

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

薬理学的影響に関するスクリーニング法の開発研究

分担研究者 小島 幸一（財）食品薬品安全センター 秦野研究所・中央試験管理部

研究要旨：

ラット血清中のホルモン濃度を測定するためのヒト用市販キットの有用性を検討し、かつコントロールデータを収集した。エストラジオールは現時点では、測定法に問題が多いと考えられた。性成熟期開始時期として、膣開口時期に関する背景データを収集し、これのスクリーニングへの利用の可能性を検討した。エストロゲン受容体を持つ細胞の一例として培養骨芽細胞の培養系での内分泌かく乱化学物質等の影響の検出系を検討した。

A. 研究目的

ラット血清中のホルモン濃度を測定するためのヒト用市販キットの有用性を検討する。我々の確立・検討してきた検査・検出法を利用するとともに、新たな方法の確立も視野に入れ、*in vivo* および *in vitro* の両面から、内分泌かく乱物質等の薬理学的影響を明らかにする検出系の確立に努める。

B 研究方法

1. ラット血清中ホルモン測定法の確認：ラット血清中のホルモン濃度を測定するために、測定条件の検討およびその有用性の確認を行い、一部については、コントロールデータの収集を行った。本年度は、トリヨードサイロニン (T3)、サイロキシシン (T4)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH)、プロラクチン (PRL)、テストステロン (TS)、エストラジオール (E2) 8 種の市販キットについて検討した。

2. Crj:CD(SD) 系 雌 ラ ッ ト 及 び Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットの性成熟に至る

生殖学的値の比較：Crj:CD(SD)系雌ラット及び Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットを、それぞれ同系統の雄ラットと交配させ、得られた妊娠動物を自然分娩させた。出生児は、出生日を 0 日齢として、原則として各母動物に雌雄あわせて 8 匹を哺育させた。生後 22 日に離乳し、雌ラットの性成熟開始の指標である膣開口の有無を 28 日齢から毎日観察した。膣の開口が認められた動物は、その日齢を記録し、体重を測定した。

3 細胞を用いた系による骨代謝：96 穴マイクロタイタープレートに、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞 (MG-63, SaOS-2, HOS) 及び正常骨芽細胞を蒔き (10^4 /well)、化学物質 (本年度はフタル酸誘導体をモデル物質として主に検討、BBp, DHp, DpeP, DBP, DproP, DEHA, DEP, DCHP) を加えた培地 (フェノールレッドを含まない α MEM+10% FCS) で、2 日ないし 4 日培養し、ALP 活性 (blue-phos キット) 及び細胞数 (WST-1 法) を測定した。ALP 活性は 620 nm、細胞数は 450 nm の吸光度で表し、同一のプレートで行った化学物質無添加の対照群と比較

した。

C. 研究結果

1. ラット血清中ホルモン測定法の確認：ラット用の測定キットを用いた TSH、FSH、LH 及び PRL の測定には、特に問題はなかった。一方、ヒト用のキットを用いた T3、T4、TS および E2 ではいずれの項目においても、添加回収率はほぼ良好であった。しかし一方、T3、T4 及び TS で良好な希釈直線性が得られたのに対して、E2 では得られなかった。さらに、E2 の測定値のレベルは、文献値の約 10 倍以上と高いものとなった。この ELISA で性周期に伴う E2 の変化を調べたところ、発情前期に最も値が高くなり、発情期や発情後期では低くなったことから、生体内での E2 レベルの変化は捉えられるものの、測定上の問題は残った。E2 を除く 7 種のホルモンを、未処置の Crj:CD(SD)IGS (T3 と T4 は Crj:CD(SD)) で測定した結果、採血時期と時間、採血方法等もホルモンの測定値に重要な影響を与える因子である事が分かった。

2. Crj:CD(SD) 系 雌 ラ ッ ト 及 び Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットの性成熟に至る生殖学的値の比較：膣の開口が認められた動物について、その日齢と体重を測定した結果、Crj:CD(SD) 系ラットの膣開口は 32 日齢から 41 日齢の間に認められたのに対し、Crj:CD(SD)IGS 系ラットの膣開口はそれよりやや早い 29 日齢から 40 日齢の間に認められた。平均 (± 標準誤差) 膣開口日齢を両系の間で比較すると、Crj:CD(SD) 系ラットは 35.4 (± 0.2) であるのに対して、Crj:CD(SD)IGS 系ラットは 33.3 (± 0.3) と有意に低かった。しかし、膣開口日における体重については、両者で有意差は認められなかった。今回は、背景データを得るために観

察例数を増やしたため、Crj:CD(SD) 系ラットと Crj:CD(SD)IGS 系ラットとの間で性成熟の開始時期に有意な差が認められた。

3. 細胞を用いた系による骨代謝：MG-63 の ALP 活性に及ぼす $17\beta\text{E}$ ($10^{-11}\sim 10^{-5}\text{M}$) の影響を示した。2 日処理では、 $10^{-7}\sim 10^{-5}\text{M}$ で ALP 活性の低下傾向が認められたのに対して、4 日処理では増加が認められた。

フタル酸誘導体の存在下で、MG-63 を 2 日間培養した時の ALP の測定結果、 10^{-9}M の DHP 処理、 10^{-6} および 10^{-5}M の DPeP 処理、 10^{-7}M の DBP 処理で ALP 活性が上昇した。しかし、ALP 活性を抑制する物質も他に見られた。同様に、ヒト骨芽細胞を用いた時の結果、 10^{-6} 及び 10^{-5}M の DCHP 処理で ALP 活性の上昇が認められたが、低濃度では減少した。また、 $17\beta\text{E}$ による影響は認められなかった。一方、その他の細胞を用いた系では、現時点では、化学物質の効果に関する確たる結果は得られていない

D. 考察

ホルモン測定のため、市販キットの有効性を検討した。内分泌かく乱化学物質の影響を捉えるために有効と考えられるホルモンのうち、エストラジオールは現時点では問題が多いと考えられた。また、背景データの収集を行った。

生殖発生毒性試験に用いられるようになった Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットの性成熟開始時期を、従来用いられてきた Crj:CD(SD) 系雌ラットのそれと比較検討した。性成熟開始時期に関する背景データを収集し、これらの動物のスクリーニングへの利用の可能性を検討した。その結果、両系ともに膣開口時期が長期間にわたって分布し、化学物質の生殖機

能かく乱性に関するスクリーニングにおける指標とするためには、膣開口時期の揃った系統をさらに検索する必要があると考えられた。

ヒト培養骨芽細胞に及ぼす $17\beta E$ の影響を適切に捉えることがこの評価での重要なポイントとなるが、現時点では十分ではなく、さらに実験条件をつめる必要がある。予備的にフタル酸誘導体の影響を比較検討し、興味ある結果も得られたので、より一層実験条件の確立に努め、内分泌かく乱化学物質等の影響の検討に移りたい。

今回は、背景データを得るために観察例数を増やしたため、Crj:CD(SD)系ラットとCrj:CD(SD)IGS系ラットとの間で性成熟の開始時期に有意な差が認められた。しかし、いずれの系も10日以上に及ぶ長い期間に亘って膣開口日齢が分布しているため、観察例数の減少は感度の著しい低下に繋がり、有意差の検出は困難になるものと危惧される。また、化学物質の影響を評価するためには、これらの背景データの観察期間よりもさらに長い期間に亘って膣開口の有無を観察する必要も生ずることがあるといえる。従って、膣開口時期を化学物質の生殖機能かく乱性に関するスクリーニングにおける指標とするために

は、こうしたばらつきの大きな動物より、少数例でも性成熟日齢の変動が検出できる、膣開口時期の揃った動物を使用する必要があるものと考えられた。

一方、細胞を用いた骨代謝への影響を検討したが、その結果、特にMG-63細胞を用いた系では、4日処理で、細胞数の減少傾向も認められたことから、個々の細胞の機能の亢進が考えられた。しかし、2日処理の結果との間に相違があること、4日処理では途中の培地交換による影響を考慮する必要があることなど、再現性の確認も含めて、さらに条件設定のための検討が必要である。

E. 結論

ヒト正常骨芽細胞及びエストロゲン受容体の存在が明らかにされているヒト骨肉腫由来のMG-63細胞を用いてエストロジェンの骨代謝に及ぼす影響を検討したが、培養中に 17β -エトラジオールあるいはフタル酸エステル誘導体を添加しても細胞数および培養液中のアルカリホスファターゼ活性に変化は認められなかった。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響とそのスクリーニング法の開発

分担研究者 鈴木 恵真子 （財）食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨：

内分泌かく乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響とそのスクリーニング法の開発カテコールエストロゲン（CE）メルカプツール酸はエストロゲン発がんのリスクマーカーになり得ると永年考えられてきたが、測定法がないためこれまで尿中に証明されていない。今年度は、4-ヒドロキシエストロン・メルカプツール酸のモノメチル体を標品として合成し、その性質を明らかにした。また、調製したCEメルカプツール酸の抗血清を用いて固定化抗体カラムを製作し、E2投与ラット尿中にCEメルカプツール酸をはじめて証明した。

さらに、15 α -ヒドロキシエストロゲン（3種）のBSA結合物を合成し、十分な力価の抗血清を得た。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様の影響をエストロゲンによる発がんに的を絞り、尿中リスクマーカーの検出で全体を捉える。エストロゲン発がんのリスクマーカーとしてCEメルカプツール酸の測定法の開発と併行してCEおよび15 α -ヒドロキシエストロゲン（15 α -OHEs）の測定法の開発を行う。

B 研究方法

I) 4-OHE₂-2SR のモノメチル体の合成と *in vitro* O-メチル化

1. 4-OHE₂-2SR 3-メチルエーテル (4-OHE₁-2SR 3Me) の合成 .

無水酢酸とピリジンの存在下常法でアセチル化して4-OHE₂-2SRの2,3-ラクトン4-アセテート(1)を得た。これをメタノール・塩酸で処理するとアセチル基はそのままでラクトン環がメタノール分解し、4-OHE₂-2SRのアセテート-メチルエステル(2)が得られた。2をジアゾメタンでメチル化し、

3-メチルエーテル体(3)としてからアルカリで加水分解して目的とする3-メチルエーテルを得た。

2. 4-OHE₁-2SR 4-メチルエーテル (4-OHE₁-2SR 4Me) の合成.

反応に際してピリジンは無水酢酸の存在下アセチル化の触媒として働くため、無水酢酸のみで処理したところ期待通り4-OHE₁-2SRの2,3-ラクトン(4)が得られた。そこで、同様にジアゾメタンでメチル化して、4-メチル体(5)としてから、メタノール性アルカリで加水分解して目的とする4-メチルエーテルを得た。

3. 4-OHE₁-2SR の O-メチル化.

Sprague-Dawley ラット (オス、8週齢) の肝 cytosol をカテコール-Oメチルトランスフェラーゼ源として用い、S-アデノシルメチオニンとMg²⁺イオンの存在下4-OHE₁-2SRのメチル化を検討した。同一条件で4-OHE₁のメチル化を行い両者を比較した。アッセイ条件は既報 (Suzuki, E. et al, 1993)

に準じた。HPLC カラムは Inertsil ODS-2 (15×0.46 cm id) を用い、移動相には 0.5% NH₄H₂PO₄ (pH 3.5)/テトラヒドロフラン/アセトニトリル (5:1:1 又は 10:3:3) を流速 1.0 または 0.8 mL で使用し、280 nm で検出した。

II) CE メルカプツール酸の測定法の開発

1. 免疫原の合成

CE メルカプツール酸のカルボキシル基を利用して合成することとし、CE メルカプツール酸を直接ウシ血清アルブミン (BSA) と活性エステル法を用いて結合させた。すなわち、2-OHE₁-ISR をジメチルスルホキシドに溶解し、N-ヒドロキシこはく酸イミドを加え、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩で脱水縮合反応を行い活性エステルを得た。この反応液を BSA の 50 mM リン酸緩衝液に加え、ハプテン-BSA 結合反応を行った。得られたゲル状の反応液を PD-10 を用いてゲル濾過し、BSA 画分を分取、凍結乾燥して免疫原を得た。他の3種の CE メルカプツール酸についても同様に反応し、目的物を得た。なお、各免疫原を硫酸で加水分解後、吸光光度分析により求めた 2-OHE₁-1SR、2-OHE₁-4SR、4-OHE₁-2SR、4-OHE₁-2SR 3Me の ハプテン-BSA 結合モル比は各々 13、16、22、24 であった。

2. 抗血清の作製

上記4種の免疫原 (1mg) の 0.9% 食塩水 (0.5 mL) を complete Freund's adjuvant (0.5 mL) で乳化し、各々 (1 mL) をウサギの背に1群3匹で2回/月 皮内注射した。通常エストロゲンはこの条件で十分な力価の抗血清が得られるが、今回は力価の上昇を認めなかった。そこで、2倍量の免疫原を同様

に1~2回/月皮内注射したところ 2-OHE₁-1SR の3匹中2匹に力価の上昇を認め、5カ月後に抗血清を得た。

3. 固定化抗体カラムの調製

得られた抗血清の内、特異性の広い抗血清をプロテインAカラムで精製、凍結乾燥し IgG を得た。50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解してアフィゲル 10 と反応させた後、未反応の活性基は 1M エタノールアミン-塩酸塩 (pH 8.0) で不活性化した。

4. 測定条件

HPLC カラムは Inertsil ODS-3 (15×0.46 cm id) を用い、移動相は 0.5% NH₄H₂PO₄ (pH 3.5)/アセトニトリル/メタノール (70:26:8) を流速 1.0 mL/min で用いた。検出器は MODEL 5010 Analytical cell 付 NBS Coulochem MODEL 5100A を用い、設定電位+0.15V で測定した。

5. 固定化抗体カラムを用いる CE および CE メルカプツール酸の測定法の開発

50mM リン酸緩衝液 (0.25%アスコルビン酸含有、4 mL) に CE (2-OHE₂、4-OHE₂、2-OHE₁、4-OHE₁) と CE メルカプツール酸 (2-OHE₁-1SR、2-OHE₁-4SR、4-OHE₁-2SR) を添加し、固定化抗体カラム (ゲル:0.9 mL) に通導、50mM リン酸緩衝液 (0.001%アスコルビン酸含有、4 mL) にて洗浄後、95%メタノール (0.001%アスコルビン酸含有) で溶出した。溶出液を減圧下 37°C にて乾固し、HPLC で測定した結果、これら7物質が 1 (2) ~15 ng の範囲で一斉分析出来ることが明らかとなった。

6. 尿中代謝物の同定

Sprague Dawley ラット (IGS, メス, 7週齢, 4匹) に E₂ を 5 mg/kg 投与し、24 hr 尿を3日間採取し測定まで-80°Cで保存した。

72 hr プール尿の一定量をフィルター過後、50mM リン酸緩衝液で希釈、固定化抗体カラムに通導し、同様に測定した。得られたクロマトグラムを Figure 5 に示した。尿 1 mL 中の平均値は、2-OHE₁:120ng, 2-OHE₁-1SR :7.0 ng, 2-OHE₂: 5.6 ng, 2-OHE₁-4SR: 4.0 ng であった。

C. 研究結果および考察

CEメルカプツール酸は、一部メチル化をうけて尿中に排泄されると予測されるため、まず、4-ヒドロキシエストロン 2-S-N-アセチルシステイン (4-OHE₁-2SR) のモノメチル体 (4-OHE₁-2SR 3Me と 4-OHE₁-2SR 4Me) の合成法を検討した。常法に従ってジアゾメタンを用いて 4-OHE₁-2SR を直接メチル化後、生成したモノメチル体を分離する方法を検討したが、この方法では 4-メチル体が得られなかった。そこで、4-OHE₂-2SR が脱水縮合して7員環ラク톤を生成する性質 (Suzuki E. et al, 1996) を利用する方法について検討した結果、両者を高収率で選択的に合成することが出来た (Figure 2、Figure 3)。これらを標品として用いて、*in vitro* O-メチル化を検討したところ 4-OHE₁ はすでに報告 (Teranishi M. et al., 1983) されている通り、4-メチル体を主に生成したが、4-OHE₁-2SR は予期に反して 3-メチル体 (チオエーテルのオルト位のメチル体) のみを生成するという結果が得られた (Figure 4)。2-OHE₁-1-S-γ-グルタチオンを投与すると 2-OHE₁-1-S-3-メチルエーテル (チオエーテルのメタ位のメチル体) が得られたという報告とは逆の位置が選択的にメチル化されており興味深い。

つぎに、CEメルカプツール酸の分析法を

検討した。CE および CEメルカプツール酸は化学的に不安定で、かつ尿中には微量しか存在しない上、体液中には構造の酷似するステロイドが多く存在するため、通常の方法では測定が困難である。そこで、免疫化学的手法を用いて測定することとし、2-OHE₁ の CEメルカプツール酸 2種 (2-OHE₁-1SR と 2-OHE₁-4SR、Figure 5) と 4-OHE₁-2SR とその 3-メチル体 計 4種の BSA 結合物を合成した。これを家兎に注射免疫し、力価の上昇を認めた抗血清を用いて固定化抗体カラムを作製した。標準品のリン酸緩衝液をこのカラムに通導して clean-up した。HPLC で測定し、ECD (電気化学検出器) で検出した結果、CE (2-OHE₁、2-OHE₂、4-OHE₁、4-OHE₂) および CEメルカプツール酸 (2-OHE₁-1SR、2-OHE₂-4SR、4-OHE₂-2SR) を同時に測定出来ることが明らかとなった。本法を用い E₂ を投与したラット尿について検討した結果、2-OHE₁、2-OHE₂、2-OHE₁-1SR および 2-OHE₁-4SR を尿中に同定することが出来た (Figure 5)。CEメルカプツール酸の存在は予測されていたが、これまでチオエーテル結合を切断して間接的に証明されていたに過ぎず、E₂ 投与尿中に 2-OHE₁-1SR と 2-OHE₁-4SR を直接証明したのは、今回が初めての例である。GSH との反応では 2-OHE₁-1SG と 2-OHE₁-4SG は同量生成すると予想されるが、尿中には 2-OHE₁-1SR が主として生成するのは興味深い。これはメチル化に対する反応性の差に基づくと推測している。

F. 研究発表

1 論文発表

Suzuki, E., Abe, J., Karasawa, S., and

Matsuki, Y: Enzymic and Chemical O-methylation of a 4-Hydroxyestrone N-Acetylcysteine Conjugate, Steroids, 63 672-677 (1998).

2 学会発表

鈴木恵真子, 阿部純二, 椛澤誠司, 松木容彦: カテコールエストロゲンの N-アセチルシステイン抱合 (3) 一標品の合成。日本薬学会第 118 年会講演要旨集 Vol.3, p. 110 (1998) .

鈴木恵真子, 中込まどか, 橋本光宣, 安居院学, 飯田さやか, 今野和則, 原 康夫, 松木容彦, 今井 清, 小野 宏, 栗原博之: 15 α -ヒドロキシエストロゲンの特異抗血清の調製。日本薬学会第 119 年会, 1999. 3.

中込まどか, 鈴木恵真子: カテコールエストロゲンおよびその抱合体の測定 (1) ー固定化抗体カラムの作製ー。日本薬学会第 119 年会, 1999. 3.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の胎生期および新生児期暴露による

視床下部神経核の構造変化と生殖異常

分担研究者 長尾 哲二 （財）食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨：

ビスフェノール A (BPA)あるいはエストラジオールベンゾエート(EB)をラットの新生児期に皮下投与し、成熟後の視床下部神経核、特に雄の性的二型核の構造変化と生殖機能障害性の有無を交尾行動および授胎能実験により確認した。その結果、BPA 群ではいずれの生殖関連指標にも投与の影響は認められなかったが、EB 群では性的二型核の体積が対照群の 35%に減少し、交尾行動の減弱ならびに授胎能の低下がみられ、性的二型核が生殖機能に関連していることが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の胎生期あるいは新生児期曝露による CNS 障害に起因した生殖機能障害を明らかにすることを目的とした。すなわち、ラットを用いて、経胎盤的に、または血液-脳関門あるいは血液-精巣関門が完成していない新生児期に、内分泌かく乱作用が報告されている数種の化学物質を連日投与し、胎児あるいは新生児視床下部のアポトーシス誘発ならびに成熟後の視床下部神経核 SDN-POA あるいは AVPVN-POA の構造変化を調べ、次いで、交尾行動の観察および精子検査を含む受（授）胎能の確認ならびに性ホルモン濃度測定を実施し、併せて生殖器官の病理組織学的観察を行う。これらの結果を併せて視床下部神経核の構造変化が、後の生殖機能とどのように影響を及ぼすかを検討し、胎児期ならびに新生児期の視床下部神経核の構造変化が、内分泌かく乱作用を有する化学物質の生殖への影響のスクリーニングのための一つの指標となり得るかについて検討する。

B. 研究方法

今年度は予備的検討として、内分泌かく乱作用が報告されている化学物質 bisphenol A をラットの新生児期に投与し、成熟後の SDN-POA の構造変化と生殖機能障害性の有無を交尾行動の観察ならびに授胎能実験を実施した。さらに内分泌かく乱作用を有する数種の化学物質の生殖機能障害性についても併せて予備検討した。

Sprague-Dawley 系ラット(CD, IGS)を自然分娩させ、出生日（生後 0 日）翌日より 5 日間毎日、bisphenol A (BPA) 300 $\mu\text{g/g}$ 体重あるいは estradiol benzoate (EB) 2 $\mu\text{g/g}$ 体重を皮下投与した。対照群にはコーン油 (2 $\mu\text{L/g}$) を投与した。生後 21 日に離乳させ、各群雌雄各 5 匹の出生児を灌流固定して生殖器官（精巣、精巣上体、精嚢、前立腺）を病理組織学的に観察した。残りの出生児は 10 週齢時に無処置雌雄動物と同居させ、受（授）胎能の有無を確認するとともに、雄については交尾行動を観察した。14 週齢時に剖検し、生殖器官の病理組織学的観察ならびに重量測定を行った。

授胎能の有無の確認後、各群の雄について

交尾行動（性行動）を観察し、生殖機能を再度確認した。すなわち、性ホルモン処理して発情させた雌（卵巣摘出雌に 0.5 mg progesterone / animal、2 µg estradiol benzoate / animal 投与）と同居させ、その間、交尾行動（mount、intromission、ejaculation までの時間ならびにその回数）を観察した。

2. 内分泌かく乱作用が報告されている数種の化学物質、estradiol 17β (E₂)、estriol (E₃)、ethynyl estradiol (EE)、buthyl benzyl phthalate (BBP)、nonylphenol (NP)あるいは tamoxifen (TAM)の生後 1～5 日のラット新生児期投与による成熟後の生殖機能に及ぼす影響について予備的に検討した。すなわち、E₂ 2 µg/g (sc)、E₃ 2 µg/g (sc)、EE 2 µg/g (po)、BBP 500 µg/g (sc)、NP 500 µg/g (sc)あるいは TAM 20 µg/g (sc)を生後 1～5 日に 1 日 1 回、連日投与し、性周期、受胎能、交尾行動、精子運動性ならびに生殖器官の病理組織学的変化について調べた。

C. 研究結果および考察

1. 生後 1～5 日の投与期間中に新生児の死亡はなく、離乳までの生存率は BPA 群ならびに EB 群とも対照群と同レベルであった。さらに離乳後も BPA 群、EB 群の雌雄動物に死亡例はなかった。生後発育に関しては、EB 群の雌雄とも体重が投与期間終了から 14 週齢まで対照群と比較して低値で推移したが、BPA 群の体重増加は対照群と同レベルであった。歯牙萌出、皮膚毛生、眼瞼開裂など一般分化の完成時期には BPA あるいは EB 投与の影響はみられなかったが、性成熟に関しては、EB 群の雄では精巣下降および包皮分離の時期が遅延し、雌では膈開口の時期が早まった。BPA 群の性成熟の時期は、雌雄と

も対照群と差はなかった。BPA 群では、交尾率 [B/A] および受胎率 [C/B] には対照群との間に有意差はなく、さらに妊娠雌の 1 腹平均の生存胚数も対照レベルであった。一方、EB 群では雌雄の全例が 2 週間の同居期間中に交尾しなかった。さらに EB 群の雌を生殖能力の確認されている対照群の雄と、EB 群の雄を無処置雌動物と再度同居させたが、いずれも交尾は成立しなかった。

生後 21 日の離乳時および 14 週齢時に各群の雌雄について生殖器官の病理組織学的観察を実施した結果、EB 群の雄の生後 21 日では、精細管委縮が観察されたが、EB 群の雌および BPA 群の雌雄に組織学的変化は観察されなかった。14 週齢では、EB 群の雄に精細管委縮、精巣上体管腔内に生殖細胞残屑、前立腺および精囊にリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤が、雌に多核卵母細胞が観察されたが、BPA 群の雌雄には変化は認められなかった。EB 群では精巣および精巣上体の重量ならびに比体重値が対照群と比較して有意に低値を示したが、EB 群の脳、BPA 群の精巣、精巣上体および脳の重量はいずれも対照群と差は認められなかった。

受胎能確認の後、雄の脳を摘出してホルマリン固定後、視床下部神経核（性的二型核：SDN-POA）を含む組織切片を作成して thionin で染色し、観察した。その結果、EB 群では SDN-POA の体積は対照群と比較して著しく縮小したが、BPA 群の SDN-POA は対照レベルであった。以上のことから、BPA 300 µg/g をラットの新生児期の早期に連日皮下投与しても、成熟後の生殖機能ならびに視床下部神経核の構造に影響はないことが明らかになった。しかし、EB 2 µg/g の新生児期の早期投与では、雄の生殖器官の発達が

比較的早期に障害され、成熟後の生殖機能ならびに視床下部神経核の構造にも変化が及ぶことが確認された。

2. いずれの化学物質投与群においても投与期間中に新生児死亡はなく、離乳までの生存率ならびに離乳後の生存率には、投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。生後発育に関しては、EE 群、NP 群および TAM 群の体重増加が投与期間終了から抑制され、14 週齢まで対照群と比較して有意に低値で推移した。7 週齢より交尾成立まで性周期を観察した結果、BBP 群ではほぼ正常に回帰したが、EE 群、E₂ 群、E₃ 群では規則的に性周期は回帰しなかった（連続発情を示す傾向）。TAM 群では性周期を回帰する時期が遅延した。BBP 投与には生殖能力に及ぼす影響はみられず、交尾率ならびに受胎率はいずれも対照群と同レベルであった。E₂ 群では著しい交尾率の低下がみられ、さらに交尾成立雌の全例が受胎しなかった。E₃ 群では全例に交尾がみられたが、受胎率の有意な低下がみられた。NP 群においても有意な交尾率および受胎率の低下がみられた。EE 群および TAM 群では全例が交尾しなかった。交尾しなかった雄について、無処置雌と 1 週間を限度に再度交配した結果、EE 群および TAM 群ではいずれも交尾は成立しなかった。E₂ 群および NP 群では 90% 以上に交尾がみられ、さらに受胎も確認された。交尾しなかった雌について妊孕性の確認されている対照群の雄と再度交配させたが、E₂ 群、EE 群および TAM 群のいずれにも交尾は確認されなかった。

受胎能の有無の確認後、各群の雄について交尾行動を観察した結果、EE 群の mount をした雄の割合、E₂ 群の mount 回数にそれぞれ有意差が認められた。また NP 群の初回

mount までの時間が有意に早まった。

14 週齢の剖検時に実施した精子検査の結果、いずれの化学物質の新生児期処理においても、精子の運動性には影響はみられず、各指標の対照値に対する比は約 1 であった。

剖検時に測定した精巣、精巣上体、精囊および前立腺の重量は、EE 群では精巣、精囊および前立腺の重量およびその体重比重量、NP 群の精巣重量、TAM 群の精巣、精巣上体および精囊の重量がそれぞれ有意に低値を示した。E₂、E₃ および BBP 群では生殖器官重量に変化はみられなかった。

剖検時に測定した精巣、精巣上体、精囊および前立腺の重量は、EE 群では精巣、精囊および前立腺の重量およびその体重比重量、NP 群の精巣重量、TAM 群の精巣、精巣上体および精囊の重量がそれぞれ有意に低値を示した。E₂、E₃ および BBP 群では生殖器官重量に変化はみられなかった。

剖検では E₂ 群の雄に精巣・精巣上体委縮あるいは精巣水腫様腫大が、EE 群の雄に精巣上体腫大および精囊委縮が、NP 群の雄に精巣・精巣上体委縮が、それぞれ散見されたが、病理組織学的に観察した結果、E₃ 群および BBP 群では、精巣、精巣上体、精囊、前立腺のいずれにも変化はみられなかった。EE 群の精巣では、精子形成サイクルステージ VII 期の精細管に円形精子細胞由来の多核巨細胞がみられ、さらに生殖細胞（パキテン期精母細胞と思われる）の減少がみられた。E₂ 群の精細管は生殖細胞が消失しセルトリ細胞のみで構成されており、また精巣上体管内には脱落したと考えられる生殖細胞および精子尾が観察された。NP 群では精巣上体管内に脱落した生殖細胞が充満していた。雌については、BBP 群の未交尾例の卵巣および子宮に

異常はみられなかったが、E₂ 群の未交尾例および不妊例、E₃ および NP 群の不妊例、EE 群の未交尾例の卵巣では、卵胞の閉鎖が著しく、黄体はほとんど形成されていなかった。また、これらの群の子宮では、腔上皮細胞の肥大、子宮筋層の肥大がみられ、さらに E₂ 群および NP 群では、子宮角の腔上皮に扁平上皮化生がみられた（TAM 群の雌雄については観察中）。

E. 結論

BPA 群ではいずれの生殖関連指標にも投与の影響は認められなかったが、EB 群では性的二型核の体積が対照群の 35%に減少し、交尾行動の減弱ならびに授胎能の低下がみられ、性的二型核が生殖機能に関連していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tetsuji Nagao, Makiko Kuwagata, and Yoshiaki Saito, Effects of prenatal exposure to 5-fluoro-2'-deoxyuridine on developing central nervous system

and reproductive function in male offspring of mice, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 18, 73-92, 1998

2. Tetsuji Nagao, Makiko Kuwagata, and Yoshiaki Saito, Effects of prenatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine on the developing brain and reproductive function in male mouse offspring, *Reproductive Toxicology*, 12, 4, 477-487, 1998.
3. Makiko Kuwagata and Tetsuji Nagao, Behavior and reproductive function of rat male offspring treated prenatally with 5-bromo-2'-deoxyuridine, *Reproductive Toxicology*, 12, 5, 541-549, 1998.

2 学会発表

長尾哲二、齊藤義明、桑形麻樹子、白見憲司、松本亜紀、今井 清、小野 宏、「ビスフェノール A のラット新生児期暴露による生殖への影響」 第 1 回日本内分泌化学物質学会（京都）1998

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

哺乳動物培養胚を用いた内分泌かく乱物質の中枢神経および生殖細胞に及ぼす影響の検討

分担研究者 渡辺 敏明 山形大学医学部衛生学教室

研究要旨：

哺乳動物培養法を利用して、内分泌かく乱物質の胎児の中枢神経および生殖細胞への影響を検討する。本年度は、現在広く使用されている除草剤バスタの主成分であるグルホシネートの中枢神経に及ぼす影響を調べた。グルホシネートを暴露した培養胚において、神経上皮細胞にアポトーシスが誘発されることを病理組織学および生化学的に明らかにした。また、グルホシネートの神経細胞におけるエストロゲンレセプターの発現への影響を調べ、内分泌かく乱物質としての作用を検討している。

A. 研究目的

哺乳動物全胚培養法を利用して、内分泌かく乱作用が危惧されている生活環境化学物質の中枢神経および生殖細胞への影響を検討し、内分泌かく乱物質の試験法を確立する。

本研究においては、とくに現在使用されている農薬およびこれまでに広く使用され、土壌や河川などに残留している農薬について、内分泌かく乱物質としての作用を客観的に評価する。

「バスタ」は、含リンアミノ酸系の除草剤で、その主成分はグルホシネートおよび界面活性剤などである。グルホシネートは神経伝達物質であるグルタミン酸と化学的に類似した構造をしている。グルホシネートはグルタミン合成酵素を特異的に阻害するため、植物では体内にグルタミン酸やアンモニアが蓄積し、枯死する。この性質を利用して、近年グルホシネートが除草剤として開発され、利用されている。

グルホシネートは、哺乳動物においては、毒性および生体影響が低いと考えられており、「バスタ」は現在もっとも広く使用されてい

る。しかし、ヒトに対する健康影響は必ずしも十分に検討されているとはいえない。最近我々が経験したバスタ中毒の症例では、グルホシネート暴露直後から意識障害、痙攣、および呼吸障害などの神経症状が特異的にみられている。そこで、本研究においては、まず哺乳動物全胚培養法を利用して、グルホシネートの中枢神経に及ぼす影響を検討する。とくに、グルホシネートの内分泌かく乱作用の可能性を明らかにするために、PCB やエストラジオールなど既知の内分泌かく乱物質を用いて、比較検討を試みる。また、哺乳動物培養胚の中枢神経および生殖細胞を用いた試験法が、内分泌かく乱物質の評価法としての有用性についても、種々の農薬を対象にして検討する。

B. 研究方法

平成 10 年度：グルホシネートが中枢神経に影響を及ぼしていることを、マウスおよびラット培養胚を用いて、形態学および病理組織学的に検討する。中枢神経におけるアポトーシスの有無は TUNEL 法および透過型

電子顕微鏡によって検討する。またグルホシネートを暴露した培養胚から得た神経上皮細胞層を用いて、アポトーシスの出現の様子を免疫化学的および生化学的に明らかにする。本試験法を確立することによって、内分泌かく乱物質の次世代での影響を胚細胞を用いて検出することが可能である。

C. 研究結果

本年度においては、現在広く使用されている除草剤バスタの生体影響について、哺乳動物培養胚を利用して、組織病理学および免疫組織学的に分析した。その結果、バスタの主成分であるグルホシネートによって、培養胚の神経細胞に特異的にアポトーシスが誘発され、次世代において生殖毒性作用のあることが示唆された。現在培養胚の神経細胞におけるアポトーシスの誘発とエストロゲンレセプターの発現との関連を明らかにするために、既知の内分泌かく乱物質である PCB やエストラジオールなどを用いて、培養胚の神経細胞を利用した試験法の有用性について、検討を進めている。

D. 考察

今回、全胚培養法により試験管内で、妊娠 8 および 10 日のマウス胎児にグルホシネートを作用させると、神経上皮層にアポトーシスが惹起されることを明らかにしたが、その作用機序は不明であった。グルホシネートは、グルタメートのグルタミンへの代謝を阻害して、細胞外のグルタメートおよびアンモニアが増加することが明らかにされており、グルタメートを作用させると脳内で exitotoxic な機序により細胞壊死が起こるが、この反応は、グルタメート受容体を介した細胞内カルシウ

ム調節機構の障害が原因と考えられている。さらに、胎児では、血液脳関門などの防御機構が不完全であり、グルホシネートを作用させた胎児では、容易にグルホシネートが神経細胞に到達し、神経上皮層のアポトーシス、頭部の水疱形成などの神経毒性が惹起されたものとする。一方、アポトーシスに特徴的な形態変化は、bcl-2, c-myc などの細胞死関連遺伝子によって調整されているが、グルホシネートによる神経上皮層のアポトーシスにこれらの遺伝子が、関与しているか否かは、今回の実験からは明らかにされなかった。

E. 結論

グルホシネートによって、培養胚の神経細胞に特異的にアポトーシスが誘発され、次世代において生殖毒性作用のあることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toshiaki Watanabe and Takayuki Iwase: Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 16, 287-299, 1996

Toshiaki Watanabe: Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture, *Neuroscience Letters*, 222, 17-20, 1997

Toshiaki Watanabe and Takuya Sano: Neurological effects of glufosinate

poisoning with a brief review, Human and Experimental Toxicology, 17, 35-39, 1998

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究

分担研究者 川島 邦夫 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部

研究要旨：

ラットの妊娠 0 - 11 日に 2.0% の DBP を含む飼料を与えたところ、DBP 投与群で吸収胚が著しく増加し、子宮及び卵巣重量が低下し、DBP は受胎産物の発育及び卵巣機能に悪影響を及ぼすことが示唆された。また、DBP 投与群における妊娠ラット血清中のプロゲステロンレベルは低下傾向にあった。これらの結果から、妊娠初期に投与した DBP は著しい胚致死作用を示すことが明らかになり、胚致死作用は妊娠母体の生殖機能に対する影響を介して作用することが示唆された。

A. 研究目的

フタル酸エステル（PAEs）の生殖に及ぼす影響について明らかにする。特にラットの妊娠初期に投与した DBP(dibutyl phthalate) の胚致死作用について調べるとともに胚の生存、妊娠維持に不可欠である正常な子宮の機能に対する DBP の影響について偽妊娠ラット子宮における脱落膜腫形成を指標として検討する。更に、DBP の代謝物の胚致死作用および子宮に対する影響についても検討する。平成 10 年度においては、DBP を妊娠ラットの妊娠前半に投与して妊娠ラットおよび胚に対する影響を検討する。

B 研究方法

平成 10 年度においては、DBP を妊娠ラットの妊娠前半に投与して、妊娠ラットおよび胚に対する影響について検討するため、妊娠ラットの妊娠 0 日（精子発見）から妊娠 11 日まで 2.0% の DBP を含む飼料を与え妊娠ラットを妊娠 7 日、9 日、11 日また 20 日に開腹して胎児に対する影響を調べた。

C. 研究結果

妊娠ラットの飼料摂取量および体重増加は DBP 投与によって低下した。黄体数、着床数、着床前胚死亡率には何れの開腹日においても DBP 投与による影響は見られなかった。妊娠 0-11 日に DBP を投与し、妊娠 20 日に開腹した母体において、10 例中 9 例の全胚吸収が観察された。着床後胚死亡率は、対照群と Pair-fed 群との間に差は認められなかったが、DBP 投与群の妊娠 11 日及び 20 日においては、対照群及 Pair-fed 群に比べ著しく高かった。

D. 考察

胚致死は、接種量低下による栄養障害によるのではなく、投与した DBP によって発現し、多くの胚は妊娠 11 日までにすでに死亡していることが示唆された。

DBP 投与群の妊娠 11 日の子宮重量は、対照群および Pair-fed 群に比べて有意に低く、DBP は受胎産物の発育に悪影響を及ぼすことが示唆された。妊娠 9 日及び 11 日の卵巣重量は対照群及び Pair-fed 群に比べ有意に

低く、DBP が卵巣機能に影響を及ぼしていることが示唆された。妊娠維持に重要な役割を果たす妊娠母体血中プロゲステロンを測定したところ、DBP 投与群における妊娠ラット血中プロゲステロンレベルは低下傾向にあった。これらの結果から、妊娠初期に投与した DBP は著しい胚致死作用を示すことが明らかとなり、胚致死作用は妊娠母体の生殖機能にたいする影響を介して作用することが示唆された。

F. 研究発表

1 論文発表

M. Ema, A. Harazono, E. Miyawaki and Y. Ogawa. Embryo lethality following maternal exposure to dibutyl phthalate during early pregnancy in rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 58, 636-643 (1978)

M. Ema, A. Harazono, E. Miyawaki and Y. Ogawa. Developmental effects of di-n-butyl phthalate after a single administration in rats. J. Appl. Toxicol., 17, 223-229 (1997)

M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima. Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. Reprod. Toxicol., 12, 127-132 (1998)

2 学会発表

江馬 眞、宮脇 英美子、川島 邦夫、可塑剤 butyl bezyl phthalate の妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害 第25回日本トキシ

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱物質の発がんプロモーション作用の検討

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部 第一病理学教室

研究要旨：

我々が開発したラット肝中期発がん性試験法を用いて検索した 295 化合物のうち、内分泌かく乱物質とされる 14 化合物うち 10 が陽性を示した。DES も陽性を示し、肝発がん性が示唆されるデータである。この系を用いて Nonylphenol の発がんプロモーション作用の有無を用量相関性に検討し、Nonylphenol の発がんリスクを評価するとともに、雄ラットに対する性ホルモン環境への影響を血中のホルモンレベルならびに内分泌臓器の病理組織学的に検討する。

A.研究目的

環境中に存在する各種ホルモン様物質の中には、多くの内分泌かく乱物質が含まれている。これら内分泌攪乱物質による発がん性や発がん促進作用が危惧されているが、これらの発がんならびに発がんプロモーション作用のリスクを評価するには動物を用いた *in vivo* の検索系が不可欠である。しかも、数多く存在すると考えられているこれらの物質のリスク評価のためには、比較的短時間で、信頼されるデータを得ることのできる検索系を用いる必要がある。我々はラット肝中期発がん性試験法を開発してきたが、これはこのような目的のために適した検索系と考えられる。この肝中期発がん性試験法は、被験物質のプロモーション作用の用量相関性を検索するのに適していることや、少ない量の被験物質でも検索可能であり、低用量での評価も可能であることなど、この検索系は内分泌攪乱物質の発がん性や発がんプロモーション作用を検索する検索系として適していると考えられる。

B. 研究方法

この肝中期発がん性試験法は 6 週齢の F344 雄ラットを用い、DEN (200mg/kg) を、単回 ip 投与し、その 2 週間後より被験物質を 6 週間経口投与する。実験途中、実験開始 3 週目に、肝の 2/3 を部分切除し、肝臓の増殖を刺激する。そして実験は 8 週間で終了し、肝を摘出後、冷アセトンで固定し、発生した前がん病変である胎盤型 Glutathione S transferase (GST-P) 陽性細胞巣を免疫組織学的に染色する。この GST-P 陽性細胞巣を指標として、画像処理装置により定量的に解析し、対照群の値と比較検討することにより、これら被験物質のリスク評価を行う試験法である。

このラット中期発がん性試験法を用いて、内因性の性ホルモンが肝の前がん病変発生に対して影響をおよぼすかどうかを検討する。

実験には雌雄の F344 ラットを用い、DEN, 200mg/kg の単回 ip 投与と、3 週目の 2/3 肝部分切除は中期発がん性試験法と同様に行い、実験開始 2 週目に雄では去勢を、雌では卵巣摘出をそれぞれ行い、精巣と卵巣からの性ホルモンのない状態での、肝前がん病変

発生の影響を検討する。これは現在実験は進行中であり、この結果をふまえて、内分泌攪乱物質の発がんプロモーション作用の有無を検討する。

C. 研究結果および考察

環境中に存在する多くの内分泌かく乱物質による発がん性や発がん促進作用が危惧されているが、これらの発がんのリスクを評価するには動物を用いた *in vivo* の検索系が不可欠である。しかも、これらの物質のリスク評価のためには、比較的短期間で、信頼されるデータを得ることのできる検索系を用いる必要がある。ラット肝中期発がん性試験法はこの目的のために適した検索系と考えられる。この肝中期発がん性試験法は、被験物質のプロモーション作用の用量相関性を検索するのに適していることや、少ない量の被験物質でも検索可能であり、低用量での評価も可能であることなど、この検索系は内分泌攪乱物質の発がんリスクを検索する検索系として適していると考えられる。

このラット肝中期発がん性試験法を用いて、現在までに 295 化合物の検索を終了し、そのデータを蓄積している。その結果、肝に発癌標的性を示す物質 (hepatocarcinogen) は、92% の陽性率を示し、肝に発癌標的性を示さない物質でも 21% に陽性を示した。さらに、注目すべき点は発がん性を示さない物質は極めて低い陽性率 (2%) しか示さない点で、擬陽性を示す可能性が極めて低いことは検索系としては重要な点であるといえる。また、GST-P 陽性細胞巣を指標とした本試験結果と肝細胞がんを指標とした 2 年の発がん性試験結果とが用量相関性に一致していることを確認している。

すでに検索を終了しているもののなかには多くの環境物質も含まれ、内分泌かく乱物質として報告された化合物も 14 種類含まれており、すでにその結果が出ている。その多くは農薬であり、Alachlor, Aldrin, DDT, Dieldrin, Permethrin, Trifluralin, Vinclozolin などこの検索系で陽性を示したものが多い。特に、DDT, Dieldrin, Trifluralin, Vinclozolin では前がん病変の単位面積当りの個数は比較的高い値を示した。しかし、Atrazine や Benomyl など陽性を示さない農薬も見られた。さらに、農薬以外では PCB の他、Peroxisomal proliferator である DEHP、ホルモン製剤である DES などが検索されており、PCB, DES では陽性を示した。

F. 研究発表

1 論文発表

N. Ito, A. Hagiwara, S. Tamano, M. Futacuchi, K. Imaida, and T. Shirai:

Effects of pesticide mixtures at the acceptable daily intake levels on rat carcinogenesis, *Food and Chemical Toxicology*, 34, 1091-1096, 1996.

R. Hasegawa, T. Kato, M. Hirose, S. Takahashi, T. Shirai and N. Ito:

Enhancement of hepatocarcinogenesis by combined administration of food-derived heterocyclic amines and low doses in the rat, *Food and Chemical Toxicology*, 34, 1097-1101, 1996.

Tomoyuki Shirai: A medium-term rat liver bioassay as a rapid *in vivo* test for

carcinogenic potential: A historical review
of model development and summary of

results from 291 tests, *Toxicologic
Pathology*, 25, 453-460, 1997,

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

甲状腺腫瘍に対する内分泌攪乱物質の影響に関する研究

分担研究者 広瀬 雅雄 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病理部

研究要旨：

卵巣摘出した雌 F344 ラットに DHPN でイニシエーション処置を行い、その後内分泌攪乱物質である EE、アトラジン、メトキシクロール、ビスフェノール A を 28 週投与し、甲状腺発がんに対する影響を検討した。その結果、子宮の相対重量は、卵摘/DHPN+EE と卵摘/DHPN+メトキシクロール群において、基礎飼料群に比し有意に増加したが、甲状腺腫瘍の発生頻度はいずれの群においても有意差は認められず、本実験系においては甲状腺発がんの促進は認められなかった。

A. 研究目的

DHPN によりイニシエーション処置したラット甲状腺二段階発がんモデルを用いて甲状腺増殖性病変を誘発させ、その後、種々の内分泌攪乱物質を投与し、この系により内分泌攪乱物質の甲状腺腫瘍誘発促進が検出可能か否について解析する。このような作用を検出する試験系は全くないことから、早急にその試験系の確立が望まれる。この試験系を開発することにより、内分泌攪乱物質の甲状腺腫瘍に対する修飾作用を検出することができる。

B. 研究方法

雌 F344 ラットの卵巣を摘出し、一週後に 2000mg/kg の DHPN を一回皮下投与してイニシエーション処置とした。DHPN 処置 1 週後から抗甲状腺剤である 1000 ppm のサルファジメトキシシン(SDM)を、甲状腺上皮の増殖活性を増強させるため 8 週間飲水投与した後、第 1 群には 1-0.5ppm の EE を、第 2 群には 1000 ppm のメトキシクロールを、第 3 群には 400 ppm のアトラジンを、第 4 群に

は 1% のビスフェノール A を、第 5 群には 1000 ppm の SDM を、第 6 群には基礎飼料を 28 週間 SDM は飲水で、その他は混餌で投与し、第 7 群は偽卵摘手術後、第 1 群と同処置、第 8 群は偽卵摘手術後第 6 群と同処置を施した。投与終了後に全動物を殺処分し、甲状腺を組織学的に観察し、各内分泌かく乱物質の甲状腺腫瘍誘発促進作用の有無を比較検討した。

C. 研究結果および考察

甲状腺腫瘍誘発には、ネガティブ・フィードバック機構を介した下垂体からの甲状腺刺激ホルモン(TSH)の分泌促進が大きく関与している。一方、内分泌攪乱物質のひとつである合成エストロジェンのエチニルエストラディオール(EE)は、N-methyl-N-nitrosourea(MNU)をイニシエーターとして用いたラット二段階発癌モデルにおいて、甲状腺腫瘍の誘発を増強することが既に報告されており、そのメカニズムとしては誘発された甲状腺腫瘍の estrogen receptor に EE が直接作用して甲状腺腫瘍誘発を増強する可能