

齧歯類を用いた発生毒性評価の問題点とその将来展望

中西 剛

The Problem of Species Comparison of Developmental Toxicity: Can We Extrapolate Human Developmental Toxicity Induced by Environmental Chemicals from the Data of Rodents?

Tsuyoshi NAKANISHI

*Department of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan*

(Received December 13, 2006)

Rodent models have great utility for evaluating the potential of environmental chemicals to alter human reproductive development. However, animal studies have some problems of species differences in extrapolating to human developmental toxicity induced by xenobiotics, because the placental endocrine functions in particular vary considerably among different species. For example, estrogen biosynthesis during pregnancy in humans is much different from that in rodents. In humans, ovarian function gradually declines after fertilization, as the placenta becomes the primary site of estrogen biosynthesis during pregnancy. In contrast to the process in humans, the ovary (not the placenta) is the main source of estrogen during pregnancy in rodents, because the placenta of rodents does not express the catalytic enzymes for estrogen biosynthesis, such as aromatase. The regulation of estrogen biosynthesis in the placenta is very important for human embryos because altering placental function can cause permanent effects on embryos. It has been suggested that rodents are therefore unsuitable for evaluating the potential effects of xenobiotics on the human reproductive system and developmental toxicity induced by the alteration of placental endocrine functions. Consequently, there is an urgent need to establish effective tools to evaluate the *in vivo* reproductive and developmental toxicity of environmental contaminants that disrupt the placental endocrine functions, including maintenance of local estrogen concentrations in the placenta. To resolve the problems, in this review we propose using transgenic mice, in which the transgene is controlled by placental-specific promoters, and local transgene systems into the placenta using viral vectors.

Key words—reproductive toxicology; species differences; placenta; endocrine; organotin; transgenic mouse

1. はじめに

発生毒性試験は、医薬品、食品添加物、農薬などのほとんどの化学物質にその検討が義務付けられている重要な特殊毒性試験の1つである。化学物質の発生毒性試験の評価は、1) 用いた実験動物における試験の科学的真実性を考察し、ついで2) その動物種における生殖発生毒性機序と化学物質の体内動態を検索し、さらに3) 他の動物種における所見と比較考察することで、4) 最終的に予測される曝露量を考慮して、ヒトにおける毒性発現の可能性の推測、すなわちヒトへの外挿を行うことにある。しか

し、試験の結果を評価するに当たっては、1) 発生毒性試験の特殊性と2) 外挿の困難性の問題がある。発生毒性試験の特殊性とは、他の毒性試験とは異なり、被験個体が母体-胎盤-胎児複合体で多様な作用部位が存在するところにある。そのため、毒性発現機構が非常に複雑となり、科学的真実性の判断が非常に困難となる。外挿の困難性についてはどの試験法においても遭遇する問題点ではあるが、特に発生毒性試験についてはヒトと実験動物の発生過程における種差が非常に大きいことが原因として挙げられる。さらに妊婦での臨床試験は倫理上不可能で、化学物質の汚染事故等によって生じたヒトにおける事例も極めて少ないため、ヒトでの調査も極めて困難である。しかしながらこのような問題点を抱えつつも、今日に至るまでヒトにおける発生毒性の事例にそれほど多く遭遇しなかったのは、これまで

大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: nakanishi@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS16で発表したものを中心に記述したものである。

に積み重ねられてきた膨大な発生毒性に関するデータの賜であると言えよう。

ヒトへの外挿を行う上で最も基本的な概念の1つに、「化学物質の暴露量とその影響には一般的に用量反応関係が成立する」という原理がある。このことは発生毒性だけに限らず、すべての毒性を評価する上での基本原理であるが、特に発生毒性においてこの概念は、「いかなる化学物質も適切な時期に適切な量を任意の動物種に与えると、その発生を障害しうる（すなわち暴露する時期によって影響は異なるものの、大量投与では発生毒性を示す可能性がある）」という **Karnofsky** の法則として知られている。¹⁾ このような大原則に加え、「ヒトで発生毒性を示す化学物質は、何らかの動物種で同様の毒性を示す」という仮定と、「ある動物種で発生毒性が認められたものは、適切な時期に適切な量を投与することで、ヒトでも同様の発生毒性を示すかもしれない」という仮定を基本原則とすることで、発生毒性におけるヒトへの外挿は行われている。これらの基本概念は、これまでの発生毒性評価を支えてきた莫大なデータにより導き出されたものであるが、逆に言い換えればその評価は経験則に依存する部分が大きく、手探り状態で行われていることも事実である。このような発生毒性評価の不確実性に加え、近年話題となった内分泌かく乱物質問題のように、用量反応関係が成立する濃度とは別に、極低濃度で突発的に毒性（内分泌かく乱作用）を誘発する（逆U字反応を示す）といった毒性学の大原則からはずれた毒性が提唱されるようになり、発生毒性評価は益々混迷を極めつつあるようにも感じられる。またヒトや齧歯類を始めとする多くの哺乳動物の全ゲノムが解読され、これまで実験動物における反応性がヒトとほぼ同じであろうという前提で影響が評価されていた生理活性物質などの反応性にも、種差が存在することが明らかとなってきた。^{2,3)} このような発生毒性の問題を解決するためには、今一度、科学的真実性を追求するという原点に立ち返って、発生毒性評価を行う上での問題点を再考する必要があると思われる。

そこで本稿では、化学物質の発生毒性における標的臓器として、胎児の器官形成に重要でありながら毒性評価においては軽視されがちな胎盤に着目し、実験動物として汎用されている齧歯類とヒトの胎盤

における化学物質の影響の種差について概説するとともに、このような毒性の種差の問題を解決するための分子生物学的アプローチを考えてみたい。

2. 胎盤機能とその種差

胎盤は哺乳動物特有の臓器であり、ごく限られた期間しか存在しないにも係わらず、多種多様な機能を有する非常に特異な胎児由来の臓器である。父親由来のアレルを半分受け継いでいる胎児は、母体とは免疫学的に **semi allogenic** な関係であるため、互いの血液が交じり合ってしまうと、とたんに母親由来の免疫系に排除されてしまうが、胎盤が母体と胎児の間に存在することで物理的障壁となり、母体免疫系からの攻撃を防御している。また胎盤は、母体免疫系の胎児への攻撃を制御する機能（免疫系に相当する機能）も有していると考えられている。一方で、母体と胎児は血液を交えないため、母体からの栄養素の供給（消化管に相当する機能）や、ガス交換（呼吸器に相当する機能）などはすべて胎盤を介して行われる。このように哺乳動物の発生においては、母体と胎児が独立して存在するのではなく、胎盤を介した母体-胎盤-胎児を1つのユニットとする母児複合体を形成することで、胎児の生命維持を行っている。

発生毒性は、一般にその成長過程を考慮して、胚芽期、器官形成期、胎児期の3つに分けて考えられているが、器官形成期は、胎児の化学物質に対する感受性が高く、胎児死亡のみならず、不可逆的な機能障害あるいは形態的障害（奇形）となって現れることから、発生毒性評価を行う上で最も重要な時期であると言える。器官形成期とは着床以降の胎児の器官形成の段階を指すが、この頃から母体と胎児の間に胎盤が形成される。すなわちこれらの時期における毒性を評価するためには、胚芽期のように母体と胚に対する毒性のみならず、さらに胎盤を加えた複合的な影響を評価しなければならない。先述の胎盤機能は、胎児の成長過程においてももちろん重要ではあるが、この胎児の器官形成期において特に重要となるのが胎盤の内分泌機能である。

胎盤は、胎児の成長と性分化に重要な蛋白ホルモンとステロイドホルモンを産生、分泌する第二の視床下部-下垂体-性腺複合体としての機能を有する。ヒトの妊娠期において特に重要なステロイドホルモンは、プロゲステロンとエストロゲンであるが、一

般にこれらは、コレステロールを出発点とし、モノオキシゲナーゼであるチトクロム P450 と水酸基又はケト基の酸化又は還元を触媒する脱水素酵素により生成される (Fig. 1).⁴⁾ ヒトにおいては、妊娠初期のプロゲステロン産生は主に妊娠黄体で行われるが、徐々に絨毛組織から分泌され始め、最終月経より 50 日目以降では胎盤が主要な産生臓器となり、luteoplacental shift が完了する。ヒトにおいてプロゲステロンは胎盤においても単独で産生されるが、エストロゲンの産生には胎児との共同作業が必要となってくる。胎盤はコレステロールからプレグネノロンとプロゲステロンを産生するが、これをアンドロゲンに変換する酵素 (CYP17) が存在しないために、直接エストロゲンを産生することができない (Fig. 2)。胎盤で産生されたプレグネノロンは、胎児の副腎でデヒドロエピアンドロステロン硫酸

(DHEAS) に変換され、これが再び胎盤に取り込まれて一連のエストロゲン合成が行われる (Fig. 1).⁵⁾ これら一連のステロイドホルモン合成過程が胎児の器官形成に非常に重要であることは、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であるアロマターゼの欠損症患者の症例から伺い知ることができる。⁶⁾ ヒトの場合、妊娠期のエストロゲン産生の場合、卵巣から胎盤へと移行し、先述の胎盤-胎児ユニットを形成することで性ステロイドホルモンバランスを維持しているが、アロマターゼが欠損した女児においては、アンドロゲン代謝が行われないためにアンドロゲン濃度が上昇し、仮性半陰陽 (内生殖器は女性様であるが、外生殖器は男性様) が起こる。またこの症例では、通常はエストロゲン産生能が正常である母体においても、妊娠時には進行性の男性化症状 (男性型多毛, 声の低音化, 陰核肥大な

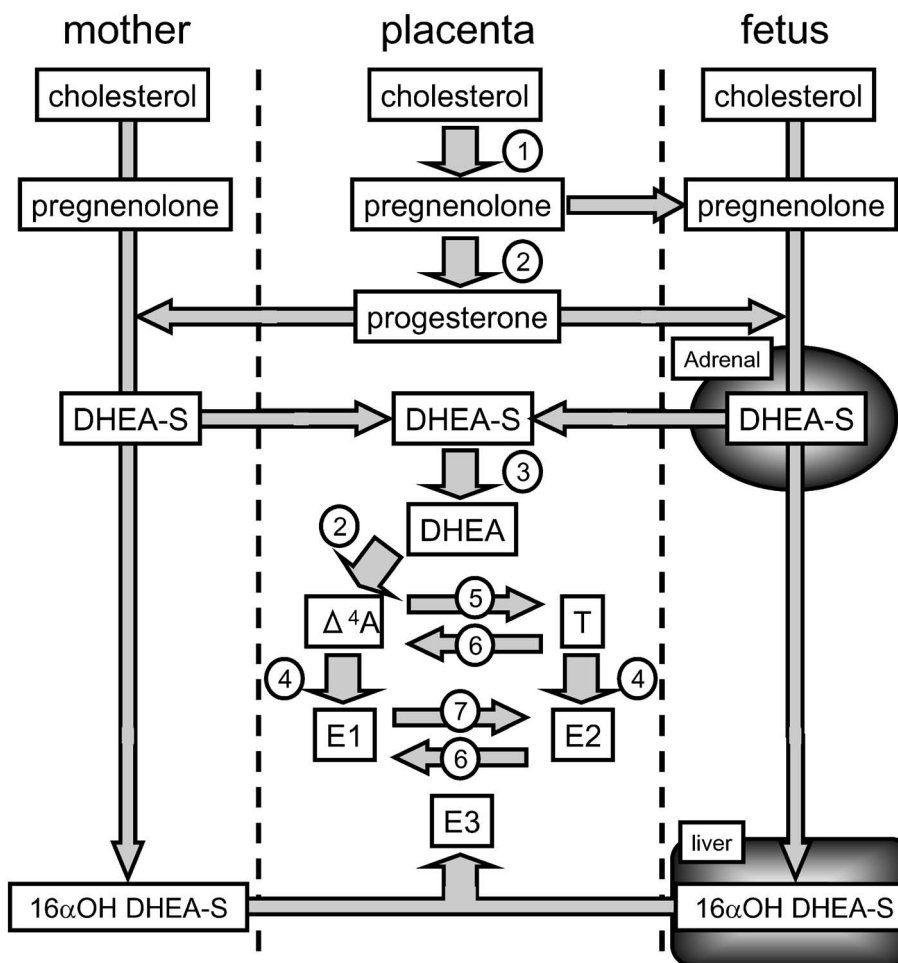


Fig. 1. Steroidogenic Pathway in the Human Fetoplacental Unit

1: P450_{scc}, 2: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type I, 3: steroid sulphatase (STS), 4: aromatase, 5: 17 β -HSD type III, V, 6: 17 β -HSD type II, 7: 17 β -HSD type I.

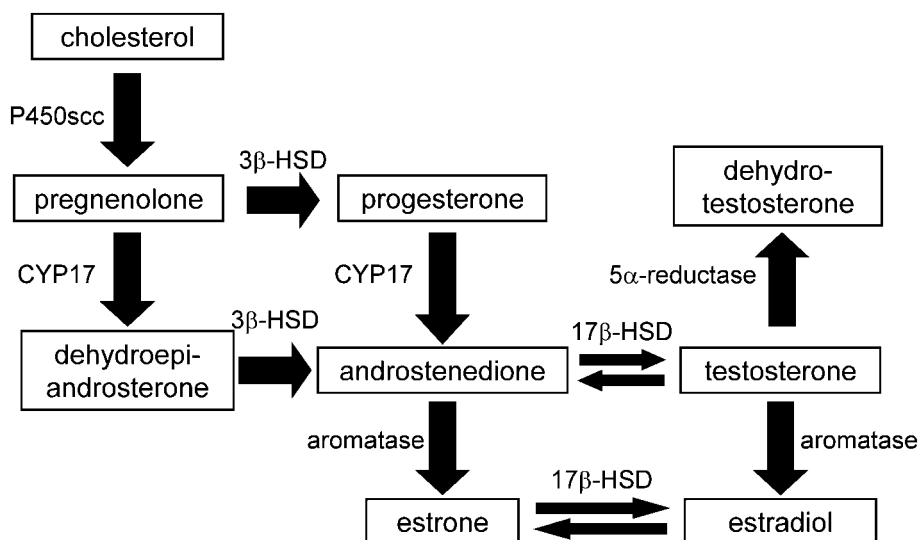


Fig. 2. The Pathway of Steroid Hormone Biosynthesis from Cholesterol

ど)が認められている。通常、妊娠経過とともに母体血中のエストロゲン濃度は顕著に増加し、妊娠末期には非妊娠時の約100倍にも達するが、これらの症例は妊娠期における主要なエストロゲン供給臓器が卵巣から完全に胎盤へ移行することを如実に示すとともに、化学物質等の影響により胎盤の内分泌機能に異常を来した場合には、胎児の器官形成に少なからず影響を与える可能性を示している。

一方で、齧歯類においても胎盤は、胎児の成長に重要な蛋白ホルモンとステロイドホルモンを産生するが、ヒトの場合とはその機能が大きく異なる。齧歯類の胎盤においても、コレステロールからプロゲステロンまで産生されるが、ヒトの胎盤とは異なりCYP17も発現していることから、単独でアンドロゲン合成まで行うことができる (Fig. 2).^{7,8)} 一方で、ヒトにおいては胎盤-胎児でユニットを形成することで胎盤からのエストロゲン産生を可能とされていたが、齧歯類の胎盤にはアロマトラーゼは発現しておらず、ステロイドホルモン合成過程においても胎児と協力的に働くことはない。また齧歯類においては、妊娠期間中も非妊娠時と同じくエストロゲン合成は卵巣で行われる。恐らく齧歯類では、胎盤で合成されたアンドロゲンが母体の卵巣に供給されることでエストロゲンが産生され、再び胎盤を経由して胎児にも供給されるものと考えられる。この事実は、アロマトラーゼ欠損マウスを用いた分娩直後の雌子マウスの解析において、ホモ欠損子マウスと野生

型の同腹子マウスとを比較しても、アロマトラーゼ欠損症患者のように特に目立った表現型が認められないことから支持される。⁹⁾

またヒトの胎盤においては、妊娠黄体からのプロゲステロン産生を促進する性腺刺激ホルモンとしてヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) が産生されるが、齧歯類においては糖蛋白ホルモンの α 鎖を合成できないためゴナドトロピンなどの糖蛋白ホルモンは産生されず、その代わりに胎盤から産生されるプロラクチン様蛋白ホルモンによって妊娠黄体のプロゲステロン産生が刺激される。¹⁰⁾ このように胎盤の内分泌機能は、胎児の器官形成に非常に重要であるにも係わらず、その機能には明確な種差が存在するのである。以上の事実は、ヒトの胎盤には存在するが齧歯類の胎盤には存在しない内分泌機能に影響を与えるような化学物質の毒性評価は、齧歯類を用いた動物実験で評価することは不可能であり、また逆にヒトの胎盤には存在しないが齧歯類の胎盤には存在する内分泌機能に影響を与える化学物質の場合には、その毒性を過大評価する可能性があることを示唆している。

3. 胎盤の内分泌機能に対する有機スズ化合物の影響

先述のように、齧歯類とヒトの胎盤の内分泌機能には大きな種差が存在することから、このような内分泌機能を修飾することで発生毒性を示す化学物質が存在した場合には、その毒性をマウスやラットの

実験結果から外挿するには限界があると思われる。そこでわれわれは、ヒト絨毛細胞株をヒトモデル胎盤細胞として用い、齧歯類には存在しない内分泌機能に影響を与える化学物質のスクリーニングを *in vitro* において検討した。内分泌かく乱作用が疑われていた種々の化学物質について検討を行ったところ、トリブチルスズ (TBT) やトリフェニルスズ (TPT) などの有機スズ化合物が、アロマトラーゼ活性や hCG 産生を nM レベルで顕著に促進することを確認した (Fig. 3).¹¹⁾ またヒトの胎盤には、エストロンを活性型エストロゲン (エストラジオール) に変換する酵素である 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I (17 β -HSD I: アロマトラーゼなどと同じく齧歯類の胎盤には存在しないアイソフォーム¹²⁾ が存在するが、これらの有機スズ化合物は 17 β -HSD I 活性も上昇させ、胎盤のエストラジオール産生を促進することも確認された (Fig. 3).^{11,13)} さらにこれらの酵素活性の上昇や、産生の上昇は、いずれにおいても mRNA の発現上昇を伴うものであった。以上の結果は、胎盤機能のヒトと齧歯類の種差の部分に作用する化学物質が存在し、有機スズ化合物の胎盤内分泌機能への作用を反映した発生毒性

は、齧歯類では評価できないことを示唆している。

TBT や TPT に代表される有機スズ化合物は、藻類や軟体動物などへの強力な殺傷力を有することから、特に船底塗料、漁網防汚剤などに積極的に用いられていたが、イボニシなどの巻貝類の雌に対して雄の性徴発達を示すインボセックスと呼ばれる現象を誘導すること^{14,15)} が明らかとなつてからは、ヒトを含む哺乳動物についても有機スズ化合物の雄性化作用等が懸念されていた。有機スズ化合物は、性ホルモン受容体には作用しない¹⁶⁾ ことから、その作用メカニズムは長い間不明であったが、最近、われわれは TBT や TPT などの有機スズ化合物がビタミン A の代謝物である 9-シス-レチノイン酸 (9cRA) をリガンドとする retinoid X receptor (RXR) と、2型糖尿病のインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体をリガンドとする peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ に対し、既知のリガンドに匹敵するほどの強力なアゴニスト作用を有することを見出した (Fig. 4).^{17,18)} 有機スズ化合物は先述の通り低濃度で顕著にヒト胎盤の内分泌機能に影響を与えるが、その後のわれわれの詳細な検討で、ヒト胎盤のアロマトラーゼや 17 β -HSD I 対

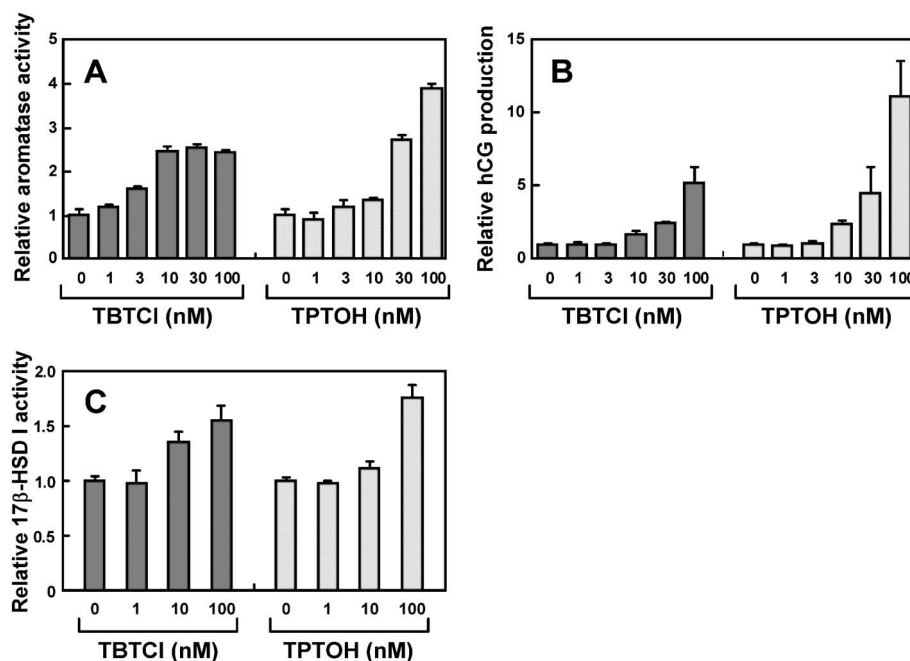


Fig. 3. Effects of Organotin Compounds on Human Placental Endocrine Functions in Jar Cells

Cells were treated with nontoxic concentrations of organotins for 48 h. A nontoxic concentration of an organotin was defined as a concentration at which the uptake of [3 H] thymidine was \geq 80% that for the vehicle alone (data not shown). Aromatase activity (A) was determined by tritium release assay. 17 β -HSD I activity (B) is assessed to determine the conversion of estrone to estradiol, which is determined by EIA. To determine hCG production (C), the cells were then washed and cultured in fresh medium for another 24 h. Culture supernatant was collected, and hCG concentration was determined by ELISA. Results are expressed as mean \pm 1 S.D. of triplicate cultures.

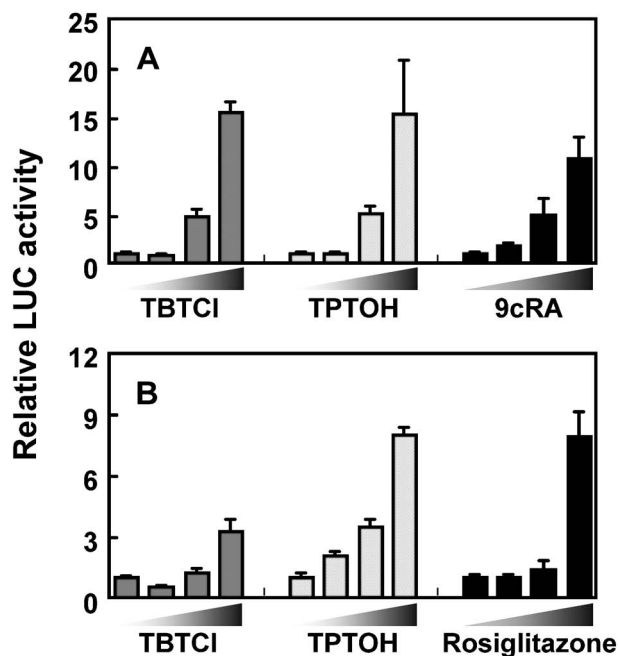


Fig. 4. Ability of Organotins to Activate RXR α (A) and PPAR γ (B)

JEG-3 cells were cotransfected with a *Firefly* luciferase (LUC) reporter plasmid containing four UAS binding sites and either GAL4-RXR α or GAL4-PPAR γ expression vectors, followed by treatment with 0, 1, 10, or 100 nm of tested compounds. The results are expressed as average fold activation \pm 1 S.D. after normalization to *Renilla* luciferase activity.

する強力な影響は、RXRを介して起こることが確認されている。¹³⁾ またhCGについては、RXR、PPAR γ の双方のアゴニストで産生を促進することが報告されている¹⁹⁾ことから、恐らく有機スズ化合物はこれらの核内受容体を介して、hCG産生を促進しているものと考えられる。低分子の脂溶性化学物質の毒性については、その多くが明確な作用点を見い出せないのが一般的であるが、このような分子レベルでの作用機構が明確になった例はそう多くはない。これらの結果は、有機スズ化合物が実験動物に対してもこれらの核内受容体を介することで、様々な毒性を発揮することを示唆している。現に、イボニシのインボセックスもRXRを介したものであることが報告されている。²⁰⁾

4. 齧歯類における有機スズ化合物の発生毒性

前節において、TBT及びTPTを始めとする有機スズ化合物が、RXRやPPAR γ を介して、齧歯類の胎盤には存在しないようなヒト胎盤内分泌機能に影響を与えることを述べた。では齧歯類の発生段階における有機スズ化合物の作用はどのようなものであろうか？ 有機スズ化合物は、元来毒性が強いこ

とから、比較的早くから哺乳動物に対して神経毒性や免疫毒性を示すことが知られており、また発生毒性に関しても多く検討がなされている。器官形成期の妊娠ラットやマウスにTBTを母体の体重増加に影響が出るほどの大量投与を行った場合には、胎児の死亡や口蓋裂などの奇形を生じると報告されているが、これらは母体への非特異的な毒性の結果であり、ラットにおいて催奇性はないと結論付けられている。^{21,22)} TPTについても、妊娠ラットを用いた検討において、母体の体重増加に影響が出るほどの大量投与を行った場合には、胎児の死亡が確認されているが催奇性はなく、また着床した胎児の性比にも影響はないと報告されている。^{23,24)} 妊娠マウスの検討では、胎児の重量には影響がない用量でTBTを投与した場合でも、骨代謝系に異常を来すことが報告されている²⁵⁾が、内分泌機能への影響についての詳細な検討はない。胎盤に対する影響に関しては、唯一、TBTを投与した検討で、マウス及びラットともに胎盤の重量が増加したという報告があるのみである。^{26,27)} これらの有機スズ化合物が、RXRとPPAR γ のリガンドとして作用することは先述の通りであるが、RXR特異的リガンドについても、妊娠マウスに影響がない程度の濃度においては催奇性が認められないと報告されており、^{28,29)} PPAR γ 特異的リガンドについては特に報告はない。RXRやPPAR γ は、マウスの胎盤形成には必須の分子ではあることは報告されている^{30,31)}が、妊娠期間中のステロイドホルモン産生に与える影響についての報告は存在しない。われわれも妊娠ラットに、母体への毒性が出ない用量の有機スズ化合物やRXR及びPPAR γ リガンドを子宮内に投与し、胎盤のステロイドホルモン合成酵素のmRNA発現とステロイドホルモン濃度について検討を行ったが、特に変動は認められなかった。

以上のことから、有機スズ化合物のような化学物質の発生毒性評価は、齧歯類を用いた実験では困難であるとともに、ヒトへの毒性を過小評価している可能性が考えられる。

5. 遺伝子導入技術を用いた発生毒性モデルの構築

では有機スズ化合物のような化学物質の毒性は、どのように評価したらよいのであろうか？ 化学物質の毒性を評価する上で、種差の問題はどのような

試験にも生じる問題である。最近このような問題を解決し、化学物質の毒性をより鋭敏に捕らえて、その毒性を予測しようとするいわゆる「トキシコゲノミクス」と称される新たな毒性学の概念が注目されている。「トキシコゲノミクス」とは、近年のめざましいゲノム研究の発展により、従来の個体レベルや細胞レベルの毒性学のみならず、毒性発現には直接的又は間接的に遺伝子/タンパク発現レベル変動を伴うという仮定の元に、毒性発現機構をよりマイクロなレベルで捕らえるものである。本概念においては、化学物質の毒性変化に関連して動く遺伝子群を解析することによって毒性発現メカニズムを解明する場合 (forward) と、既知毒性物質との遺伝子群の比較情報から未知化学物質の毒性を予測する場合 (reverse) の2方向からのアプローチが考えられている。本アプローチでは、臨床的又は動物実験で毒性が明らかとなっている化学物質の毒性発現によって変動する遺伝子群を *in vivo*, *in vitro* の双方で解析を行い、各動物の各組織における毒性データベースを構築する必要があるが、これらを構築することにより、毒性発現の種差の問題も克服できると期待されている。しかしながら発生毒性評価においては、冒頭にも述べた通り臨床的データが他の毒性に比べて圧倒的に不足しており、また齧歯類などの動物実験では先述の種差の問題が存在するため、*in vitro* で確認された遺伝子発現変動を照合する *in vivo* のデータがほとんどないのが現状ではないだろうか。したがって、このような問題を解決するためには、化学物質によって発現が変動するヒトの胎盤遺伝子群が、胎児の発育にいかなる影響を与えるのかを、実験動物を用いた *in vivo* の検討において再現できる評価系の構築が必要不可欠となってくる。そこで有用となってくるのが遺伝子改変動物を用いた検討である。すなわち胎盤特異的に任意遺伝子の発現を制御することで、胎児への影響を検討するものである。

胎盤において任意の遺伝子を発現上昇させる方法としては、胎盤特異的コンディショナルトランスジェニックマウス (P-TG マウス) を用いる方法が挙げられる。つまり齧歯類の胎盤特異的に発現する分子のプロモーターを、目的分子を発現する遺伝子上流に連結し、トランスジェニックマウス (TG マウス) を作成する方法である。このような方法での

P-TG マウスの作成については、既にいくつかの分子のプロモーターを用いて検討がなされているが、Kamat らはヒト胎盤のアロマターゼプロモーターを用いた場合でも P-TG が作成できると報告している。³²⁾ ヒトにおいてアロマターゼは、胎盤、卵巣、副腎、脳などの内分泌系組織のみならず、脂肪組織や骨、さらには乳癌組織など、正常組織から病態組織まで幅広く存在している分子である。アロマターゼをコードしている遺伝子 (CYP19) は、10個のエクソンからなる単一遺伝子であり、タンパク質はエクソン II からエクソン X にコードされている (Fig. 5)。³³⁻³⁵⁾ エクソン II の上流には少なくとも9個のエクソン I が存在しており、各々のエクソン I は、その上流にそれぞれ独自のプロモーター領域を有している。¹⁰⁾ いずれのエクソン I から転写が開始された場合でも、スプライシングによりエクソン II に接続されるため、合成されるタンパク質は同一のものとなる。これに対して、各プロモーターのシスエレメントはプロモーター毎に異なるため、その転写制御はエクソン I 毎に全く異なっている。これらのエクソン I 及びそのプロモーターは、組織特異的かつ選択的に用いられており、これにより単一遺伝子でありながら、組織間で異なるアロマターゼの転写制御を可能にしている。アロマターゼは、アンドロゲンを全く正反対の作用を有するエストロゲンに変換する重要な酵素であるため、ヒトのような高等哺乳動物においては、その発現が非常に緻密な機構で制御されているものと考えられる。胎盤のアロマターゼは、ヒトを含む一部の高等哺乳動物にしか存在しないことに加え、その発現にはエクソン II の最上流に存在するエクソン I.1 を用いていることから、エクソン I.1 は進化の過程で最後に獲得されたエクソンであると考えられるが、アロマターゼの発現が厳密に制御されているにも関わらず、ヒトのエクソン I.1 のプロモーターがマウスにおいても胎盤特異的な発現を制御できるということは非常に興味深い。Kamat らは、単なるレポーター遺伝子としてヒト成長ホルモンを用いて P-TG マウス作成しているが、代わりにアロマターゼを発現させた場合には、胎盤でアロマターゼを過剰発現させた際の胎児のフェノタイプを検討するのみならず、有機スズ化合物のような化学物質の暴露によるアロマターゼ発現変動についても評価できるかもしれない。

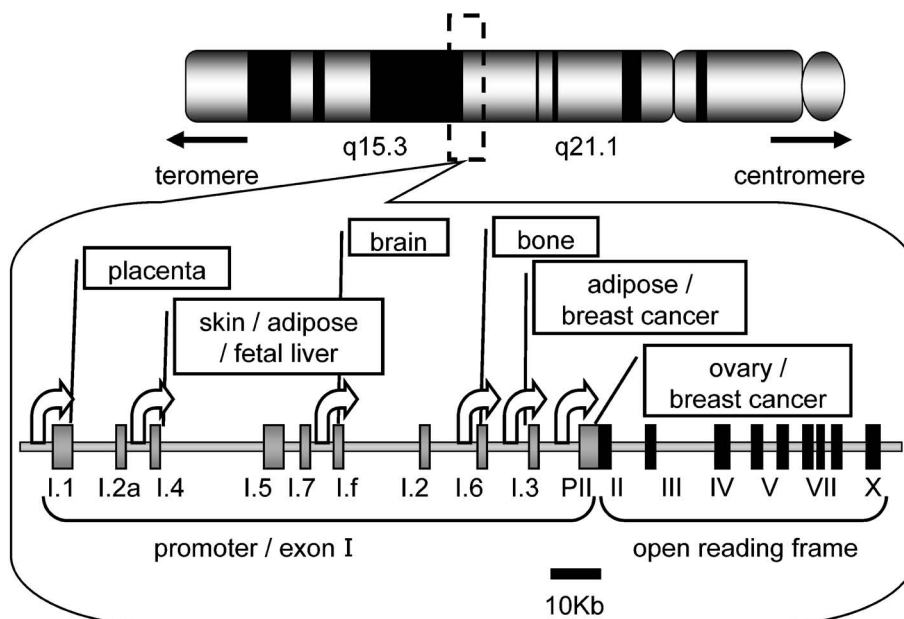


Fig. 5. Genomic Organization of the Human Aromatase (*CYP19*) Gene

しかしながら、P-TG マウスは目的分子の発現を上昇させるモデルとしては有効であるが、発現を抑制した場合の検討を行うには不適である。特に胎盤特異的プロモーターを用いた場合には、用いたプロモーターの分子が元来発現している胎盤部位でしか目的遺伝子の発現が期待できず、また発現する期間もその分子が発現する期間に限られてしまうという欠点を有している。先述のヒトアロマトラーゼエクソン I.1 のプロモーターを用いた TG マウスにおいても、発現は胎盤の labyrinthine trophoblast と呼ばれる領域だけであり、胎盤全体で発現している訳ではない。³²⁾ 当該分子の発現を抑制するモデルとしては、コンディショナル・アレルを持っているマウスと、適切なりコンビナーゼを発現している TG マウス交配させることで作成できるコンディショナルノックアウトマウスが考えられるが、コンディショナル・アレルを持っているマウスの作成に時間が掛かるという問題点がある上、胎盤特異的に目的遺伝子をノックアウトにする際には、胎盤特異的プロモーターを用いてリコンビナーゼを発現する TG マウスを作成する必要もあるために、先の問題を解決することはできない。

その一方で Okada らは、最近レンチウイルスベクターを用いて胎盤だけに目的遺伝子を発現させることに成功している。³⁶⁾ HIV-1 に代表されるレンチ

ウイルスベクターはレトロウイルス科に属するウイルスであるが、非分裂細胞にも感染し、ウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれることから、TG マウスの作成に応用されている。³⁷⁾ レンチウイルスベクターを用いて作成した TG マウスでは、従来のレトロウイルスベクターのように、導入した遺伝子がメチル化されることによるサイレンシングはない。また最近では RNA 干渉法を利用し、short hairpin RNA を発現するコンストラクトを導入することでノックダウン TG マウスを作成する試みがなされているが、このようなマウスの作成においてはマイクロインジェクション法を用いた方法よりもレンチウイルスベクターを用いた方が利点が多いようである。³⁸⁾ 通常、レンチウイルスベクターを用いて TG マウスを作成する際には、マイクロインジェクション法と同様に 2—4 細胞期胚に感染させることで目的遺伝子を導入するが、この際には目的遺伝子の発現をプロモーターなどで制御しない限りは、胎盤と胎児の双方に目的遺伝子が発現する。しかし Okada らは、レンチウイルスベクターをマウス受精卵の胚盤胞期に感染させることで、胎盤だけに目的遺伝子を発現させられることを見出した。³⁶⁾ 恐らくこの時期の栄養外胚葉では、既に強固なタイトジャンクションが形成されているため、物理的に受精卵表面の栄養外胚葉にしかウイルスが感染できずに、

結果的に胎盤特異的な遺伝子発現を実現しているものと思われる。現在、われわれもこの手法を用いて、アロマターゼなどのヒト胎盤特異的な内分泌機能遺伝子をマウス胎盤に導入した際の胎児への影響について検討を行っているところである。

以上のような胎盤特異的遺伝子導入法は、今後の発生毒性研究の方向性を大きく変えるツールとなるかもしれない。

6. おわりに

本稿では、発生毒性評価の問題点を胎盤内分泌機能に絞って概説した。また胎盤特異的な遺伝子導入法が、発生毒性評価の抱える問題点を解決できる可能性についても述べた。しかしながら齧歯類とヒトでは、「胎盤の構造自体が異なる」、「齧歯類の新生児はヒトでは妊娠3—4ヵ月の胎児にしか相当しない」、「妊娠期間が異なる」、など解決し難い根本的な種差が多いのも事実である。したがって、より正確に発生毒性評価を行うには、何よりも実験動物とヒトとの発生段階における様々な生理的イベントを十分に把握し、その違いを理解した上で、評価を行うことが肝要であろう。分子生物学的アプローチにより、今後益々、発生段階における様々な生理的イベントが解明されることを期待するとともに、これらの手法が発生毒性評価にフィードバックされることを祈願したい。

謝辞 本総説で紹介させていただいた研究成果は、大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野において得られたものであり、ご指導とご助言を賜りました田中慶一先生（現大阪大谷大学薬学部）に感謝致します。また研究遂行に当たりご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科実践薬学教育研究センター西川淳一先生、大阪大学微生物病研究所附属感染動物実験施設伊川正人先生、並びに実験の遂行にご協力いただきました大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の諸氏に感謝致します。本総説で紹介した研究内容の一部は、文部科学省/日本学術振興会科学研究費補助金、新エネルギー産業技術総合開発機構（NEDO）産業技術研究助成事業助成金、厚生労働省科学研究費補助金、日本化学工業協会長期自主計画（LRI）により行われたものであり、ここに感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kranofsky D. A., "Taratology," eds. by Wilson J. G., Warkany J., Principles and Techniques, University of Chicago Press, Chicago, 1965, pp. 185–213.
- 2) Ema M., Ohe N., Suzuki M., Mimura J., Sogawa K., Ikawa S., Fujii-Kuriyama Y., *J. Biol. Chem.*, **269**, 27337–27343 (1994).
- 3) Zhang L., E X., Luker K. E., Shao J. S., Levin M. S., Suh E., Li E., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **282**, G1079–1087 (2002).
- 4) Payne A. H., Hales D. B., *Endocr. Rev.*, **25**, 947–970 (2004).
- 5) Albrecht E. D., Pepe G. J., *Endocr. Rev.*, **11**, 124–150 (1990).
- 6) Shozu M., Akasofu K., Harada T., Kubota Y., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **72**, 560–566 (1991).
- 7) Greco T. L., Payne A. H., *Endocrinology*, **135**, 262–268 (1994).
- 8) Warshaw M. L., Johnson D. C., Khan I., Eckstein B., Gibori G., *Endocrinology*, **119**, 2642–2648 (1986).
- 9) Fisher C. R., Graves K. H., Parlow A. F., Simpson E. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6965–6970 (1998).
- 10) Nilson J. H., Bokar J. A., Clay C. M., *Biol. Reprod.*, **44**, 231–237 (1991).
- 11) Nakanishi T., Kohroki J., Suzuki S., Ishizaki J., Hiromori Y., Takasuga S., Itoh N., Watanabe Y., Utoguchi N., Tanaka K., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 2830–2837 (2002).
- 12) Peltoketo H., Nokelainen P., Piao Y. S., Vihko R., Vihko P., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 431–439 (1999).
- 13) Nakanishi T., Hiromori Y., Yokoyama H., Koyanagi M., Itoh N., Nishikawa J., Tanaka K., *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 1349–1357 (2006).
- 14) Horiguchi T., Shiraishi H., Shimizu M., Morita M., *Environ. Pollut.*, **95**, 85–91 (1997).
- 15) Matthiessen P., Gibbs P. E., *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**, 37–43 (1998).
- 16) Nishihara T., Nishikawa J., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa M.,

- Takatori S., Kitagawa Y., Hori S., Utsumi H., *J. Health Sci.*, **46**, 282–298 (2000).
- 17) Nakanishi T., Nishikawa J., Hiromori Y., Yokoyama H., Koyanagi M., Takasuga S., Ishizaki J.I., Watanabe M., Isa S.I., Utoguchi N., Itoh N., Kohno Y., Nishihara T., Tanaka K., *Mol. Endocrinol.*, **19**, 2502–2516 (2005).
- 18) Kanayama T., Kobayashi N., Mamiya S., Nakanishi T., Nishikawa J., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 766–774 (2005).
- 19) Tarrade A., Schoonjans K., Guibourdenche J., Bidart J.M., Vidaud M., Auwerx J., Rochette-Egly C., Evain-Brion D., *Endocrinology*, **142**, 4504–4514 (2001).
- 20) Nishikawa J., Mamiya S., Kanayama T., Nishikawa T., Shiraishi F., Horiguchi T., *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 6271–6276 (2004).
- 21) Davis A., Barale R., Brun G., Forster R., Gunther T., Hautefeuille H., van der Heijden C. A., Knaap A. G., Krowke R., Kuroki T., Loprieno N., Malaveille C., Merker H. J., Monaco M., Mosesso P., Neubert D., Norppa H., Sorsa M., Vogel E., Voogd C.E., Umeda M., Bartsch H., *Mutat. Res.*, **188**, 65–95 (1987).
- 22) Noda T., Morita S., Yamano T., Shimizu M., Nakamura T., Saitoh M., Yamada A., *Toxicol. Lett.*, **55**, 109–115 (1991).
- 23) Noda T., Morita S., Yamano T., Shimizu M., Yamada A., *Toxicol. Lett.*, **56**, 207–212 (1991).
- 24) Giavini E., Prati M., Vismara C., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**, 936–939 (1980).
- 25) Tsukamoto Y., Ishihara Y., Miyagawa-Tomita S., Hagiwara H., *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 739–746 (2004).
- 26) Itami T., Ema M., Amano H., Murai T., Kawasaki H., *Drug Chem. Toxicol.*, **13**, 283–295 (1990).
- 27) Baroncelli S., Karrer D., Turillazzi P. G., *Toxicol. Lett.*, **50**, 257–262 (1990).
- 28) Kochhar D. M., Jiang H., Penner J. D., Beard R. L., Chandraratna A. S., *Chem. Biol. Interact.*, **100**, 1–12 (1996).
- 29) Jiang H., Penner J. D., Beard R. L., Chandraratna R. A., Kochhar D. M., *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 669–676 (1995).
- 30) Wendling O., Chambon P., Mark M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 547–551 (1999).
- 31) Barak Y., Nelson M. C., Ong E. S., Jones Y. Z., Ruiz-Lozano P., Chien K. R., Koder A., Evans R. M., *Mol. Cell*, **4**, 585–595 (1999).
- 32) Kamat A., Graves K. H., Smith M. E., Richardson J. A., Mendelson C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 4575–4580 (1999).
- 33) Simpson E. R., Mahendroo M.S., Means G. D., Kilgore M. W., Hinshelwood M. M., Graham-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher C.R., Michael M. D., Mendelson C. R., Bulun S. E., *Endocr. Rev.*, **15**, 342–355 (1994).
- 34) Sebastian S., Bulun S. E., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 4600–4602 (2001).
- 35) Bulun S. E., Sebastian S., Takayama K., Suzuki T., Sasano H., Shozu M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **86**, 219–224 (2003).
- 36) Okada Y., Ueshin Y., Isotani A., Saito-Fujita T., Nakashima H., Mizoguchi A., Oh-hora M., Mori Y., Ogata M., Oshima R. G., Okabe M., Ikawa M., *Nat. Biotech.* (in press).
- 37) Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y., Verma I. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2140–2145 (2002).
- 38) Tiscornia G., Singer O., Ikawa M., Verma I. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1844–1848 (2003).