endocrine J.*, 46, 153-158.
- Igarashi, T., Y. Osuga, O. Tsutsumi, M. Momoeda, K. Ando, H. Matsumi, Y. Takai, R. Okagaki, H. Hiroi, T. Fujiwara, T. Yano and Y. Taketani (1999) Expression of Ah receptor and dioxin-related genes in human uterine endometrium in women with or without endometriosis, *Endocrine J.* (in press).
- Jarrell, J. F., D. Villeneuve, C. Franklin, S. Bartlett, W. Wrixon, J. Kohut and C. G. Zouves (1993) Contamination of human ovarian follicular fluid and serum by chlorinated organic compounds in three Canadian cities, *Can. Med.*

Assoc. J., 148, 1321-1327.

Kuchenhoff, A., G. Seliger, T. Klonisch, G. Tscheudschilsuren, P. Kaltwasser, E. Seliger, J. Buchmann and B. Fischer (1997) Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium, *Fertil. Steril.*, 71, 354-60.

Madhukar, B. V., D. W. Brewster and F. Matsumura (1984) Effects of in vivo-administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on receptor binding of epidermal growth factor in the hepatic plasma membrane of rat, guinea pig, mouse, and hamster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 7407-7411.

Matsushima, N., K. Sogawa, M. Ema, A. Yoshida and Y. Fujii-Kuriyama (1993) A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-450A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins. Ah receptor and Arnt., *J. Biol. Chem.*, 268, 21002-21006.

Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa and K. Fujii-Kuriyama (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function, *Genes Dev.*, 13, 20-25.

Mimura, J., K. Yamashita, K. Nakamura, M. Morita, T. N. Takagi, K. Nakao, M. Ema, K. Sogawa, M. Yasuda, M. Katsuki and Y. Fujii-Kuriyama (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor, *Genes to Cells*, 2, 645-654.

Peters, J. M. and L. M. Wiley (1995) Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 134, 214-221.

Rier, S. E., D. C. Martin, R. E. Bowman, W. P. Dmowski and J. L. Becker (1993) Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21, 433-41.

Schmidt, J., V. L. A. Carver and C. A. Bradfield (1993) Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment, *J. Biol. Chem.*, 268, 22203-22209.

Sogawa, K., Y. Fujii-Kuriyama (1997) Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor, *J. Biochem.*, 122, 1075-1079.

Tsutsumi, O., H. Uechi, H. Sone, J. Yonemoto, Y. Takai, M. Momoeda, C. Tohyama, S. Hashimoto, M. Morita and Y. Taketani (1998) Presence of dioxins in human follicular fluid: their possible stage-specific action on the development of preimplantation mouse embryos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250, 498-501.

Tsutsumi, O., M. Momoeda and Y. Taketani (1999) Breast-fed infants, possibly exposed to dioxins in milk, have unexpectedly lower incidence of endometriosis in adult life, *Int. J. Gynecol. Obstet.* (in press).

堤 治(編) (1999) 環境ホルモンと生殖, 生殖医療のすべて, 丸善出版, 東京, pp.97-116.

Environ. Mutagen Res., 21 : 293 - 295 (1999)

資料・情報

DNA チップ技術研究会の紹介

西野 輔翼

京都府立医科大学学生化学教室 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル

Introduction of Society for DNACHip Technology

Hoyoku Nishino

Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine
Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyoku, Kyoto 602-8566, Japan

Summary

Society for DNACHip Technology was founded on May 15, 1999, and the first conference of the Society will be held in June, 2000, at Tokyo. The number of active member is now over 1,000. Further information is available on the Society's home page (<http://research.kpu-m.ac.jp/dnachip/home.htm>).

Keywords : DNACHip

緒 言

DNA チップ技術は最近になって急速に発展し, 今後の生命科学を支える基盤技術の一つとして注目されている。

日本においても, 昨年秋頃から多方面より広く関心が寄せられるようになり, 本年5月15日には, DNA チップ技術研究会の設立総会が開かれるに至った。推測していたよりはるかに多くの参加者があり, 大変な盛況であった。現在, 会員数は1,000人を超えており, 今後も増え続けるものと予測される。なお, 第1回総会が来年6月頃に東京で開催される予定である。

本研究会のホームページ(<http://research.kpu-m.ac.jp/dnachip/home.htm>)が開設されており, 活動内容などに関する情報はそこから入手可能である。

DNA チップ技術は以下に述べるような分野で利用される。

1. 遺伝子発現モニタリング

DNA チップに蛍光標識したサンプルをハイブリダイズさせ, そのチップをスキャンして蛍光強度を読み取ることによって, 遺伝子発現のレベルをモニタリング

することができる。さまざまな状況下における多数の遺伝子の発現プロファイルを一度に比較することが可能であるため, 細胞機能の発現・調節に関与する遺伝子群の変化を明らかにすることができる。

たとえば, GenBankなどのデータベース上にある6,800種の完全長ヒト遺伝子の発現レベルを定量的にモニターできるDNAチップがすでに製品化されている。このDNAチップでは, ガラス基盤上に, それぞれのターゲット遺伝子に対して, 解析に最適なオリゴヌクレオチドプローブのセットが合成されている。そして, 重要なことは, プローブとしてパーフェクトマッチ配列および1塩基ミスマッチ配列のオリゴヌクレオチドをペアにして, アレイ上の隣接した領域に合成されているという点である。このようにすることによって, 非特異的ハイブリダイゼーションおよびバックグラウンドシグナルを除去することが可能となっている。この方式の場合, サンプルmRNAは, 逆転写によってcDNAとした後, *in vitro* 転写バイオチンラベリングによってバイオチン化cRNAターゲットを調整する。続いて, cRNAとDNAチップとをハイブリダイズした後, アビジン-蛍光色素複合体でハイブリッドを染色する。そして, ハイブリッドの量を蛍光強度として検出する。すなわちこの方式では, 1色法を用いて, 一つ一つのサンプルを別々に解析するわけである。そして, 実験内および実験間のデータを比較定量できるようにするために, 既知量のラベルさ

受付: 1999年8月18日 受理: 1999年8月27日
©日本環境変異原学会

れたコントロール RNA を用いて補正する方式をとっている。したがって、多くのサンプルから得られたデータを比較できることになる。そして、データベースを構築していくことが可能である。

一方、予め調整した cDNA 等のプローブをスライドガラス等にスポットして作製した DNA チップの開発も、並行して進められている。この場合、発現の差を比較したい 2 つのサンプルを対象として、2 色法を用いて解析を行うのが一般的である。すなわち、2 つのサンプルから mRNA を抽出精製し、それぞれの mRNA をそれぞれ異なる蛍光色素でラベリングした後、1 枚の DNA チップ上でハイブリダイズさせ、スキャンする。その結果、DNA チップ上の各スポットの 2 色の蛍光強度の差から、発現差に関する情報が得られる。この方式では、2 つのサンプルを解析の対象とする場合には、1 枚の DNA チップで結果が得られ、チップ間のばらつきを補正する必要がないため、優れた方法である。

2. DNA チップを用いた遺伝子の塩基配列決定

DNA チップを用いて塩基配列を決定することも可能である。特に、解析する対象が膨大な場合、従来の方法では時間がかかりすぎて現実的には対応不可能であるが、DNA チップを用いた遺伝子の塩基配列決定方法であればこの問題を解決することができる。

すでにいくつかのものが製品化されており、その例として p 53 遺伝子の塩基配列を決定するための DNA チップがある。この DNA チップ上のプローブは、5 種のオリゴヌクレオチドを 1 セットとして配置している。そのセットの中の 1 つのオリゴヌクレオチドは wildtype のレファレンス配列と完全に相補的となっているが、その他の 4 つのオリゴヌクレオチドにおいては、置換部位として設定した部位がミスマッチ塩基 (3 種類) または 1 塩基欠損となるように変化させてある。このように作製したプローブセットと、蛍光標識 DNA ターゲットをハイブリダイズさせると、もしターゲット DNA が変異のないものであれば、パーフェクトマッチのオリゴヌクレオチドと最も強くハイブリッドを形成し、最強の蛍光を示す。しかし、置換部位として設定した部位で変異のあるターゲット DNA の場合、ミスマッチ (あるいは 1 塩基欠損) のオリゴヌクレオチド (4 種) の内の一つと最も強くハイブリダイズする。そして、4 種のうちのいずれと最も強くハイブリッドを形成したかをみることによって、変異の種類を特定することができる。なお、変異のあるものとないものとが 2 種類混在する場合には、2 種類のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッドを形成することになり、その蛍光強度の比をとれば、2 種類の存在量比がわかる。以上のような原理で、この DNA チップでは、p 53 遺伝子のエクソン 2 ~ エクソン 11 の全塩基配

列を読み取ることが可能となっている。

3. 1 塩基置換型多型 (Single-nucleotide polymorphisms, SNPs) の解析

DNA チップを用いた技術の応用分野で注目されているのが SNPs の解析である。疾患や表現形質のバリエーションは遺伝的多様性 (genetic diversity) による。その一つが 1 塩基置換のポリモルフィズム SNPs である。たとえば、薬物代謝に関わる蛋白質群をコードする遺伝子群において、SNPs による個人差を明らかにすることができれば、個々の薬効の最適化を図るための有用な情報として利用することができる。また、発がん物質に対する感受性を知ることもできることになり、個々のリスク評価が可能となる。すなわち、今後の目標とされているカスタマイズド・メディシンを支える技術の一つとして役立つわけである。

さらに、SNPs を総括的に同定し、それらの遺伝子地図を作製することが進められている。染色体上にマップされた SNPs のセットは、今後最も強力な遺伝学の解析手段となると考えられており、現在、2,000 種類以上の SNPs を検出できる DNA チップの製品化が計画されている。これは、数百ナノグラム程度のゲノム DNA をサンプルとして、複数の反応チューブを用いて PCR を行った後、それらを 1 本のチューブに混合し、2 回目の PCR を行って蛍光標識をするという方法でターゲットサンプルを調整し、DNA チップとハイブリダイズさせるものである。そして、ハイブリダイゼーションパターンを解析する。この方法を用いれば、従来の連鎖解析法と比較して約 10 倍の効率が得られるものと予測されている。すなわち、従来であれば、染色体上での局在を 20 センチモルガン程度の領域までしか絞り込むことができなかったが、開発中の DNA チップを利用すれば、その約 10 分の 1 の 2 センチモルガンまで絞り込めると予測されているのである。したがって、種々の疾患関連遺伝子の発見にきわめて有用である。

以上のように、DNA チップ技術の応用範囲はきわめて広い。

ところで、この新しい技術は開発途上にあり、まだまだ完成されたものではないことに対しては、十分な注意を払う必要がある。たとえば、遺伝子発現モニタリングについてであるが、従来の方法で得られた解析結果と、DNA チップ技術を用いて得られた解析結果とが一致しない場合があることが指摘されている。その理由は今のところわかっていない。このような基本的なことから解決しなければならない問題点を含んでいるのである。したがって、本技術を利用する場合には、それらの未解決の部分があることをよく理解したうえで使いこなす必要がある。たとえば、個々の遺伝子の発現の変化について論じる場合には、DNA チップ技術を用いて得られた解

析結果のみで結論を出すのではなく、従来の方法で得られた解析結果もあわせて、総合的に判断する必要がある。一方、DNA チップで解析可能なすべての遺伝子発現の変化をパターンとして捕らえて、そのパターンの差あるいは同一性を論じる場合には、DNA チップ技術でしか得られないデータを対象としているわけで、現時点ですでに完成された新技術と受け取ることが可能である。

最近、DNA チップ技術に関するレビューが *Cell* 誌に掲載された (Powson, T. and Saxton, T.M., Signaling Networks- Do All Roads Lead to the Same Genes? *Cell*, 97, 675-678, 1999) が、その末尾に次のような記載があり興味深い。

Oligonucleotide and cDNA arrays are clearly changing the ways we think about cell biology..... Pandora's box has now been opened.

開かれたパンドラの箱からは、ありとあらゆる困難が抜け出てきて、われわれはそれに対応するために苦戦することになる運命にあるが、箱の底には希望が残っているのである。DNA チップ技術という新しい方法が開かれた今、それをコントロールできるようになるまでには多くの困難を克服しなければならないが、まちががなく希望はある。今回設立された DNA チップ技術研究会はその希望を手に入れることを目標としている、ということができよう。

Author Index (Vol. 21)

A		R	
Asakura, S.	21 ; 109	Kobayashi, H.	21 ; 231
F		Kuroda, Y.	21 ; 85
Fujikawa, K.	21 ; 273	Kuroda, Y.	21 ; 115
H		Kuroda, Y.	21 ; 1
Hayakawa, K.	21 ; 147	M	
Hisamatsu, Y.	21 ; 141	Miyajima, M.	21 ; 95
Honma, M.	21 ; 281	Miyamae, Y.	21 ; 225
I		Miyata, H.	21 ; 173
Ikushima, T.	21 ; 213	N	
Inoue, M.	21 ; 197	Nagao, M.	21 ; 45
Inoue, T.	21 ; 255	Nagao, T.	21 ; 267
Itoh, S.	21 ; 31	Nakamuro, K.	21 ; 159
K		Nishino, H.	21 ; 293
Kamiguchi, Y.	21 ; 201	Nomura, T.	21 ; 171
Kato, M.	21 ; 23	Nomura, T.	21 ; 207
Kawai, K.	21 ; 103	Nukaya, H.	21 ; 153
Kikuchi, H.	21 ; 181	O	
		Ogata, Y.	21 ; 11
		Oyama, H.	21 ; 237
		Y	
		Yamada, M.	21 ; 123
		Yanagimachi, R.	21 ; 113
		S	
		Sasaki, Yu F.	21 ; 131
		Sutou, S.	21 ; 243
		T	
		Tsutsui, Y.	21 ; 39
		Tsutsumi, O.	21 ; 287
		U	
		Ueno, S.	21 ; 219
		W	
		Watanabe, M.	21 ; 251
		Watanabe, T.	21 ; 165
		Rice, J. M.	
		21 ; 191	

Kerword Index (Vol. 21)

A

Ah receptor	21 ; 181, 191, 287	chromosome aberration	21 ; 201
airborne particulate	21 ; 147	comet assay	21 ; 131, 213, 220, 225, 231, 237
alkali labile site	21 ; 225	cross linking	21 ; 225
alkaline elution method	21 ; 220		
alkylating agents	21 ; 123		
Ames assay	21 ; 159		
Ames test	21 ; 123		
aminoarenes	21 ; 159		
anticarcinogenesis	21 ; 1, 85		
antimutagenesis	21 ; 1, 85		
antimutagenicity	21 ; 95, 243		
<i>Apc</i>	21 ; 45		
apoptosis	21 ; 181, 237		
aromatic ketone	21 ; 141		
A α C	21 ; 45		

B

<i>λbio</i> transducing phage	21 ; 11
black tea	21 ; 1, 85
BMX	21 ; 23
bone marrow	21 ; 109, 251

C

chemicals having hormone-like action	21 ; 255
chemiluminescence detection	21 ; 147
Chinese hamster V79 cells	21 ; 95
chlorinated by-products	21 ; 23
chlorination	21 ; 31

D

degeneration of Sertoli cells	21 ; 197
diesel-exhaust particulate	21 ; 147
dinitropyrene	21 ; 165
dioxin	21 ; 181, 197, 201, 287
dioxin analogues	21 ; 173
dioxins	21 ; 191, 207
direct mutagen	21 ; 31
DNAchip	21 ; 293
DNA damage	21 ; 220, 225, 231
DNA damage and repair	21 ; 213
DNA damage in mouse germ cells	21 ; 197
DNA fragmentation	21 ; 237
DNA sequence	21 ; 39
DNA—付加体	21 ; 45
<i>Drosophila melanogaster</i>	21 ; 103

E

embryo development	21 ; 287
endocrine disruptor chemicals (EDCs)	21 ; 281
endocrine disrupting chemical	21 ; 267
endocrine disruptors	21 ; 255
endometriosis	21 ; 287
(-)-epigallocatechin (EGC)	21 ; 103
(-)-epigallocatechin gallate (EGCg)	21 ; 103
estrogen receptor	21 ; 287

excision-repair activity 21 ; 95

F

fertility 21 ; 201

G

gene disruption	21 ; 123
gene mutations	21 ; 115
genetic damage	21 ; 267
genetic effect	21 ; 201
genotoxicity	21 ; 131
germinal selection	21 ; 267
glucopyranosylvanillin	21 ; 243
glyoxal	21 ; 31
green tea	21 ; 1, 85, 95

H

heterocyclic amines	21 ; 159
hexavalent chromium	21 ; 220
HGPRT ⁻ antimutagenicity	21 ; 115
HPLC	21 ; 147
human spermatozoa	21 ; 201
human T cell leukemia	21 ; 181

I

IARC monographs	21 ; 131
illegitimate recombination	21 ; 11
image analysis	21 ; 231
<i>in vivo</i> 突然変異	21 ; 45
IQ	21 ; 45

K

K-SDS precipitation method	21 ; 220
----------------------------	----------

L

<i>lacZ</i> gene	21 ; 39
<i>lacZ</i> transgenic mouse	21 ; 39

M

malformations	21 ; 207
mammalian cells	21 ; 115
manual microscopic analysis	21 ; 231
MeIQ	21 ; 45
MeIQx	21 ; 45
methylglyoxal	21 ; 31
mice	21 ; 207
micronucleus assay	21 ; 251
micronucleus test	21 ; 109, 243
mouse lymphoma assay (MLA)	21 ; 281
mouse multiple organs	21 ; 131
mutagen	21 ; 154, 159
mutagenic activity	21 ; 23, 165
mutagenicity	21 ; 123, 147, 273
Muta TM Mouse	21 ; 39
MX	21 ; 23

N

nitroarene	21 ; 141, 147
nitroarenes	21 ; 159
nitrogen dioxide	21 ; 141
non-linear dose-response curve	21 ; 255
non-mutagenic carcinogens	21 ; 115
<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea	21 ; 109

O

<i>O</i> ⁶ -methylguanine DNA methyltransferase	21 ; 123
--	----------

Oil Orange SS	21 ; 251	synthetic hormone	21 ; 267
omeprazole	21 ; 181		
P		T	
		tail moment	21 ; 231
PBTA-1	21 ; 154	TCDD	21 ; 191
PBTA-2	21 ; 154	tea polyphenols	21 ; 1, 85
peripheral blood	21 ; 109, 251	testicular atrophy	21 ; 273
PhIP	21 ; 45	testicular toxicity	21 ; 267
pollution	21 ; 173	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	21 ; 273
polycyclic aromatic hydrocarbon	21 ; 141	theaflavin digallate (Tdg)	21 ; 103
prenatal exposure	21 ; 267	the fetal window	21 ; 255
promotion	21 ; 281	the risk factor-multiplication theory of aging	
<i>p53</i>	21 ; 45		21 ; 255
³² P-ポストラベル法	21 ; 45	thymidine kinase (<i>tk</i>) gene mutation	21 ; 281
R		tolerable daily intake	21 ; 173
		transgenerational effects	21 ; 207
radiation	21 ; 213	transgenerational teratogenicity	21 ; 267, 273
radioadaptive response	21 ; 213	tumors	21 ; 191
rat	21 ; 109, 251	type II DNA topoisomerase	21 ; 11
recombination	21 ; 281	U	
respiratory distress syndrome	21 ; 207		
risk assessment	21 ; 173	U.S. NTP carcinogenicity database	21 ; 131
river water	21 ; 154, 159	V	
S			
<i>Salmonella typhimurium</i> YG1024	21 ; 154	vanillin	21 ; 243
sewage bacteria	21 ; 31	W	
short-homology-dependent and -independent			
	21 ; 11	water environment	21 ; 159
silencing factors	21 ; 11	X	
single strand break	21 ; 225	X-rays	21 ; 103
structure-activity	21 ; 23		
surface soil	21 ; 165		

和文・他

遺伝子毒性発がん物

21 ; 45

突然変異スペクトル

21 ; 45

ヘテロサイクリックアミン

21 ; 45

フリガナ

氏名

Name

生年月日

所属機関

住所

日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の署名を添えて申し込みます。

フリガナ：	
氏 名：	Ⓔ
Name（ローマ字つづり）	
生年月日（性別）	19 年 月 日 （男・女）
所属機関名：	
住 所：〒	
TEL：	FAX：
電子メール：	
Affiliation Address Belong	
自 宅 住 所：	
電 話：	
Home address	
学会誌送付先：	①所属機関 ②自 宅
学 位：	年取得
研究領域（複数可）	
加入学会名：	

_____の本学会への入会を推薦致します。	
日本環境変異原学会評議員	
(署名)	印
日付	

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込1-44-2 芥川ビル
財団法人口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

日本環境変異原学会 学生会員申込書

[1年間(翌年の3月31日まで)のみ有効です]

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に学生会員として入会いたしたく貴学会員である指導教官の署名および在学証明書(裏面に添付)を添えて申し込みます。

フリガナ:	
氏 名:	㊦
Name (ローマ字つづり)	
生年月日(性別)	19 年 月 日 (男・女)
校名/学部:	
住 所:	〒
TEL:	FAX:
電子メール:	
Affiliation Address Belong	
自宅住所: 電 話:	
Home address	
学会誌送付先:	①大 学 ②自 宅
研究領域(複数可)	
指導教官名: 連 絡 先:	

_____の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。	
指導教官	印
(署名)	
日付	

入会申込書の送付先: 〒170-0003 東京都豊島区駒込1-44-2 芥川ビル
(勸口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

環境変異原研究 投稿規定

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」,「一般論文」,「短報」,および「特別企画(受賞講演)」,「論説」,「資料・情報」などを掲載する。なお,投稿論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は,一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括,評価,解説などである。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は,変異原に関する独創的研究の原著論文で,それ自身独立して価値ある結論あるいは事実を含むものとする。陰性データも受けける。

「短報」は,新しい技術の紹介や価値あるデータを含む短い報告とする。陰性データも受けける。

「論説」は,一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括,評価,解説などで,会員からの投稿によるものとする。

「資料・情報」は,環境変異原に関する調査の結果などをまとめたもの,および公開シンポジウム,研究会の要旨などとする。

(Letter to Editor も受けけます。)

2. 投稿資格

共著者のうちの1人は日本環境変異原学会会員でなければならない。ただし,招待寄稿の場合にはこの限りではない。

3. 論文原稿の書き方

論文原稿の用語は日本語または英語とし,最新の執筆規定に従い簡潔にわかりやすく書く。総説,一般論文,論説は,写真・図表を含めて刷り上がり8頁以内。短報は4頁以内とする。頁数の超過分や多額の経費を要する図表の実費は著者負担とする。

4. 論文原稿の送り先

論文原稿は正1部コピー2部の計3部を,日本環境変異原学会誌編集係宛に(簡易)書留便で送付すること。なお,最終稿では正1部,コピー1部ならびにフロッピーディスク(3.5インチ,使用した機種とソフト名を明記して,テキストファイル形式で保存)を編集委員長宛に送付すること。

5. 著作権

本誌に掲載された記事,論文などの著作権は日本環

境変異原学会に帰属するものとする。従って,本会が必要と認めた場合は転載し,また外部から引用の申請があった場合には,編集委員会において検討の上許可することがある。ただし,著作者自身が自分の記事,論文などの一部の複製,翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし,著作者自身であっても,全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には,事前に文書にて申し出を行い,許諾を求めなければならない。

6. 校正

著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更はしないこと。

7. 著者負担金

- 1) 投稿料は無料とする。ただし規定の頁数を越えることが明らかな場合,頁数の削減を求めることがある。
- 2) カラー印刷等の特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りは招待寄稿の場合も含め,すべて著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に50部単位で申し込むこと。

論文原稿の送付先

〒170-0003
東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル
インテルナ出版
日本環境変異原学会誌編集係
Tel. 03-3944-2591
Fax. 03-3947-8073

最終稿の送付先,その他編集についての問い合わせ先

〒305-8566
茨城県つくば市東1-1
生命工学工業技術研究所
日本環境変異原学会 編集委員長
須藤 鎮世
Tel. 0298-54-6502
Fax. 0298-54-6095
E-mail sutou@nibh.go.jp

環境変異原研究 執筆規定

- 用語は日本語または英語とする。
- 原稿は原則としてワープロを用い、左横書きで作成する。
日本語の原稿：
原稿はA4判用紙に1行約40字、1頁30～31行で印字する(刷り上がりの約1/2頁に相当する)。ただし、要約は英文(300語以内)とする。また、別に英文の題名、著者名(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を付ける。
英文の原稿：
原稿はA4判用紙にダブルスペースで印字する。1頁25～27行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。
- 論文の記述は、第1頁は表題、著者名、所属および所在地、第2頁は英文の要約(Summary)およびキーワード(英文5語以内、固有名詞や遺伝子名などで大文字の使用が必要な場合を除き、原則として小文字表記とする)、第3頁以下、緒言(Introduction)、実験材料および方法(Materials and Methods)、結果(Results)、考察(Discussion)または結果および考察、結語(Conclusion)、謝辞(Acknowledgments)、参考文献(References)、表、図の説明および図の順序とする。ただし、総説の記述は、第3頁以下、緒言、1. 2. 結語、謝辞、参考文献、表、図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明文はすべて英文とする。
- 学名、遺伝子記号などはイタリックとし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
- 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、化学物質のCAS登録番号を記載する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる(文頭の場合は大文字)。
- 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
- 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
- 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
- 表、図(写真)は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号Fig. 1, 2...を付し、原則として英文の説明文を別紙に添える。
- 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面にFig. 1, 2...および上下を鉛筆書きし、A4判の台紙に一枚ずつ軽く糊付けする。台紙の下部に

Fig. (一連番号)を付す。

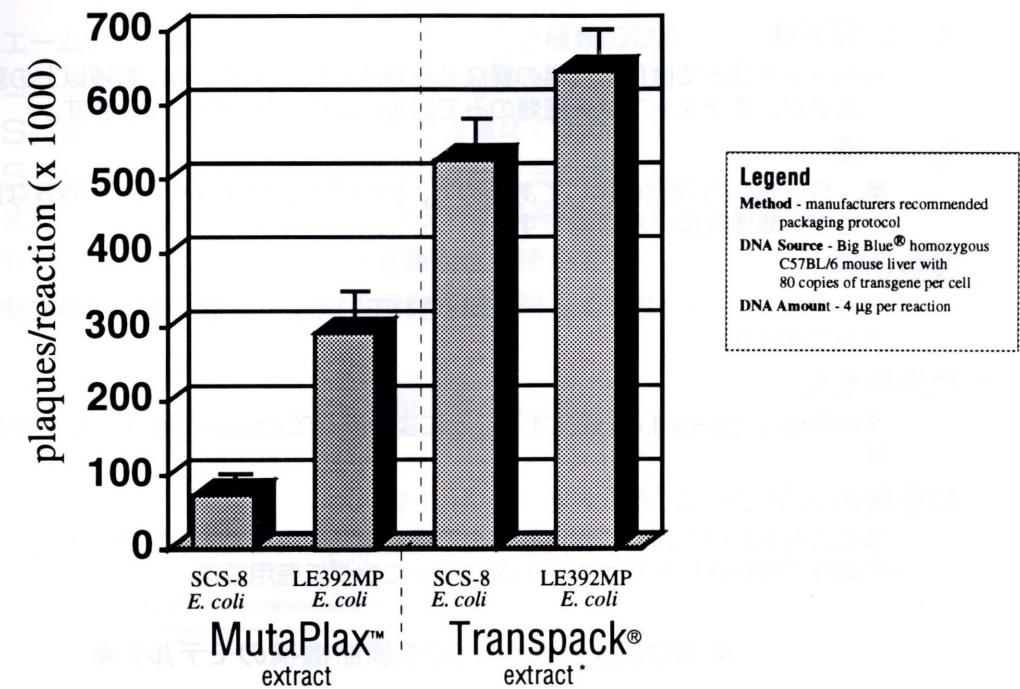
- 表は上部に一連の番号 Table 1, 2...と原則として英文の説明を記入すること(文頭のみ大文字)。表には縦罫を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときに表示の語句の右肩にa, b, c...を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
- 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
- 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名はChemical Abstractsの記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁(単行本の一部引用の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁)の順とする。単行本そのものを引用する場合は、編者名あるいは著者名、年号、書名、発行所、発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。
Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds), *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.
Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D. C.
藤川和男, 梁 治子, 近藤宗平(1984)ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法, *環境変異原研究*, 6: 107-113.
佐々木正夫(1983)環境変異原と染色体異常, 外村 晶(編), *染色体異常*, 朝倉書店, 東京, pp. 107-113.
松影昭夫(編)(1996)DNA複製, 修復と発癌, 羊土社, 東京。

改訂(1998年9月, 下線部)

一部追記(1999年1月)

Make No Mistake!

Transpack® λ Packaging Extract outperforms MutaPlax™ extract 5 to 1 for transgene recovery.



Now available to researchers using Muta™ Mouse
with proof of Muta Mouse purchase.

* U.S. Patent No. 5,188,957
♦ Using SCS-8 *E. coli* host cells

Big Blue® and Transpack® are registered trademarks of Stratagene
Muta™ Mouse is a trademark of HRP Inc.
MutaPlax™ is a trademark of Epicentre Technologies Corp.



STRATAGENE®
pioneering the future of in vivo mutation research

お問い合わせ先:

KASHO 加商株式会社
ライフサイエンスグループ

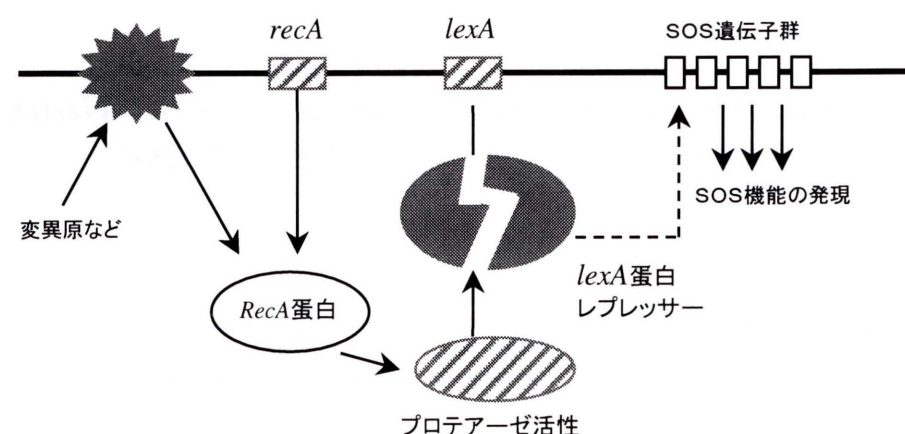
〒103-0024 東京都中央区日本橋2丁目14番9号
電話 03-3276-7676 FAX.03-3276-7626
E-mail: Tsumoru_Miyano@kasho.co.jp

変異原性試験キット

umu-テスト ウムラック

- ヒスチジン含有物質でもテスト可能
Amesテストでは不可能なヒスチジンを含んだ物質でもテスト可能。食品、尿、血液、粗抽出液等の検体にも適用できます。
- 高感度でAmes法と相関
標準的変異原性物質AF-2で5ng/mlまで測定。Ames法と良く相関します。
- 単一試験菌株
Amesテストでは反応機構の異なる変異原を検出するために数種以上の試験菌株を要しますが、本テストでは一種類のみで同等以上の成果を期待できます。
- 簡便
菌、S-9Mixが凍結乾燥してあるので、いつでも、無菌操作などの特殊な設備を必要とせずに簡便な操作が可能です。
- 多数迅速
マイクロプレート1枚/キットが添付されているので同時に多数の試料を約6時間でテストできます。
- 代謝活性化
凍結乾燥したS-9Mixを添加することによりすべてのwellにおいて代謝活性化が可能です。
- 制癌剤のスクリーニング
多くの制癌剤はDNAに作用するので制癌剤開発過程で、多数の抗生物質や合成化合物の中から制癌作用をもつ物質のスクリーニングに有用です。

◆ SOS誘発状態（SOS調節機構のモデル）◆



JIMRO 研究用試薬
コードNo.: 655510 容量: 96テスト用 価格: 30,000円

製造・発売元 株式会社 日本抗体研究所 ホームページ <http://www.ijnet.or.jp/jimro/>
〒370-0021 群馬県高崎市西横手町351-1 TEL. 027-353-1411 FAX. 027-353-1770

オリエンタルの変異原性試験用試薬

S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に! より手頃な価格に!

特徴

- エームテスト用と染色体異常試験用の2種類の試薬セットです。
- コファクターが無菌凍結品になり、解凍後S-9と混合するだけで使用できます。
- S-9とコファクターは実用的な分注量比ですから、混合が容易です。
- S-9とコファクターは未混合ですから、混合条件を変更しての試験が可能です。
- また、保存中にS-9とコファクターの未知の反応が起こりません。
- セット販売ですから、購入と在庫管理が便利です。
- 包装単位を少量化し、より手頃な価格に致しました。

製品名	包装単位	備考
エームテスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml × 10本 コファクターA 9ml × 10本	エームテストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml × 3本 コファクターC 4.7ml × 3本	染色体異常試験でのデータを添付します

(保存は-80℃でお願い致します)

- エームテスト用コファクターA (注分量100ml以上)および染色体異常試験用コファクターC (注分量30ml以上)の単品注文もお受け致します。
- 従来品は引続き取扱いしております。

変異原性試験用 S-9 (無菌凍結品)	2ml × 10本
エームテスト用 コファクターI (凍結乾燥品)	9ml用粉末 × 10本

誘導法の変更や、サル、イヌなどラット以外のS-9またはマイクロソームの調製、その他、技術的なお問合わせは、弊社バイオ部までお願い致します。

製造元

オリエンタル酵母工業株式会社
飼料・バイオ事業部
〒174-8505 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号
Tel. (03) 3968-1192 Fax. (03) 3968-4863

販売元

和光純薬工業株式会社
本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
電話 (06) 6203-3741 (代表)
東京支店 〒103-0023 東京都中央区日本橋四丁目5番13号
電話 (03) 3270-8571 (代表)

トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に！

DNAシーケンシング受託サービス

株アイシン・コスモス研究所では、お客様の研究をサポートするためにDNAシーケンシングの受託サービス業務を行っております。

◆Single Primer Extensionによるシーケンシング

基本料金：¥12,000/run（納期：お問い合わせ下さい）

一度にお受けするサンプル数に応じて割引致します！
（サンプルの本数や状態に応じて別途お見積もり致します）

◆変異解析のためのgpt遺伝子（全長456bp）のシーケンシングの場合に限り累計注文数に応じ、価格をディスカウント！！

《累計注文数》 1run～50runまで 定価 ¥12,000 → 15% off → ¥10,200/run

51run～100runまで 定価 ¥12,000 → 20% off → ¥9,600/run

101run～ 定価 ¥12,000 → 25% off → ¥9,000/run

◆変異解析のためのcII遺伝子（全長300bp）のシーケンシングの場合

1runからでも ¥7,200/run 40% off

突然変異部位の解析も別途料金にて承ります！

サンプルは、精製DNA・PCR産物の状態でクール宛配便にてお送り下さい（電気泳動のデータの添付をお願いいたします）。

なお、プラスミドは菌体の状態でも別途料金にて受け付けております。

その他、cDNAクローンなどのFull lengthシーケンシングも承っておりますので、お気軽にご相談下さい。

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

変異原性試験用 凍結S-9

S-9調製法 家田貿易のS-9は7週令のSDラットの雄に誘導剤としてフェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボン
を腹腔内投与した肝臓から調整したものを標準としていますが、その他の動物種及び誘導剤についても御
相談に応じております。

保 存 S-9は活性の高い酵素系よりなっておりますので、-80℃で保存して下さい。まれに解凍後分離すること
がありますが活性には異常がありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

●包装単位：1.5ml×12本詰 ●特注品、S-9に関して詰容量は4.5mlまでお受けいたします。

●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分 画	測 定 デ ー タ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量

ロット毎に下記の変異原活性データ（突然変異株数）を添付致します。

薬 物	菌 株 *
ベンゾ(a)ピレン	TA-100、TA-98、TA-1537
2-アミノアントラセン	TA-100、TA-98、TA-1537
9,10-ジメチルアントラセン	TA-100、TA-98、TA-1537
自然発生突然変異株数	TA-100、TA-98、TA-1537

* Salmonella typhimurium

エームス試験用凍結S-9MIX

特長

- ①エームス試験がより手軽になりました。
- ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
- ③解凍後、直ちにエームス試験にご使用いただけます。
- ④S-9が1mlとコファクターミックスが9ml入り、20プレート分の試験が可能です。

●包装単位：10ml×8本、5ml×4本

Salmonella typhimurium TA-100,
Benzo(a)pyrene 5μg/plate

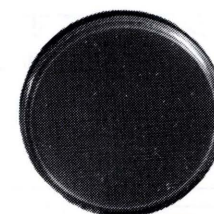
染色体異常試験用凍結S-9MIX

特長

- ①染色体異常試験がより簡単になりました。
- ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
- ③解凍後、直ちに染色体異常試験にご使用いただけます。
- ④S-9が1.05mlとコファクターミックスが2.45ml入り、7プレート分の試験が可能です。

●包装単位：3.5ml×3本

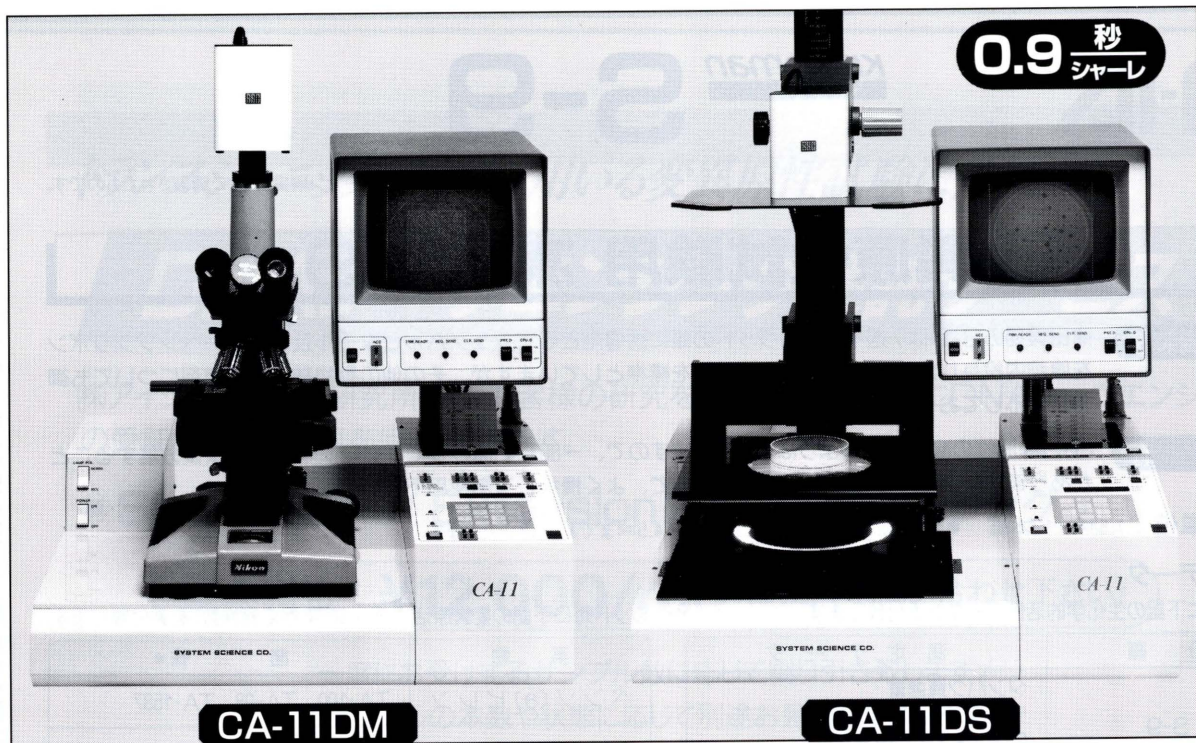
カタログNo.	品 名	包 装	価 格
S-9	変異原性試験用凍結S-9	1.5ml×12本	¥36,000
S-9 MIX	エームス試験用凍結S-9 MIX	10ml×8本	¥43,200
S-9 MIXTS	染色体異常試験用凍結S-9 MIX	3.5ml×3本	¥12,000



-S-9 Mix



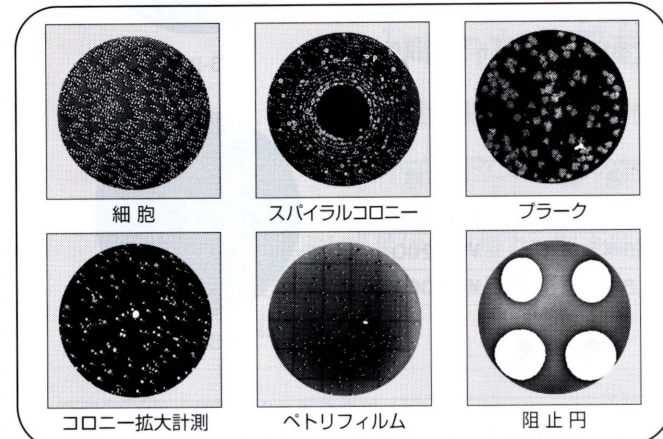
+S-9 Mix



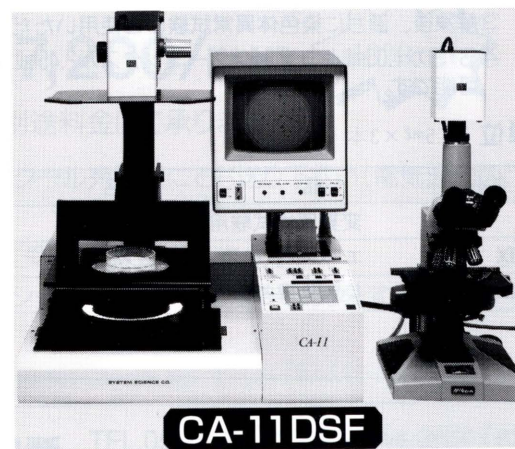
コロニーアナライザーシリーズが、通常の2倍速の高分解能高速画像積算機能を持ち、Dシリーズとして、さらに高感度、低価格、コンパクトになりました。

本装置は、混釈コロニー、淡く小さいコロニーはもとより、食品コロニー、エームテストから阻止円、細胞コロニーの分野まで広く利用されています。又、選択培地、ペトリフィルム、フィルター上、フードスタンプ等あらゆるコロニーの計測ができます。さらに自由に倍率を変えての拡大計測、顕微鏡・マクロと2台のカメラがスイッチでの切替計測と豊富な機能を備えたシステムです。尚、パソコン接続によりデータの管理用に種々標準プログラムが取揃えられています。

※ 依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。



製造発売元
SSC システムサイエンス株式会社



本社・工場 / 〒197-0011 東京都福生市福生1253-16
TEL 042(552)5956 (代表)

高速画像積算機能を持ったDシリーズ

コロニーアナライザー
CA-11Dシリーズ

変異原性試験画像解析支援システム

各種変異原性試験をサポートする画像解析システムをご用意しております。

SCG画像解析システム

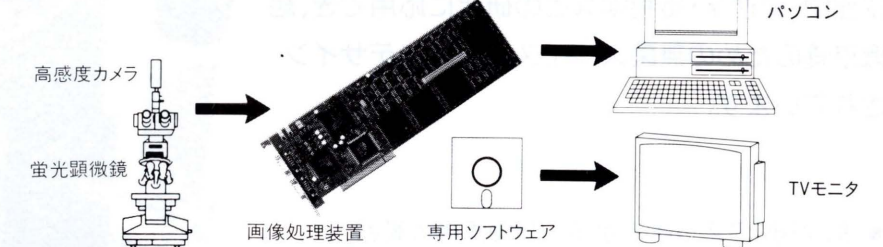
SCG試験に必要なデータを計測します。

高感度カメラの使用及び画像強調処理により細胞の不鮮明な箇所も計測が可能です。

《計測内容》

- Tail Length
- Shape Factor
- Nuclear Diameter
- Tail Intensity
- DNA Migration
- Ratio
- Tail Moment

《システム構成》



UDS画像解析システム

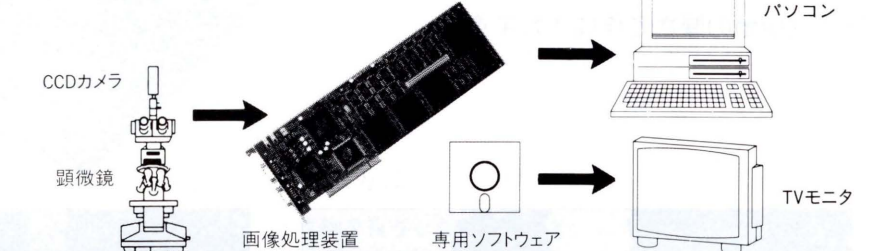
UDS試験に必要なデータを計測します。

フィルタ処理により画像強調を行ない、核と細胞質の各エリア内グレイン数及び、NETグレイン数の計測が行なえます。

《計測内容》

- 核グレイン数 (1エリア)
- 細胞質グレイン数 (3エリア)
- NETグレイン数

《システム構成》



小核画像解析システム

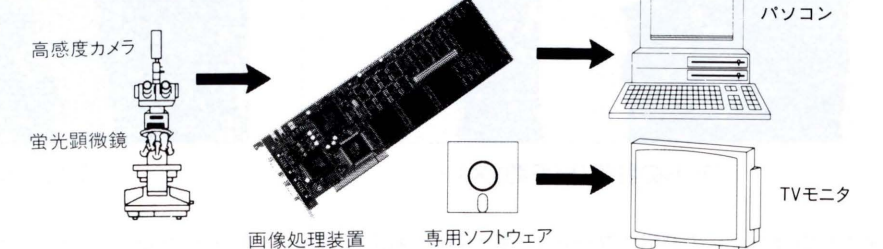
小核試験に必要なデータを計測します。

フルカラー画像解析装置に取込まれた画面内の核を抽出し、小核、主核のカウントやサイズを解析できます。

《計測内容》

- 小核カウント
- 小核サイズ
- 主核カウント
- 主核サイズ

《システム構成》



特許出願中

実績が保証します!

開発製造元

ImageTech®

ケイオー電子工業株式会社

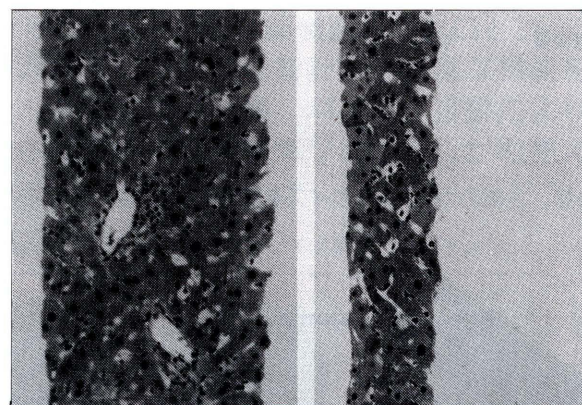
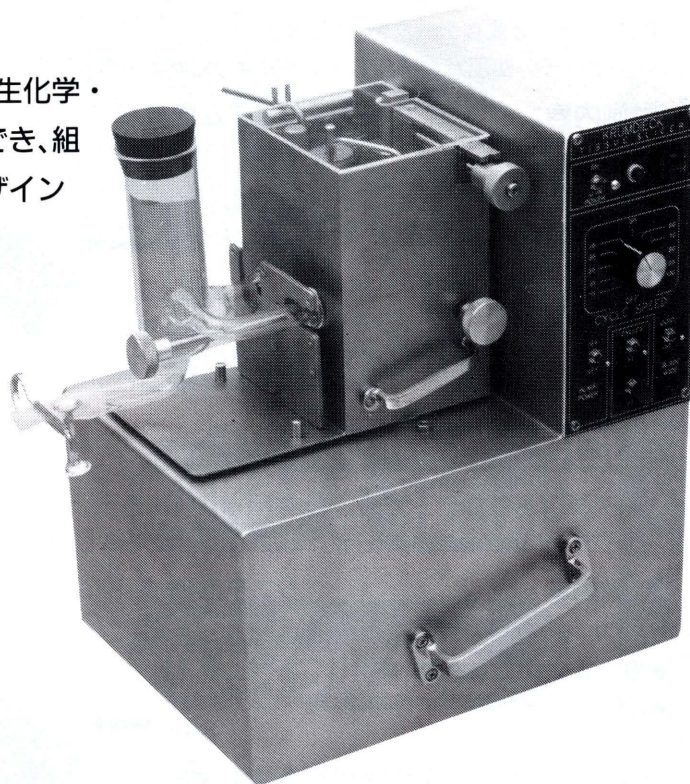
本社 〒567-0828 大阪府茨木市舟木町5番12号
TEL.0726-34-1022 FAX.0726-34-1018
東京支店 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目13番3号 MYビル2F
TEL.03-5251-4355 FAX.03-5251-4420

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

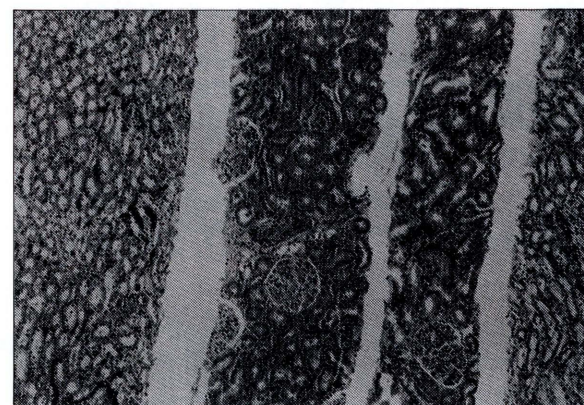
生きた組織の無菌スライスができます。

クルムディー・ティッシュスライサーは、生化学・生理学・薬理学・毒物学などの研究に応用でき、組織培養のための無菌スライス作成用にデザインされています。

- 薄い円形のスライスが、5～15mm直径の範囲で作成できます。
- ボタンを押すだけで、2～3秒に一枚の割合で(最高スピードの場合)作成でき、初心者でも取扱いは簡単です。
- スライス は再現性良く、バラツキもなく60～1000 μ mの厚さで作成されます。



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ60 μ mおよび135 μ m)で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135～200 μ m)です。どちらも切片面の平行性と美しさ(ダメージがない)に注目して下さい。



販売元

ショーシンEM株式会社

〒444-0241 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)
TEL. (0564) 54-1231番(代表)
FAX. (0564) 54-3207番

編集後記

本号には、一般論文1篇、短報1篇、シンポジウム特集5篇、資料・情報1篇が寄稿されました。ご協力ありがとうございました。本学会の発展には本誌の充実が不可欠です。会員皆様の一層のご協力(投稿)をお願いいたします。

担当編集委員 降旗 千恵

編集委員

須藤 鎮世(委員長)(1998-)

〒305-8566 茨城県つくば市東1-1

生命工学工業技術研究所

Tel: 0298-54-6502 Fax: 0298-54-6095

E-mail: sutou@nibh.go.jp

降旗 千恵(1996-)

〒243-0123 神奈川県厚木市森の里青山1-1

青山学院大学理工学部生物学

Tel: 0462-48-6474 Fax: 0462-48-7423

E-mail: cfuri@cc.aoyama.ac.jp

荒木 明宏(1997-)

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢字大芝原2445

日本バイオアッセイ研究センター・変異原性試験部

Tel: 0463-82-3911 Fax: 0463-82-3860

E-mail: akiaraki@da2.so-net.ne.jp

鈴木 勇司(1998-)

〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8

東京慈恵会医科大学・環境保健医学教室

Tel: 03-3433-1111 Fax: 03-5472-7526

E-mail: suzuki@jikei.ac.jp

森田 健(1998-)

〒300-4247 茨城県つくば市和台43

グラクソ・ウエルカム株式会社 筑波研究所

Tel: 0298-64-5532 Fax: 0298-64-8558

E-mail: tm28417@glaxowellcome.co.uk

松岡 厚子(1999-)

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

Tel: 03-3700-1141 Fax: 03-3700-2348

E-mail: matsuoka@nihs.go.jp

矢嶋 信浩(1999-)

〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町下石橋519

雪印乳業株式会社・生物科学研究所

Tel: 0285-52-1322 Fax: 0285-53-1314

E-mail: n-yajima@snowbrand.co.jp

複写される方に

本誌(書)に掲載された著作物を複写したい方は、著作権者から複写権の委託をうけている下記の協会から許諾を受けて下さい。著作物の転載・翻訳のような複写以外の許諾は、直接日本環境変異原学会へご連絡下さい。

学術著作権協会

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル

Tel: 03-3475-5618 Fax: 03-3475-5619

環境変異原研究 第21巻 第3号 1999年

平成11年10月22日 印刷

平成11年10月29日 発行

発行者 日本環境変異原学会

発行責任者 大西 克成

製作 インテルナ出版

目 次

一般論文

- Antimutagenicity testing of glucopyranosylvanillin and vanillin examined
in a mouse peripheral blood micronucleus test system
Shizuyo Sutou, Liquing Q. Wong, Masashi Takada, Youji Mitsui and Masataka Mochizuki 243

短 報

- Evaluation of micronucleus induction in rats by Oil Orange SS
.....Masahito Watanabe, Kiyoto Satake and Shin Kurogochi 251

第10回公開シンポジウム

内分泌攪乱物質の作用機序と後世代影響—環境変異原研究との接点—

- 内分泌攪乱とホルモン様化学物質井上 達 255
- 内分泌攪乱化学物質の精巣毒性と継世代催奇形性長尾哲二 267
- ダイオキシンの継世代催奇形性藤川和男 273
- 内分泌攪乱化学物質がもたらす遺伝的不安定性
—組換え型遺伝子突然変異について—本間正充 281
- 内分泌攪乱物質と生殖機能堤 治 287

資料・情報

- DNA チップ技術研究会の紹介西野輔翼 293
- Author Index297
- Keyword Index298

付 記

日本環境変異原学会 入会申込書
学生会員申込書

環境変異原研究

投稿規定
執筆規定