

28日間反復投与試験等に関する調査研究

(OECDテストガイドライン国際共同バージョンプロジェクト)

主任研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDCs)のin vivoスクリーニング法開発を目的とした国際共同バリデーションプロジェクトに参加する目的で、内分泌かく乱物質の人体影響に関する以下の調査研究事業を行った。

1) 28日間反復投与毒性試験

化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法として提案された“enhanced OECD Test Guideline 407”の有用性を検証する目的で、既知の非ステロイド性抗アンドロゲン作用物質のFlutamideおよび合成男性ホルモンであるMethyltestosterone(MT)を用い、本案を基本としたラット28日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、臓器重量、血清ホルモンレベル、病理組織学的所見がホルモン作用を検出する有効な指標であり、なかでも膣スミア検査や精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析がすぐれた指標になり得ると考えられた。一方、用量設定基準、設定方法、更に感度の良い検査項目の追加や不要な検査項目の削除、など更なる検討が必要であると思われた。また、臓器重量、血清ホルモンレベル、病理組織学的所見がホルモン作用を検出する有効な指標であり、なかでも雌ではスミア検査、雄では精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析がすぐれた指標になり得ると考えられた。一方、用量設定基準、設定方法、測定項目など今後検討を加えるべき課題も残されている。

2) 子宮重量等を指標とした生体試験

当初の予定では、OECDが制定する統一プロトコルを用い、ホルモン作用の明らかな5品目について子宮肥大試験を行うこととしていたが、OECDの子宮肥大試験バリデーションの予定が変更となったため、日本の国立医薬品食品衛生研究所がリードラボとなってプレバリデーション段階として、3通りのプロトコルを用意し、それに基づいて国際的にエチニールエストラジオールについての用量作用データを持ち寄り、各施設のバリデーションとし、次の段階として6種類の代表的化学物質について、それぞれのプロトコルを用いて検討を進めることとなった。本研究では、3通りのプロトコルの作成に必須な基礎データの収集に必要な種々の実験を行った。

3) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・相乗効果の検討

内分泌かく乱化学物質は、その環境化学物質としての性格上、複合暴露の影響が一つの問題として常に検討対象となってきている。しかし、複合作用に関する研究はin vitro試験系によるものがほとんどであるとともに、系統立った比較検討がなされたプロジェクトはほとんどない。本研究では、一世代試験を頂点に、子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験を用いて、内分泌かく乱作用が実験的に知られている代表的な化合物について、その複合作用を検討した。その組み合わせは、それらが結合することが想定される、あるいは知られている核内受容体毎になされた。使用する化学物質の単一ロットの確保、必要なものについては新規合成、あるいは調達に予想を上回る時間を要したため、全体的に実験開始の遅延が生じ、現段階では一部の子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験からのpreliminary dataを得ている段階である。

分担研究者・所属施設及び所属における職名

井上 達・国立医薬品食品衛生研究所毒性部・部長

山崎寛治・(財)化学品検査協会日田研究所・試験研究課長

藤井 治・(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所・取締役所長

菅野 純・国立医薬品食品衛生研究所毒性部・室長

## A. 研究目的

最近、工業製品のみならず天然物質など内分泌かく乱化学物質の人体に対する悪影響が世界的に問題となっており、これらの物質のスクリーニングと安全性評価を目的とした種々の試験法の確立が急務とされている。これらの要求に応え、従来の“OECD Test Guideline 407”によるラットの28日間反復投与毒性試験法を基礎として、「雌の性周期観察」「精子検査」「血中ホルモンレベルの測定」等、成熟動物における内分泌系に対する影響を検出するための新しい検査項目が盛り込まれた“enhanced OECD Test Guideline 407”案が提案された。化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法として、この試験法の有用性を検証する目的で、“enhanced OECD Test Guideline 407”案を基礎としたラット28日間反復投与毒性試験を実施した。また、子宮肥大試験の国際共同バリデーションプロジェクトに参加する目的でその基礎的研究を行った。本研究は、内分泌かく乱化学物質(EDCs)の生体への障害性の発現様式あるいはその発現機構の主なものが、ホルモン受容体を介した作用であろうという認識が深まるにつれ、従来のOECD等の化学物質の生物試験法によるスクリーニングおよび評価が十分可能であるか否かの見直しが行われ、その中で、*in vivo*スクリーニング法の一つの候補として子宮肥大試験を国際的協調の中で進めることが決議されたことを受け、プレバリデーション段階として3通りのプロトコルを用意し、それに基づいて国際的にエチニールエストラジオールについての用量作用データを持ち寄り、各施設のバリデーションとすることとなった。当初の予定では、OECDが制定する統一プロトコルを用い、ホルモン作用の明らかな5品目について子宮肥大試験を行うこととしていた。しかし、国際プロトコルの未だかつて設定されていない子宮肥大試験には複数の方式が知られており、そのどれを唯一のものとして制定するかを決定する基礎的科学的

情報が不足していることが認識されたことにより、そして、次の段階として6種類の代表的化学物質について、それぞれのプロトコルを用いて検討を進めることとなったものである。このOECDの子宮肥大試験プロジェクトにおいて、国立医薬品食品衛生研究所毒性部がリードラボとなって、プレバリデーションおよびバリデーションのプロトコル案の作成に携わることとなった。それに伴い、本研究ではその科学的根拠となる基礎データの収集のために子宮肥大試験に関する実験的検討を加えた。エンドポイントとして、一世代試験を頂点に、子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験を用いて、内分泌かく乱作用が実験的に知られている代表的な化合物について、その複合作用を検討することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1) 28日間反復投与毒性試験

7週齢のCrj:CD(SD)IGS系ラット雌雄各80匹を1群10匹の各8群に分け、Flutamideはコーン油に混じて4、1、0.25、0mg/kg(対照群)、MTもコーン油に混じり80、20、5、0mg/kg体重の用量で強制経口投与した。雄は投与回数を28回とし、最終投与の翌日に全生存動物を屠殺した。雌は膣スメア法にて性周期を観察し、28回投与の翌日から4日の間で発情静止期に相当する日に屠殺、或いは性周期の異常を認めた場合は28回投与の翌日に屠殺し、いずれも屠殺前日まで投与を継続することとした。主な検査項目として、性周期観察の他、体重、臓器重量、血液、血清生化学、血清ホルモン、精子および病理組織学的検査を行った。

### 2) 子宮重量等を指標とした生体試験

離乳直後の未熟雌ラット(21日齢)あるいは、卵巢摘出成熟雌ラットあるいはマウスを用い、エストラジオール、ゲニスタイン、ビスフェノールAなどの投与に対する子宮重量、細胞増殖(BrdUラベリング)、膣開口、膣擦過細胞像等を指標とした変化

を観察し、子宮肥大試験のプロトコール作成に必要な基礎データを収集した。

### 3) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・相乗効果の検討

子宮肥大試験は、卵巣摘出成熟雌ラットを用いた14日間皮下投与実験法および21日齢未熟雌ラットを用いた3日間皮下投与実験法、去勢成熟雄ラットを用いた14日間皮下投与ハーシュバーガー試験法、および一代繁殖試験法を用い、複合投与による影響を検討する。前3者は、単体2用量、複合2用量および対照群の7群構成であり、後者の一代試験は単体1用量、複合1用量および対照群の4群構成で行った。検討する物質の組み合わせは、エストロゲン受容体を介するもの同士、エストロゲン受容体を介するものとPPAR受容体を介するもの組み合わせ、エストロゲン受容体を介するものとダイオキシン受容体を介するもの組み合わせ(子宮肥大試験および一代試験)、エストロゲン受容体を介するものとアンドロゲン受容体を介するもの組み合わせ(ハーシュバーガー試験)とした。これら4種の試験法において、結合するであろう受容体毎に estradiol, bisphenol A, genistein, diethylstilbestrol, butylbenzylphthalate, 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin, testosterone, vinclozolin, p,p'-DDE, flutamide. の化合物を適宜組み合わせ、その複合作用を検討した。

## C. 研究結果

### 1) 28日間反復投与毒性試験

今回、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングと安全性評価を目的とした“enhanced OECD Test Guideline 407”案の有用性を確認する目的で、Flutamide およびMTを強制経口投与する28日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、まず Flutamide の投与用量に相関した変化として、雄では、血清中のテストステロンとエストラジオールレベルの上昇が 4mg/kg 投与群で、精巣上体重

量の減少が 1 および 4mg/kg 投与群で、性嚢(性嚢+凝固腺+背側葉前立腺)重量の減少が 4mg/kg 投与群で、乳腺小葉の萎縮が 1 及び 4mg/kg 投与群で認められた。また、雌では、4mg/kg 投与群で性周期の期間がやや延長する傾向がみられた以外に、Flutamide の投与に関連すると思われる明らかな変化は認められなかった。従って、Flutamide の無影響量は 0.25mg/kg と考えられた。しかし、MT では、雌の全投与群で副腎、下垂体、卵巣の相対重量の減少、多卵胞性卵胞の増加がいずれも有意に認められ、無影響量を設定できなかった。今回の試験に採用した検査項目の内、ホルモンに関連した作用を検出し得た項目は、生殖器系組織の重量、血中ホルモンレベル、生殖器系組織の病理組織所見及び雌の性周期であった(但し、今回の Flutamide の試験においては、Flutamide の作用が雄に対して顕著であり、雌に対してはほとんど影響を与えなかったことから、雌におけるホルモン関連作用の一般的な検出感度に関しては十分な評価はできなかった)。

### 2) 子宮重量等を指標とした生体試験

未熟ラットを用いた子宮肥大試験に関する基礎的実験:21日齢雌ラットに種々の量のエストラジオールを3日、7日あるいは14日間皮下投与し、子宮重量、膣開口、組織像について検討した。その結果、7日間以上の投与では、子宮重量増加に用量依存性が認められなくなることが示された。これは、組織学的に卵巣における黄体発現(性周期の開始)と一致しており、卵巣からのエストロゲン分泌により、外来性の微量エストラジオールの作用がかき消されたものと解釈された。膣開口日が増量依存的に早くなることが確認された。しかし、その検出感度は子宮重量増加のそれよりも悪く、また、投与開始後10日前後まで観察をする必要があることから、3日目での子宮重量測定を行う場合には膣開口を見ることに意味がないことが示された。

卵巣摘出ラットおよびマウスを用いた子宮肥大試験に関する基礎的試験：卵巣摘出ラットあるいはマウスに3日、7日あるいは14日間、種々の量のエストラジオールを皮下投与し、子宮重量増加、組織像、細胞増殖像(BrdU標識)、含水量(蛋白量)、等の測定を行った。その結果、感度は長期投与により増加すること、高用量では浮腫が先行するとともに、増殖部位が子宮内膜上皮、子宮腺上皮、ついで間質細胞に移ること、低用量では、細胞増殖が全体的に徐々に増加すること、未熟ラットを用いた場合よりも子宮重量データのばらつきが少ないこと等が示された。

### 3) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・相乗効果の検討

現在、一部の子宮肥大試験、およびハーシュバガー試験の生データを徐々に得ている段階である。限定的な判断であるが、試験系の違いにより反応の差異、相加的、相乗的あるいは相殺的な作用が示唆される結果が集積されつつある。

## D. 考察

### 1) 28日間反復投与毒性試験

今回の試験結果においては、以上の検査項目が検出感度の良い項目であったといえるが、更に検出感度を上げるために、いくつか考慮すべき事項がある。雄に関しては、今回の試験でも実施したように、精巣において精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析を行うことにより、種々の精上皮に対する影響を詳細に解析することが出来る。雌に関しては、卵巣において種々の成熟段階の卵胞の数をカウントする等の定量的解析を行うこと、また、卵巣、子宮及び膣は性周期に連動して特徴的な組織像を示すことから、性周期を考慮した病理組織学的検索を実施することにより、通常の病理組織学的検査では得られない詳細な情報が得られるものと思われる。

### 2) 子宮重量等を指標とした生体試験

総括的には、未熟ラットを用いた場合、3日間投

与が推奨され、それ以上の長期投与は卵巣機能の開始と重なるため、系の感度が悪くなること、絶対的感度は卵巣摘出成熟動物を用いたほうが3倍程度高いこと、但し、後者には手術が必要であること、場所と時間を余計に必要とすることなどの短所があることが確認された。また、子宮肥大には、細胞増殖以外に、浮腫が影響すること、そこには作用機序として血管作働性のプロセスが絡む可能性が示唆された。

### 3) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・相乗効果の検討

現在までのところ、in vivoによる複合投与の報告を散見するが、組織立って、網羅的になおかつ、受容体別に組み合わせを設定したものは例を見ない。また、用量設定の点からも、組み合わせられる物質の双方が飽和濃度以下に設定された実験はほとんどない。本研究の結果が出揃った時点には、複合投与による影響の全容のある程度の部分が科学的考察を持って解明されるものと期待される。

## E. 結論

本研究における化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法“enhanced OECD Test Guideline 407”案に基づくラット28日間反復投与毒性試験では、通常のTG 407で要求されている尿検査、機能検査などが除外されているが、これらを加えた場合、煩雑さや動物に対するストレスが著しく増加し、実験のコストも膨大なものになる可能性がある。今後これらの点や本研究班における他の被験物質の試験結果等を考慮して、試験法を改良してゆく必要があると思われる。また、用量設定基準、設定方法など検討を加える課題も残されている。また子宮重量を指標とした生体試験研究にて得られた科学的知見により、OECDでの子宮肥大試験のプロトコール制定に対する論議が促進され、結果として現段階で一つのプロトコールを制定するのは時

期尚早であること、どの様なプロトコールが考えられ、そのうちのどれがプレバリデーションの対象となるかを決定する上で、大きな科学的役割を果たしたと考えられる。また、その結果として、日本がOECD子宮肥大試験のリードドラゴとなったと考えられる。内分泌かく乱作用が実験的に知られている代表的な化合物について、その複合作用の検討については、すべての実験で用いる化合物のロットの統一を含め、新規合成を待たねばならなかった化合物があったことなどにより計画の開始が遅れたため、結果の全容の解析には、時間を要する結果となった。しかしながら、preliminary dataにも、すでに興味深い事象が現れており、今後のデータ集積とその解析が大いに期待されるものである。この結果は、環境化学物質の特性としての内分泌かく乱化学物質の複合作用に関して有用な情報を提供するものと期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kawasaki Y, Umemura T, Saito M, Momma J, Matsushima Y, Sekiguchi H, Matsumoto M, Sakemi K, Isama K, Inoue T, Kurokawa Y, Tsuda M: Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *Toxicol Sci*, 1998, Feb;23(1):53-68

Hirabayashi Y, Matsumura T, Matsuda M, Kuramoto K, Motoyoshi K, Yoshida K, Sasaki H, Inoue T : Cell kinetics of hemopoietic colony-forming units in spleen (CFU-S) in young and old mice. *Mech Ageing Dev*, 1998, Apr 1;101(3):221-231

Sai K, Kai S, Umemura T, Tanimura A, Hasegawa R, Inoue T, Kurokawa Y: Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol*, 1998, Dec;36(12):1043-1051

Sai K, Upham BL, Kang KS, Hasegawa R, Inoue T, Trosko JE: Inhibitory effect of pentachlorophenol

on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. *Cancer Lett*, 1998, Aug 14;130(1-2):9-17

Mitsumori K, Imazawa T, Onodera H, Takahashi M, Kitajima S, Inoue T, Kurokawa Y: Ultrastructural changes in motor endplates of the lumbrical muscles of rats induced by a microsomal Ca<sup>2+</sup> ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone. *Arch Toxicol*, 1998, 72(2):115-118

Trosko JE, and Inoue T: Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells*, 1997, 15 (suppl2), 59-67.

Sasaki H, Matsuda M, Lu Y, Ikuta K, Matuyama S, Hirabayashi Y, Mitsui H, Matsumura T, Muramatsu M, Tsukada T, Aizawa S, and Inoue T.: A fraction unresponsive to growth inhibition by TGF- $\beta$  among the high-proliferative potential progenitor cells in bone marrow of p53-deficient mice. *Leukemia*, 1997, 11, 239-244.

Nishimura Y, Hirabayashi Y, Matuszaki Y, Musette P, Ishii A, Nakauchi H, Inoue T, and Yonehara S.: In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: Effects of agonistic anti-mouse Fas monoclonal antibody on thymus, spleen, and liver. *Int Immunol*, 1997, 19, 307-316.

Yoshida K, Inoue T, Nojima K, Hirabayashi Y, and Sado T. : Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 2615-2619.

Inoue T, Cronkite EP, Hirabayashi Y, Bullis JE, Mitsui H, Umemura T.: Lifetime treatment of mice with azidothymidine (AZT) produces myelodysplasia. *Leukemia*, 1997, 11 (Suppl 3), 123-127.

Inoue T, Hirabayashi Y, Matsuda M, Furuta Y, Aizawa S, Sasaki H.: Model of MDS-like myelodysplasia that transforms into single lineage-hemopoietic malignancies upon

transplantation-implication for pediatric myelodysplastic syndrome-. *Intnt'l J Ped Hematl/Oncol.*, 1997, 4:221-230.

Hanzawa C, Kobayashi K, Hirabayashi Y, Inoue T, Aizawa S, Adachi K: Hair follicle dermal papilla cell lines from p53-knockout mice. *J Dermatol Sci*, 1997, 15, 59-63.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Matumura T, Mitsui H, Sasaki H, Tukada T, Aizawa S, Yoshida K and Inoue T: The p53-deficient hemopoietic stem cells: their resistance to radiation-apoptosis, but lasted transiently. *Leukemia*, 1997, 11 Suppl 3, 489-492.

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験 -内分泌障害性を中心に- 組織培養工学24 H10年7月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 有機合成化学協会誌57(1) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響 フォルマシア35 H11年3月

## 2. 学会発表

豊田和宏、渋谷淳、田村啓、糞谷高敏、畝山千香子、広瀬雅雄 ラット28日間反復投与試験法"OECD Guideline 407 enhanced"確立のためのFlutamideを用いた予備的検討 第26回日本トキシコロジー学会発表予定

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto, AtsuyTakagi, Jun Kanno, and Tohru Inoue. Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs)(Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質 (endocrine disruptors)の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年8月

菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向。ポリオ

レフィン等衛生協議会安全性セミナー H10年3月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 第169回有機合成化学協会懇談会 H10年7月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 平成10年度化工誌ニュース委員会第1回研究会 H10年10月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から-学術情報センター軽井沢公開ワークショップ パネルディスカッション H10年10月

宮城恵理、松島裕子、平林容子、井上 達、菅野 純 内分泌かく乱化学物質(Xenoestrogen)高感度検出系としての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応性の経時変化 第15回日本疾患モデル学会 H10年11月

菅野 純 動物の生態と内分泌攪乱物質(環境ホルモン)についてパネルディスカッション 第25回環境保全・公害防止研究発表会 H10年11月

菅野 純、Kyung-Sun Kang、武木田薫、宮城恵理、齊藤 実、松島裕子、山本雅也、平林容子、金子豊蔵、井上 達 内分泌かく乱化学物質におけるin vitro試験系のin vivo試験に対する代替性 第12回日本動物実験代替法学会 H10年11月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について 第9回安科研学術講演会 H10年12月

菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon 内分泌かく乱物質の短期in vivo試験系について 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究会 H10年12月

小野 敦、山本雅也、高木篤也、菅野 純、井上 達 Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs)(Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research)H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 第26回建築物環境衛生管理全国大会 H11年1月

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人体影響に関する調査研究事業（28日間反復投与試験等に関する調査研究、OECDテストガイドライン国際共同バージョンプロジェクト）

主任研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法として "OECD Test Guideline 407 enhanced" 案が提案された。今回我々は、この試験法の有用性を検証する目的で、"OECD Test Guideline 407 enhanced" 案を基礎としたラット28日間反復投与毒性試験を実施した。被験物質は、ホルモンレベルや内分泌系組織に影響を与え得る陽性対照として、非ステロイド性の抗アンドロゲン作用物質として知られる Flutamide および合成男性ホルモンである Methyltestosterone (MT) を用いた。実験は、1群10匹の雌雄の6週齢 Crj:CD(SD)IGS系ラットに Flutamide は4、1、0.25mg/kg体重、MTは80、20、5mg/kg体重の投与量で連日強制経口投与し、雄は投与回数を28回とし、最終投与の翌日に全生存動物を屠殺した。雌は28回投与の翌日から4日の間で、性周期が発情静止期に相当する日に屠殺することとし、屠殺前日まで投与を継続した。性周期の観察は膣スミア法により投与開始の20日後から屠殺当日まで実施した。また、持続発情等の性周期の異常を認めた動物は全て28回投与の翌日に屠殺することとした。主な検査項目として、性周期観察の他、体重、臓器重量、血液、血清生化学、血清ホルモン、精子および病理組織学的検査を行った。その結果、体重はMT投与群では雄80mg/kg投与群で対照群と比較して減少傾向がみられたが、逆に20mg/kgおよび5mg/kg投与群では増加傾向がみられた。雌は各群ともに対照群と比較して増加し、20および80mg/kg投与群で明らかな増加が認められた。雌の性周期は80mg/kgMT投与群では正常の周期は全く観察されなかった。血中ホルモンレベルは、4mg/kg Flutamideを投与した雄では、対照群に比べ、テストステロンとエストラジオールの増加が統計学的有意に認められた。MT投与群では雌の最高用量で卵胞刺激ホルモンが有意に高かったが、それ以外の項目では雌雄各群とも有意差は認められなかった。臓器重量は、4mg/kg Flutamide投与群で精巣上体の絶対重量と性嚢の絶対重量及び相対重量の減少、1mg/kg投与群で精巣上体の絶対重量と相対重量の減少が有意に認められた。80mg/kg MT投与群で精巣と精巣上体の絶対重量および相対重量の有意な減少が認められた。副腎と卵巣の絶対重量および相対重量は、全てのMT投与群で有意に減少した。また20mg/kg投与群の子宮の絶対重量および相対重量では有意な減少が認められた。病理組織学的検査では、Flutamide 4mg/kg投与群で精上皮細胞の定量的解析の結果、ステージIX～XIのグループにおいて4mg/kg投与群のレプトテン期精母細胞数の増加が、軽度ながら対照群に比べて統計学的有意に認められた。MT投与群では精細管の萎縮、ライディッヒ細胞の萎縮、パキテン期精母細胞の変性、精巣上体管内の変性細胞の増加がいずれも80mg/kg投与群で有意に増加した。雌では卵巣の多卵胞性卵胞が全てのMT投与群で有意に増加した。子宮では内腔拡張および子宮腺細胞の空胞変性が80mg/kg投与群で有意に増加した。膣では上皮が淡明な円柱状の細胞で構成された異常な性周期変化が80mg/kg投与群で全例に認められた。乳腺では乳管の過形成が20mg/kg投与群で3例みられ、80mg/kg投与群では10例で程度も強く、有意差が認められた。また、副腎皮質網状帯細胞の軽度の萎縮が20mg/kg以上の投与群で認められた。以上、臓器重量、血清ホルモンレベル、病理組織学的所見がホルモン作用を検出する有効な指標であり、なかでも雌ではスミア検査、雄では精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析がすぐれた指標になり得ると考えられた。一方、用量設定基準、設定方法、測定項目など今後検討を加えるべき課題も残されている。

## A. 研究目的

最近、工業製品のみならず天然物質など内分泌かく乱化学物質の人体に対する悪影響が世界的に問題となっており、これらの物質のスクリーニングと安全性評価を目的とした種々の試験法の確立が急務とされている。これらの要求に応え、従来の"OECD Test Guideline 407"によるラットの28日間反復投与毒性試験法を基礎として、化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法として"OECD Test Guideline 407 enhanced"案が提案された。この案には、内分泌系に対する影響を検出するために、「雌の性周期観察」「精子検査」「血中ホルモンレベルの測定」等の新しい検査項目が盛り込まれている。今回我々は、この試験法の有用性を検証する目的で、"OECD Test Guideline 407 enhanced"案を基礎としたラット28日間反復投与毒性試験を実施した。被験物質は、ホルモンレベルや内分泌系組織に影響を与え得る陽性対照として、非ステロイド性の抗アンドロゲン作用物質として知られるFlutamideおよび合成男性ホルモンであるMethyltestosterone (MT)を用いた。Flutamideは副作用の少ない経口制癌剤として前立腺癌治療に世界的に広く用いられている物質であり、MTなどの合成男性ホルモンは子宮内膜症などの治療のほか筋肉増強剤としても用いられている。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質及び動物

Flutamide (2-methyl-n-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)-phenyl]propanamide) はSigma社 (米国) より購入し、試験期間中連日、投与直前にエタノール (99.5%、和光純薬工業、大阪) に完全に溶解した後、溶媒であるコーン油 (Sigma社) に混入して、強制経口投与用の投与液とした。Flutamideの溶解に用いたエタノールの投与液中での濃度は、0.5%となるように調整した。Methyltestosterone (MT) は東京化成工業株式会社より購入し、コーン油に溶解し投与液とした。投与液の投与量はラット1匹1日 (1回) 当たり5ml/kg体重とした。投与液中でのFlutamideおよびMTのHPLCによる均一性の分析を (財) 日本食品分析センター (多摩研究所、東京) に依頼した結果、いずれの用量段

階においても投与液を調製したサンプルチューブ (50ml Centrifuge Tube, Corning、米国) 中の上部、中間部、底部の3カ所における化合物の濃度はほぼ等しく、投与液中での混合均一性が良好であることが確認された。

動物は、6週齢のCrj:CD (SD) IGS系ラット (SPF) 雌雄各80匹を日本チャールス・リバー社 (神奈川県) より購入し、CRF-1基礎固型飼料 (日本チャールス・リバー社) と水道水で1週間馴化飼育した後、無作為にFlutamide、MTそれぞれ雌雄各4群 (各群10匹) に分け、試験に供した。動物の飼育はバリヤーステムの飼育室にて、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時 (オールフレッシュ)、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は雌雄とも5匹ずつ透明なポリカーボネート製ケージに収容し、床敷は三協ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週2回交換した。また、飼料としてCRF-1基礎固型飼料、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。

### 2. 動物試験

今回の試験計画をFig. 1, 2に示した。Flutamideの投与用量は、過去に報告されている毒性試験の結果を参考にして、高用量を雄にホルモン作用の発現される用量としてラット1匹1日 (1回) 当たり4mg/kg体重とした。MTの投与量も同様に、高用量を雌にホルモン作用の発現される80mg/kg体重とした。中用量と低用量は公比を4として、それぞれFlutamide 1mg/kgおよび0.25mg/kg体重、MT 20mg/kgおよび5mg/kg体重とした。雌雄とも以上の3用量群に加え、溶媒のみ投与する対照群も設けた。投与液はラット用胃ゾンデを用いて、連日午前中に強制経口投与した。雄は投与の回数を28回とし、最終投与の翌日に全生存動物を屠殺した。雌は28回投与の翌日から4日の間で、性周期が発情静止期に相当する日に屠殺することとし、屠殺前日まで投与を継続した。性周期の観察は膈スミア法により投与開始の20日後から屠殺当日まで、投与に先立って実施した。また、持続発情等の性周期の異常を認めた動物は全て28回投与の翌日に屠殺することとした。摂餌量の測定を週1回行った。体重

の測定を週2回実施し、そのデータを基に各動物への投与量を算定した。試験期間中、全動物の一般状態の観察を連日投与終了後実施した。

### 3. 剖検

今回、動物の血中ホルモンレベルやストレスへの影響を考慮して、試験終了時の絶食は実施しなかった。試験終了後、全生存動物をエーテル麻酔下に体重を測定し、開腹、腹部大動脈より採血後、屠殺、剖検した。剖検時の動物の採血は、採血時刻の違いによるホルモンレベルのかたよりを無くすため、採血を原則として高、中、低用量、対照群の順序で各群より1匹ずつ実施した。

剖検に際し、諸臓器及び組織は肉眼的に観察した後摘出し、肝臓、腎臓、副腎、精巣上体、前立腺腹葉、性嚢（性嚢＋凝固腺＋背側葉前立腺）、卵巣、子宮については重量測定の後、また鼻腔を含む頭蓋、脳、下垂体、唾液腺、舌、気管、甲状腺（上皮小体を含む）、肺、心臓、食道、胃、小腸、大腸、脾臓、脾臓、膀胱、膣、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊髄、眼球、皮膚及び筋肉等については摘出後直ちに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。なお、精巣については重量測定後、ブアン液にて固定した。下垂体及び甲状腺（上皮小体を含む）については固定完了後に重量測定を行った。また、雄の各群5匹の右側の精巣及び精巣上体については、重量測定後、固定せず、後に示す精子検査のサンプルとした。

### 4. 血液学的検査

採取した血液については、多項目自動血球計数装置（東亜医用電子社、兵庫、M-2000型）にて白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン量（HGB）、ヘマトクリット値（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）及び血小板数（PLT）の測定を行った。また、血液塗抹標本作製し、オムロン社（東京）のMICROX用染色液（Wright's Eosin Methylene Blue Solution）にて染色後、実験動物用血液細胞自動分析装置（立石電機社、東京、MICROX・HEG-120A型）にて細胞形態により白血球を桿状核好中球、分葉核好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球及び単

球に分類し、その百分率を調べた。

### 5. 血清生化学的検査及び血清中ホルモンレベルの測定

剖検時に採取した血液より血清を分離後、凍結し、（株）エスアールエル（東京）に依頼して、下記検査項目について測定を行った。

血清生化学的検査項目：総蛋白、アルブミン/グロブリン比、アルブミン、総コレステロール、尿素窒素（BUN）、クレアチニン、カルシウム（Ca）、無機リン（P）、ナトリウム（Na）、クロール（Cl）、カリウム（K）、glutamic oxaloacetic transaminase（GOT）、glutamic pyruvic transaminase（GPT）、アルカリホスファターゼ（ALP）、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase（ $\gamma$ -GTP）。

血清中ホルモン測定項目：テストステロン（チューブ固相法、DPCトータルテストステロンキット、ニッポン・ディーピーシー・コーポレーション、東京）、エストラジオール（二抗体法、DPCエストラジオール二抗体キット、ニッポン・ディーピーシー・コーポレーション）、卵胞刺激ホルモン（FSH、二抗体法、Biotrak rFSH [<sup>125</sup>I] assay system、Amersham Life Science社、英国）、黄体形成ホルモン（LH、二抗体法、Biotrak rLH [<sup>125</sup>I] assay system、Amersham Life Science社）、プロラクチン（二抗体法、Biotrak rPRL [<sup>125</sup>I] assay system、Amersham Life Science社）。

### 6. 病理組織学的検査

固定後、肝臓、腎臓、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎、乳腺、精巣、精巣上体、前立腺、性嚢、凝固腺、卵巣、子宮（頸部を含む）、膣を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を作製し、Hematoxylin & Eosin（H.E.）染色を施して、病理組織学的検索を行った。そのほか、精子検査を実施した雄のFlutamide 4mg/kg投与群と対照群の各5匹の動物の精巣について、精子形成サイクルを考慮した精上皮細胞の定量的解析を実施した。この解析により、精上皮に対する障害作用をより高感度に検出することが可能となる。以下にその概略を記す。ラットのI～XIVの精子形成サイクルのステージを「I～VI」「VII～VIII」「IX～XI」「XII～XI

V」の4つのグループに分け、各動物について精巣のH.E.染色標本上の各グループに属する精細管4個ずつを対象として、セルトリ細胞、精祖細胞、パキテン期精母細胞、プレプトテン期精母細胞、レプトテン期精母細胞、ザイゴテン期精母細胞、ジプロテン期精母細胞、および円形精子細胞の数をカウントし、1セルトリ細胞当たりの各精上皮細胞数を算定した。MT投与群については、各動物の精巣のステージVII、VIII期における精細管のパキテン期精母細胞の変性細胞を有する精細管の数を測定した。

## 7. 精子検査

雄の各群5匹の右側の精巣及び精巣上体を材料として、(株)ボソリサーチセンター(静岡)に依頼して、下記検査項目について検査を行った。

精子の運動性：精巣上体尾部から精子塊を採取し、M199液(1% BSA添加)中で5分間培養後、顕微鏡下に観察視野中の総精子数と非運動精子数をカウントし、その値を基に運動率を算定した。

精子の数：精巣及び精巣上体(精子の運動性観察に用いた残り)をホモジナイズし、その希釈液を用いて精子頭部数をカウントし、組織1g中の精子数を算定した。

精子の形態：精子の運動性観察で作製した精子培養液をスライドガラスに塗抹、風乾後、精子1000個当たりの形態異常精子数及び異常型を調べ、形態異常精子の発現率を算定した。今回検索の対象とした形態異常は、非鉤型頭部(No hook)、鋭鉤型頭部(Excessive hook)、頭部不定形(Amorphous)、頭部欠損(No head)、針状頭部(Pin head)、双頭(Two head)、短尾(Short tail)及び双尾(Two tail)である。

## 8. 統計学的処理方法

血液学的検査値、白血球型分類データ、血清生化学的検査値、血清中ホルモンレベル、臓器の絶対重量と相対重量、精上皮型分類データ及び精子検査における精子数については、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合

の多重比較は、例数が等しければDunnett型で、また、例数が異なればScheffe型で、それぞれ対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。また、病理組織学的所見の発現率、精子の運動性及び形態異常精子の発現率についてはフィッシャーの直接確率法を用いて、対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

## C. 研究結果

### 1. 試験期間中の動物の一般状態

Flutamide投与群では、雌の1mg/kg投与群の1例にファイトニングによると思われる左側肩部及び右側頸部の脱毛と軽度の出血を認めた。MT投与群では、投与12日目に雌20mg/kg投与群で1例、14日目に雄5mg/kg投与群で1例死亡が認められた。雌動物の死因は特定できなかったが、雄動物は誤投与によるものと推定された。他には動物の一般状態に特に異常は認められず、また死亡例も無かった。

### 2. 体重の推移

試験期間中のFlutamide投与群の体重推移をFig.3に示した。雌においては対照群との間に顕著な差は認められなかったが、雄では軽度の体重増加抑制がみられた。雄の対照群に対する各群の体重増加抑制の程度は試験期間を通した平均で、4mg/kg投与群で3.3%、1mg/kg投与群で3.0%、0.25mg/kg投与群で3.2%といずれの群においても同程度であり、Flutamideの投与用量との間に相関は認められなかった。MT投与群では雄80 mg/kg投与群で対照群と比較して減少傾向がみられたが、逆に20mg/kgおよび5mg/kg投与群では増加傾向がみられた(Fig.4)。雌は各群ともに対照群と比較して増加し、20および80mg/kg投与群で明らかな増加が認められた。

### 3. 摂餌量の推移

Flutamide投与群の摂餌量の推移をFig.5に示した。雄では、対照群に比べて軽度の摂餌量の減少がみられた。雄の対照群に対する各群の摂餌量の減少の程度は試験期間を通した平均で、4mg/kg投与群で4.2%、1 mg/kg投与群で7.6%、0.25mg/kg投与群で5.6%であった。雌では、0.25mg/kg投与群で3.0%程度の摂餌量

の減少がみられたが、4及び1mg/kg投与群では、対照群との間に差は認められなかった。以上の摂餌量の減少については、雌雄ともFlutamideの投与用量との間に明らかな相関性はなかった。MT投与群では、ラット1日当りの平均摂餌量は雄各群ともに20g前後、雌は同様に各群ともに15g前後で推移し、雌雄とも有意差は認められなかった(Fig.6)。

#### 4. 雌の性周期

雌の性周期の観察を膣スメア法により投与開始の20日後から屠殺当日まで実施し、連日、全動物について性周期の時期（発情前期、発情期、発情後期、発情休止期）を判定した。Flutamide投与群の結果をTable 1 にまとめた。性周期の推移のパターンには個体差が認められたが、いずれの動物においてもほぼ正常に回転しており、持続発情等の周期の停止を来するような異常は認められなかったため、試験終了時、全ての動物を発情休止期に相当する日に屠殺した。しかし、対照群と1mg/kg投与群では全ての動物が4日を単位とする周期であったのに対し、4mg/kg投与群では6匹が4日、3匹が4~5日、1匹が5日、また、0.25mg/kg投与群では9匹が4日、1匹が5日を単位とする性周期を示し、特に最高用量群で性周期の期間の延長が多い傾向がみられた。MT投与群の性周期観察の結果をTable 2 に示す。80mg/kg投与群では正常の性周期は全く観察されなかった。その他の投与群では3例のみ正常の性周期を示さなかった。病理組織学的検査でも80mg/kg投与群を除き、ほとんどの動物において発情休止期であったことことから、スメア検査とほぼ一致した。

#### 5. 血液学的検査結果

雌雄とも、いずれの検査項目においても、対照群と投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった (Table 3,4)。白血球の型分類の結果では、MTの雄80mg/kg投与群でのみ単球の出現率が0.3%と有意に高かったが、それ以外の項目では雌雄各群とも有意差は認められなかった (Table 5,6)。

#### 6. 血清生化学的検査結果

雌雄とも、いずれの検査項目においても、対照群とF

lutamide、MT投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった (Table 7-10)。

#### 7. 血清中ホルモンレベル

Flutamideを投与した雄では、対照群に比べ、4mg/kg投与群で、軽度ながらテストステロンとエストラジオールの増加が統計学的有意に認められた。雌では、いずれの検査項目においても有意な差は認められず、また、テストステロンレベルはいずれも検出限界以下であった。雌ラットの最高用量で卵胞刺激ホルモンが対照群と比較して有意に高かったが、それ以外の項目では雌雄各群とも有意差は認められなかった (Table 11)。MT投与群では、雌ラットの最高用量で卵胞刺激ホルモンが対照群と比較して有意に高かったが、それ以外の項目では雌雄各群とも有意差は認められなかった (Table 12)。

#### 8. 臓器の絶対重量及び相対重量

Flutamide投与群の雄では、4mg/kg投与群で精巣上体の絶対重量と性嚢（性嚢+凝固腺+背側葉前立腺）の絶対重量及び相対重量の減少、1mg/kg投与群で精巣上体の絶対重量と相対重量の減少、0.25mg/kg投与群で肝臓の相対重量の減少が対照群に比べて統計学的有意に認められた (Table 13)。雌においては、絶対重量及び相対重量共にいずれの臓器においても対照群との間に有意な差は認められなかった (Table 14)。一方、MT投与群では、雄の80mg/kg投与群の精巣と精巣上体の絶対重量および相対重量は対照群と比較して有意な減少が認められ、肝臓および腎臓の相対重量で有意な増加を示した (Table 15)。雄の他の臓器については絶対重量および相対重量において有意差は認められなかった。雌では副腎と卵巣の絶対重量および相対重量が、全てのMT投与群で有意に減少した (Table 16)。80mg/kg投与群の肝臓の絶対重量、腎臓の絶対重量および相対重量で有意な増加、また20mg/kg投与群の子宮の絶対重量および相対重量では有意な減少が認められた。5mg/kg投与群の甲状腺の相対重量は有意に増加した。下垂体では全てのMT投与群で相対重量の有意な減少が認められた。

## 9. 病理組織学的検索結果

Flutamideの投与用量に相関した変化として、雄では、乳腺の小葉の萎縮が4及び1mg/kg投与群で認められ、その発生率と病変の程度は4mg/kg投与群で大きい傾向がみられた (Table 17)。そのほか、主な所見として、肝臓で肝細胞の小壊死巣と炎症性細胞浸潤、腎臓で尿細管の再生像とリンパ球の浸潤、精巣上体でリンパ球の浸潤、前立腺で腺上皮の壊死と炎症性細胞浸潤等が認められたが、いずれの所見もFlutamide投与群と対照群との間に発生頻度と病変の程度において差は認められなかった。また、剖検時の肉眼的所見として、4mg/kg投与群で精巣上体に小さな白色領域を1例に、対照群で腎臓に針頭大の陥凹を1例に認めたが、病理組織学的検査の結果、前者は精子肉芽、後者は梗塞巣であった。精巣においては、4mg/kg投与群で病理所見として円形精子細胞の巨細胞様変性を1例に認めたが、精子形成サイクルを考慮した精上皮細胞の定量的解析の結果 (Table 18) では、ステージIX~XIのグループにおいて4mg/kg投与群のレプトテ期精母細胞数の増加が、軽度ながら対照群に比べて統計学的有意に認められたほかは、明らかな変化はみられなかった。雌では、卵巢で黄体のルテイン細胞の肥大、子宮で内膜および子宮腺上皮細胞の分裂像、内膜固有層における間質細胞の肥大と炎症性細胞浸潤、膣で上皮の分裂像と好中球浸潤、粘膜下組織における好中球浸潤等が対照群を含む全ての動物において認められたが、その発生頻度や病変の程度において、各群間に差はみられなかった。以上の所見は、いずれも性周期の発情休止期に特徴的な組織像であり、解剖日の膣スメア法による性周期の判定が正しかったことが確認された。その他の主な所見として、肝臓で肝細胞の小壊死巣と炎症性細胞の浸潤、肝細胞の空胞変性、腎臓で尿細管の再生像とリンパ球の浸潤等が認められたが、いずれの所見もFlutamide投与群と対照群との間に発生頻度と病変の程度において差は認められなかった。

MT投与群の雄に観察された主な病理組織学的変化をTable 19 に示した。精巣では精細管の萎縮（び慢性）、ライディッヒ細胞の萎縮（限局性）がいずれも80mg/kg投与群で有意に増加した。他にはセルトリ細胞の空胞変性がMT投与群で対照群と比較して多

かったが、有意差は認められなかった。各動物の精巣のステージVII、VIII期における精細管のパキテ期精母細胞の変性細胞を有する精細管の出現率をFig.7 に示した。パキテ期精母細胞の変性細胞は80mg/kg投与群では30%以上出現し、有意差が認められた。精巣上体では80mg/kg投与群における上体内の変性細胞の増加が認められた。前立腺では間質の細胞浸潤が各群で1~3例ずつ認められた。その他、肝臓では小葉中心性に肝細胞の軽度の肥大と血管拡張が80mg/kg投与群で認められた。雌に観察された主な病理組織学的変化をTable 20 に示した。卵巢では多卵胞性卵胞が全てのMT投与群でみられ、対照群と比較して有意差に増加した。子宮では内腔拡張および子宮腺細胞の空胞変性が80mg/kg投与群で有意に増加した。膣では上皮が淡明な円柱状の細胞で構成された異常な性周期変化が80mg/kg投与群は10例と、有意に増加した。乳腺では乳管の過形成が20mg/kg投与群で3例みられ、80mg/kg投与群では10例で程度も強く、有意差が認められた。その他、肝臓では小葉中心性に肝細胞の軽度の肥大が80mg/kg投与群で認められた。また、副腎皮質網状帯細胞の軽度の萎縮が20mg/kg以上の投与群で認められた。

## 10. 精子検査結果

Flutamide投与群の精子検査の結果をTable 21にまとめた。精巣及び精巣上体1g当たりの精子数と精子の運動性については、いずれのにおいても対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。精子の形態異常については、対照群を含む全ての群で精子頭部が不定形の「頭部不定形」と頭部が欠損している「頭部欠損」が最も多く認められたほか、頭部の鉤型が鈍角になっている「非鉤型頭部」が4及び1mg/kg投与群と対照群でそれぞれ精子1000個当たり1個、頭部が針状になっている「針状頭部」が4mg/kg投与群で精子1000個当たり1個の割合でみられたが、Flutamide投与群におけるそれらの精子形態異常の発現率については対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。MT投与群の精子検査の結果をTable 22 に示した。精巣の精子数においては対照群と比較して差は認められなかった。精巣上体の精子数および精子運動能においてMT投与群は対照群と比較し

て減少傾向がみられたが、有意差は認められなかった。精子形態ではMT投与群で異常を示すものが増加する傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

#### D. 考察

今回、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングと安全性評価を目的とした"OECD Test Guideline 407 enhanced" 案の有用性を確認する目的で、非ステロイド性抗アンドロゲン作用物質であるFlutamideを4、1、0.25、0mg/kg体重の用量で、また合成男性ホルモンであるMTを80、20、5、0mg/kg体重（対照群）用量で雌雄のCrj:CD (SD) IGS系ラットに強制経口投与する28日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、まずFlutamideの投与用量に相関した変化として、雄では、血清中のテストステロンとエストラジオールレベルの上昇が4mg/kg投与群で、精巣上体重量の減少が4および1mg/kg投与群で、性嚢（性嚢+凝固腺+背側葉前立腺）重量の減少が4mg/kg投与群で、乳腺小葉の萎縮が4及び1mg/kg投与群で、精子形成サイクルのステージIX~XIのグループにおけるレプトテン期精母細胞数の増加が4mg/kg投与群で認められた。また、雌では、4mg/kg投与群で性周期の期間がやや延長する傾向がみられた以外に、Flutamideの投与に関連すると思われる明らかな変化は認められなかった。従って、Flutamideの無影響量は0.25mg/kgと考えられた。雄ラットに対するFlutamide強制経口投与の影響に関しては、Wistar系ラットに10、3、1mg/kgの用量で3日間投与した実験で、血清中のテストステロンレベルの増加が10及び3mg/kg投与群で、LHとFSHレベルの上昇が10mg/kg投与群で有意に認められた；Alderley Park系ラットに25、5、1mg/kgの用量で14日間投与した実験で、血清中テストステロンレベルの上昇が25及び5mg/kg投与群で、LHレベルの上昇が25mg/kg投与群で有意に認められたほか、性嚢と前立腺腹葉の重量の減少が用量相関性にみられた（精巣重量には差は認められなかった）；SD系ラットに75、7.5、0.75、0.075、0.0075mg/kgの用量で52週間投与した実験で、精巣重量の増加、精巣の間細胞過形成及び間細胞腫、精巣上体・性嚢・前立腺の萎縮、下垂体の重量増加と前葉過形成、体重増加抑制、摂餌量の減少が75及び7.5mg/kg投与群で、精巣の精細管萎縮、

精巣上体の精子減少、性嚢及び前立腺重量の減少、下垂体の去勢細胞増加が75mg/kg投与群で認められた；等の報告がみられる。今回の試験で認められた雄の血清中テストステロンレベルの上昇、精巣上体と性嚢重量の減少は、いずれも過去の報告にみられる所見と同様であり、発現した所見の程度と投与用量との関連性に関してもほぼ近似した結果であった。また、上記の52週間投与の実験において精巣の精細管萎縮が75mg/kgの大量投与で認められているが、今回の試験で認めたレプトテン期精母細胞数の増加に関しては、通常、精細管内の精上皮に対する毒性作用は精上皮の変性や壊死による数の減少として確認されること、精巣重量において群間に差がみられなかったこと、認められた細胞数の差も軽微であったこと等から、偶発的な差であると考えられた。血清中のエストラジオールレベルの上昇に関しては、エストラジオールがテストステロンから合成されることから、テストステロンレベルの上昇に伴う二次的な変化であると考えられた。乳腺小葉の萎縮に関しては、Sourlaらが卵巣摘出した雌のSD系ラットにおいて、アンドロゲンの前駆物質であるdehydroepiandrosteroneを投与すると乳腺の小葉の発達が見られること、この発達した乳腺小葉が抗エストロゲン作用物質であるEM-800の投与では何ら影響を受けないのに対し、抗アンドロゲン作用物質であるFlutamideの投与によって萎縮すること、また、BocuzziらがDMBA誘発乳腺腫瘍を持ったSD系ラットにFlutamideを投与すると乳腺腫瘍の発育抑制がみられ、この抑制作用がアンドロゲン受容体を発現した腫瘍において有効だが、アンドロゲン受容体の発現がない腫瘍においては無効であることを報告しており、以上の乳腺小葉の萎縮や乳腺腫瘍の発育抑制はFlutamideの抗アンドロゲン作用によるものであると考えられた。雄ではこのほか、Flutamideの投与用量に相関しない変化として、全てのFlutamide投与群において同程度の体重増加抑制が認められたが、これらは摂餌量の減少の程度と良く相関しており、カロリー摂取の低下による変化と考えられた。また、雌ラットに対するFlutamide強制経口投与の影響に関しては、Wistar系ラットに300、100、30mg/kgの用量で7日間投与した実験で、性周期の発情期出現の抑制が300及び100

mg/kg投与群でみられたとの報告がある。今回の試験においても、雌の性周期に対する影響として、性周期の期間がやや延長する傾向がみられた。Flutamideの性周期に対する作用に関しては、Opavskyらがゴナドトロピンを処置した未成熟ラットにおいてFlutamideの活性体であるHydroxyflutamideが発情前期のLH surgeを阻害して排卵を抑制することを報告しており、上記の性周期の異常もLH surgeの阻害による可能性が考えられた。Flutamideは非常に特異性の高い抗アンドロゲン作用物質であり、その作用機序に関しては、アンドロゲンの細胞内への取り込み阻害や核のアンドロゲン受容体と不活性な複合体を形成することによる等の報告がみられる。今回の試験の基礎とした"OECD Test Guideline 407 enhanced"案の目的は、被験物質のホルモン関連作用を高感度に検出する新しい試験系の確立であり、先に示した今回の試験における所見の多くがFlutamideの抗アンドロゲン作用を直接的あるいは間接的に反映したものと考えられることから、本試験法が種々のホルモン関連作用を検出し得るものであるということが出来る。MTは腎不全、子宮内膜症、手術不能の乳癌など様々な疾患の治療、また筋肉増強剤としても使用されている合成アンドロジェンの一つである。今回、MTの最高用量を80mg/kgとし、以下、公比4で20mg/kgおよび5mg/kgの各用量を強制経口投与で実施した結果、病理組織学的検査、体重測定、臓器重量測定、血清ホルモン測定および精子検査でMT投与による変化を捉えることが可能であり、なかでも病理組織学的検査が最も優れていた。MT投与により体重推移は、雄においては80mg/kg投与群で対照群と比較して増加抑制傾向がみられたが、5および20mg/kg投与群ではむしろ増加傾向がみられた。低用量のMTおよびMT誘導体をラットに投与すると筋肥大作用を示すことがすでに報告されている。本実験で用いた80mg/kg投与はMTの毒性作用がやや強く現れ、逆に5および20mg/kg投与では、筋肥大促進効果が現れたものと考えられる。一方、雌においては20および80mg/kg投与群では体重が対照群と比較して有意に増加していることから、筋肥大作用が強く働いているものと思われる。雄性臓器の絶対あるいは相対重量で変化が認められたのは80mg/kg投与群の精巣と精巣上

体であった。この群の精巣は病理組織学的にも精細管およびライディッヒ細胞の萎縮として観察された。また精細管のステージVII、VIII期でのパキテン期精母細胞の変性も高頻度に認められた。従って、雄でも過剰のMT投与は精母細胞の成熟過程に影響があることが明らかとなった。このように、精巣重量の変動は病理組織学的変化を反映していたことから、臓器重量および病理組織学的観察は、最も有効な指標と考えられる。血清ホルモンでは雄においては何れの項目についても有意差はみられなかったが、雌の80mg/kg投与群のFSH（卵巣刺激ホルモン）のみ有意に増加した。病理組織学的には80mg/kg投与群の卵巣は多卵性卵胞が全例にみられ、また膣上皮に異常な性周期変化が全例にみられた。マウスにエストロジェンを投与すると卵巣の多卵性卵胞や膣上皮の増殖性変化が出現することをTakinenらが報告しており、その結果と類似していることから雌におけるMTはエストロジェンと同様の作用をするのかも知れない。MT投与群の副腎の重量減少は皮質網状帯細胞の萎縮として観察された。副腎皮質網状帯細胞は性ホルモンを司る部位であることから、MT投与でフィードバックによる細胞の退縮が起こったものと考えられた。血清ホルモン測定は変動が大きいので評価が難しい面があった。雄では精巣に80mg/kg投与で明らかに変化が認められ、20および5mg/kg投与では変化はほとんど認められなかった。雌では5mg/kg投与でも卵巣に明らかに変化が認められ、無影響量を求めるにはさらに低用量の群を増やすか、あるいは公比を大きくするなど実験方法に工夫が必要であると思われる。精子検査は病理組織学的変化、体重および臓器重量の変動に比べて変化を捉えにくかったことから精子検査の有効性についてはさらに検討が必要である。血液学的検査および血清生化学的検査はホルモン作用にほとんど反映されなかった。次に試験法に関するいくつかの見解を記す。まず、今回の試験に採用した検査項目の内、ホルモンに関連した作用を検出し得た項目は、生殖器系組織の重量、血中ホルモンレベル、生殖器系組織の病理組織所見及び雌の性周期であった（但し、今回のFlutamideの試験においては、Flutamideの作用が雄に対して顕著であり、雌に対してはほとんど影響を与えな

ったことから、雌におけるホルモン関連作用の一般的な検出感度に関しては十分な評価はできなかつた)。今回の試験結果においては、以上の検査項目が検出感度の良い項目であったといえるが、更に検出感度を上げるために、いくつかの提案がある。雄に関しては、今回の試験でも実施したように、精巣において精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析を行うことにより、種々の精上皮に対する影響を詳細に解析することが出来る。雌に関しては、卵巣において種々の成熟段階の卵胞の数をカウントする等の定量的解析を行うこと、また、卵巣、子宮及び膣は性周期に連動して特徴的な組織像を示すことから、性周期を考慮した病理組織学的検索を実施することにより、通常の病理組織学的検査では得られない詳細な情報が得られるものと思われる。しかし、安易な検査項目の追加は試験の煩雑化を招くため、不要な検査項目の削除についても検討する必要がある。また、投与用量の設定に関しては、公比を4以内に留め、原則として3用量群と1対照群の計4群で試験群を構成し、高用量をホルモン作用の発現される用量、低用量を無影響量 (NOEL) とすることが今回の規定であった。しかし、既知の情報を利用できる Flutamide や MT でさえ、明らかなホルモン作用の発現と、作用の用量相関性及び NOEL を公比4を限度として用量設定することは難しく、実際のスクリーニングにおいて未知の微弱なホルモン作用を有する化学物質を対象とした場合は、前期の規定に従って適切な用量設定をすることは更に困難となる。対策として、試験群の数を増やすことも考えられるが、試験を更に煩雑化させてしまうため、用量段階の公比の上限を4以上に拡大することが、現実的な対応であると思われる。そのほか、ストレスが種々のホルモンレベルに影響を与えることが知られていることから、動物に対するストレスの影響を最小限に留める努力が必要である。本試験におけるストレスの要因としては、胃ゾンデ挿入による強制経口投与、雌の性周期検査 (膣スメア法) における膣垢の採取、屠殺前の絶食等が上げられる。強制経口投与と性周期

検査に関しては試験担当者の手技の熟練、屠殺前の絶食に関しては絶食を行わない等の対策が考えられる。また、強制経口投与に関しては、被験物質の投与方法を混餌や皮下投与に変更する対応も考えられるが、この場合は被験物質の安定性や溶解性を十分考慮する必要がある。

以上、試験方法に関していくつかの見解を記したが、今後これらの点や本研究班における他の被験物質の試験結果等を考慮して、試験法を改良してゆく必要があると思われた。

## E. 結論

化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法 "OECD Test Guideline 407 enhanced" 案に基づいて非ステロイド性の抗アンドロゲン作用物質として知られる Flutamide および合成男性ホルモンである Methyl testosterone のラット28日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、臓器重量、血清ホルモンレベル、病理組織学的所見がホルモン作用を検出する有効な指標であり、なかでもスメア検査やの精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析がすぐれた指標になり得ると考えられた。一方、用量設定基準、設定方法など今後検討を加える課題も残されている。

## F. 発表論文

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

豊田和宏、渋谷淳、田村啓、糀谷高敏、畝山智香子、広瀬雅雄：ラット28日間反復投与試験法 "OECD Guideline 407 enhanced" 確立のための Flutamide を用いた予備的検討 第26回日本トキシコロジー学会発表予定

## G. 知的所有権の取得状況

該当せず

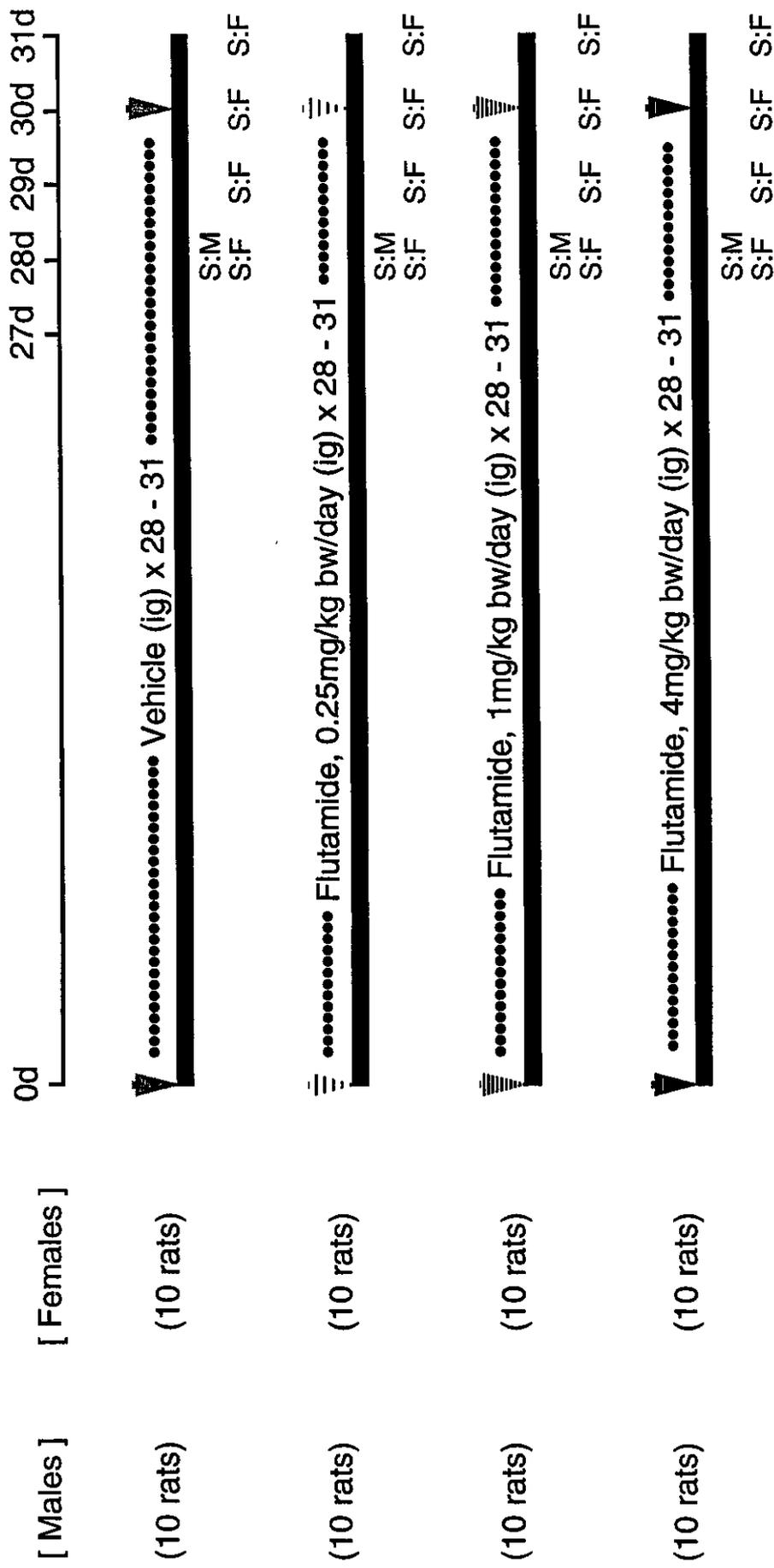


Fig. 1. Experimental design for the study of flutamide

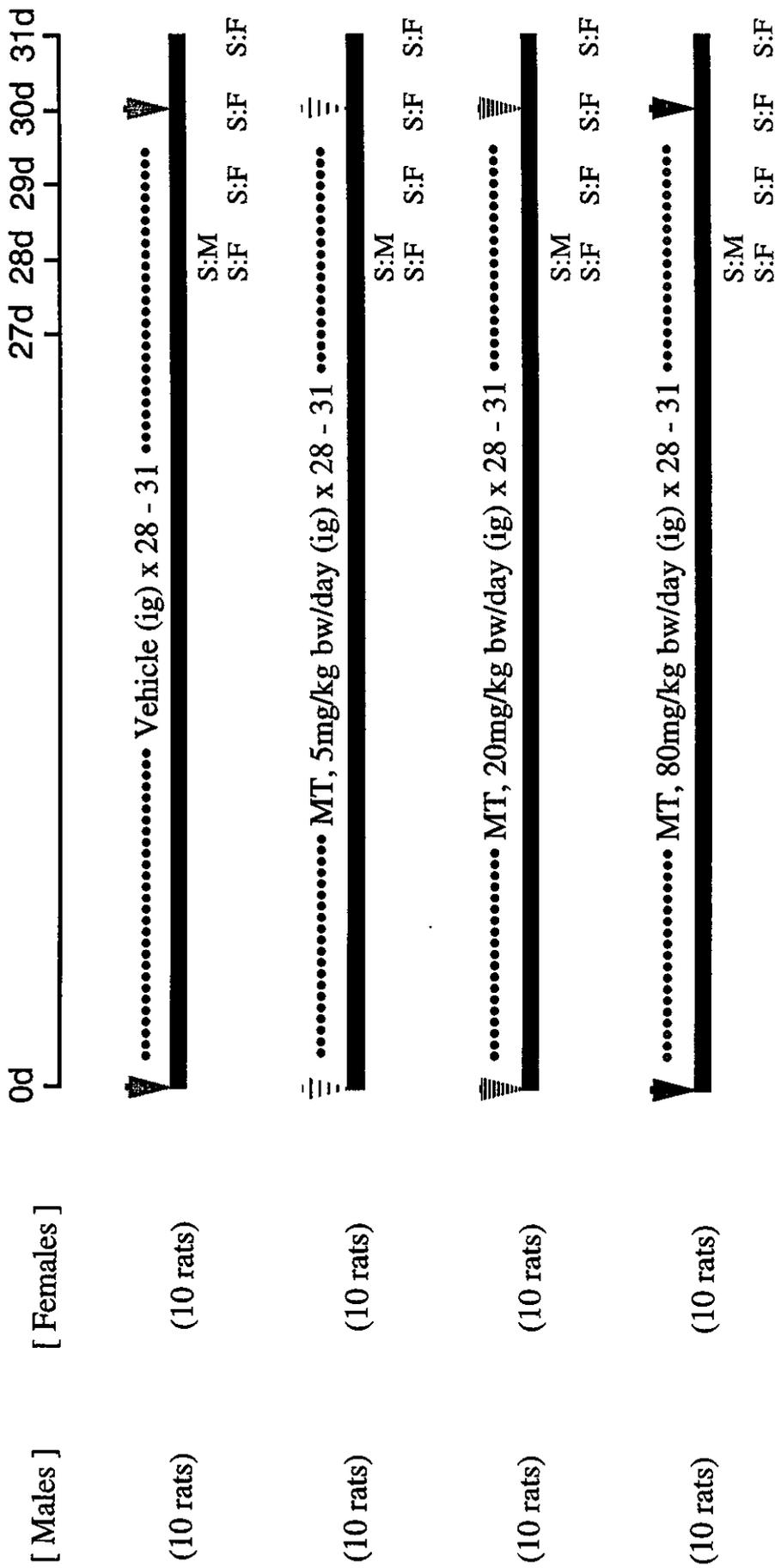


Fig. 2. Experimental design for the study of methyltestosterone

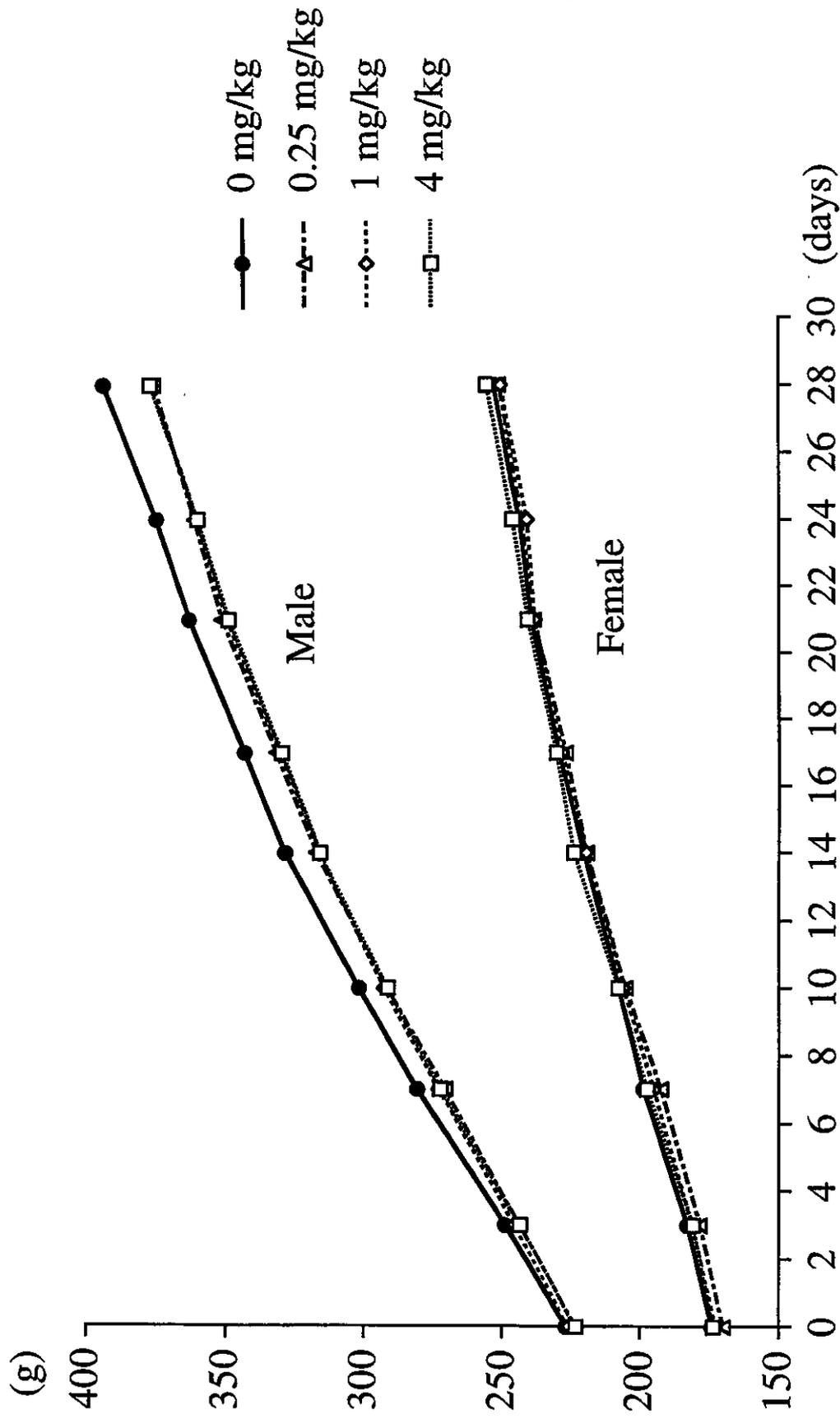


Fig. 3. Growth curves of rats treated with flutamide for 28 days

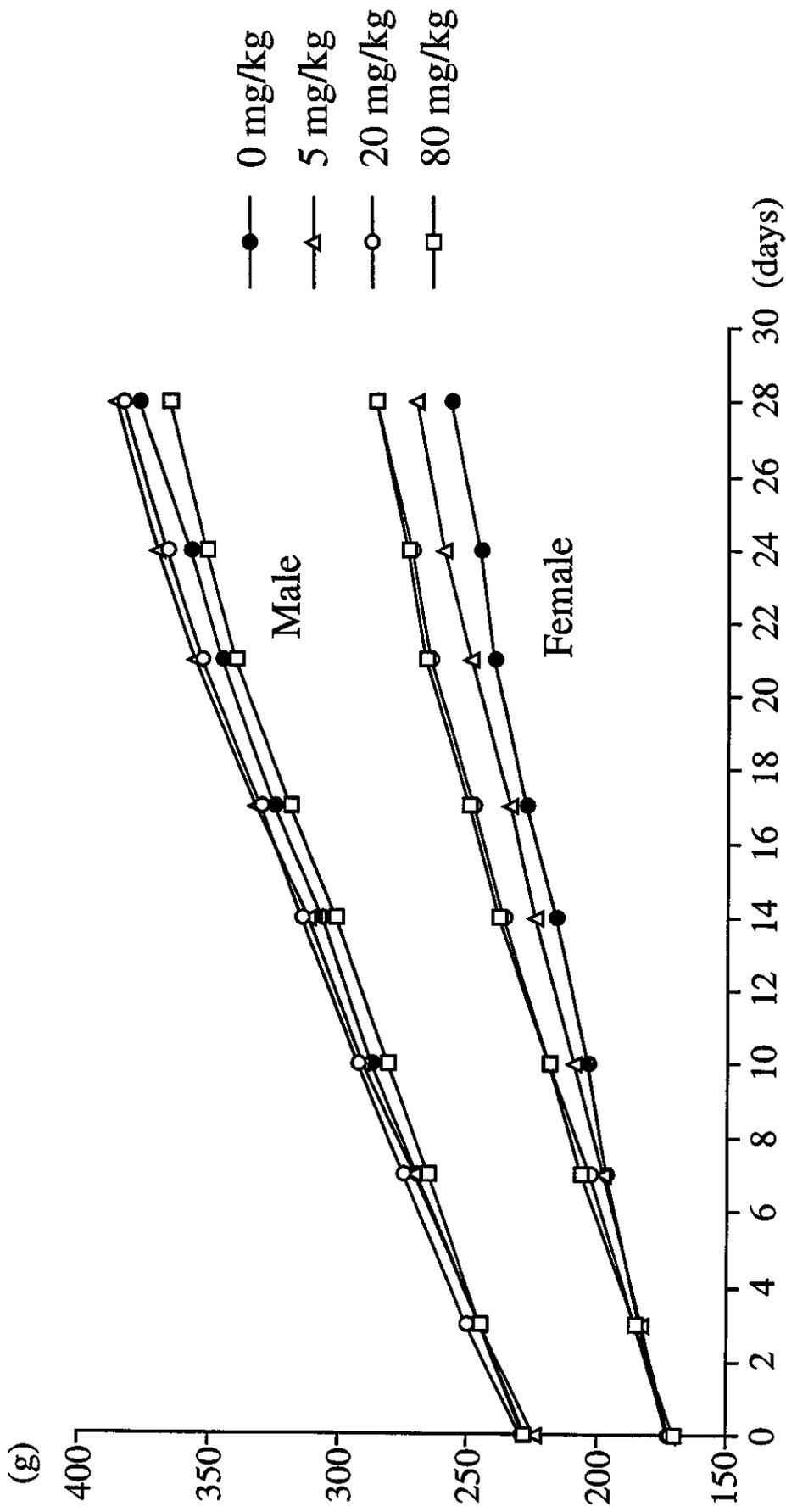


Fig. 4. Growth curves of rats treated with methyltestosterone for 28 days

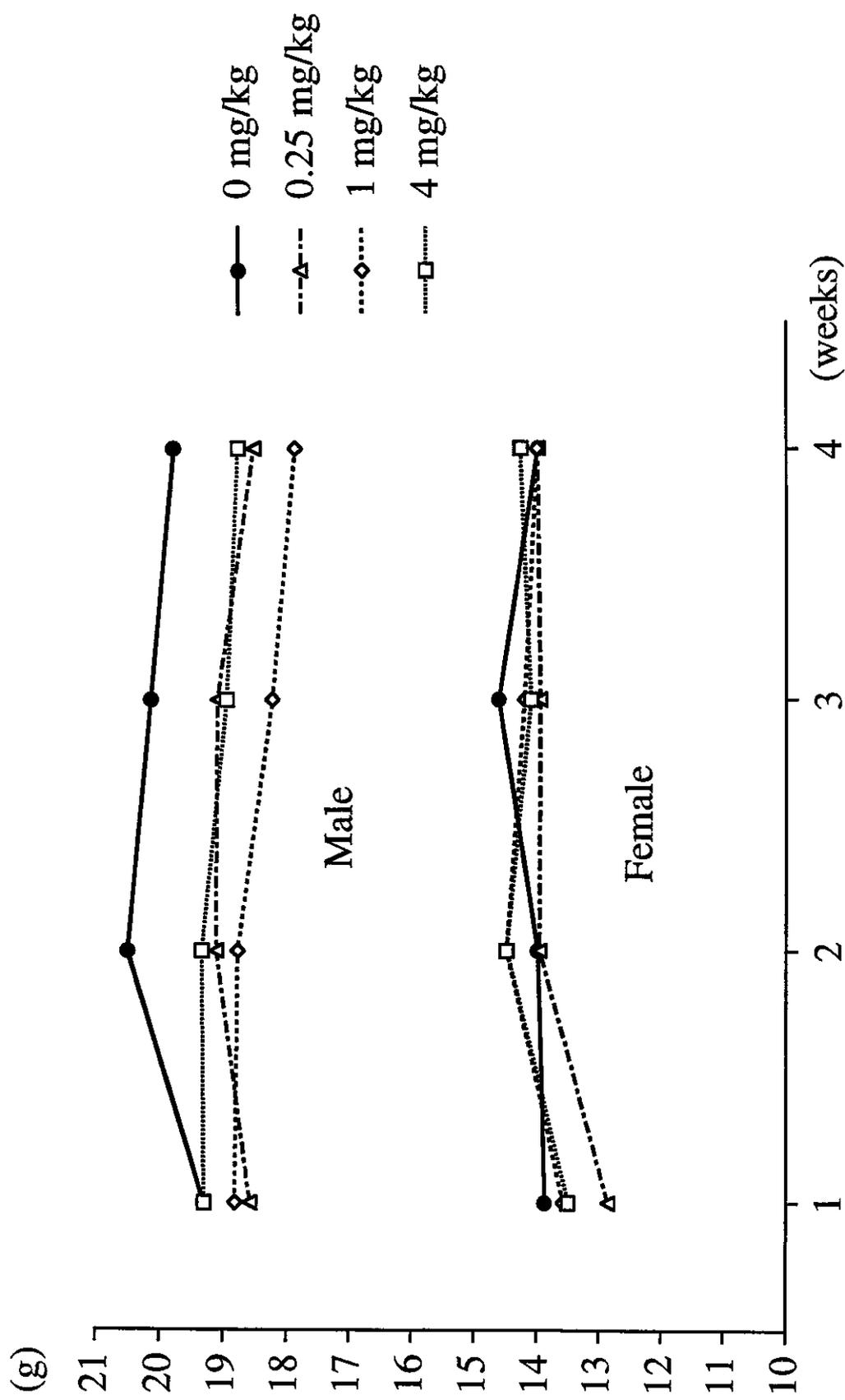


Fig. 5. Sequential food intakes of rats treated with flutamide for 28 days