

Table 19. Histopathological findings for male rats treated with methyltestosterone for 28 days

Dose level	0 mg/kg (10) ^a	5 mg/kg (9)	20 mg/kg (10)	80 mg/kg (10)
Testis				
Atrophy of seminiferous tubules, diffuse	0	0	0	6*
Atrophy of Leydig cells	0	0	0	8**
Vacuolation of Sertoli cells	3	6	7	7
Multinucleated giant cell formation	1	0	0	1
Epididymis				
Degenerated germ cells in lumen	0	1	3	6*
Spermatic granuloma	0	0	1	1
Prostate				
Interstitial lymphocyte infiltration	3	2	1	2

^a: Numbers in parentheses represent the number of rats examined.

*, ** Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Table 20. Histopathological findings for female rats treated with methyltestosterone for 28-31 days

Dose level	0 mg/kg	5 mg/kg	20 mg/kg	80 mg/kg
	(10) ^a	(10)	(9)	(10)
Ovary				
Multiple follicular cysts	0	4*	9**	10**
Follicles cyst	0	0	2	0
Lutein cyst	0	0	1	2
Uterus				
Dilatation of lumen	0	2	1	6*
Vacuolation of endometrial cells	0	0	1	8**
Vagina				
Abnormal estrus cycle	0	0	1	10**
Mammary gland				
Hyperplasia	0	0	3	10**
Adrenal				
Atrophy of zona reticularis	0	0	4*	10**

^a: Numbers in parentheses represent the number of rats examined.

*,** Significantly different from the 0 mg/kg group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 21. Sperm number, motility and morphology in male rats treated with flutamide for 28 days

Dose level	0 mg/kg (5) ^a	0.25 mg/kg (5)	1 mg/kg (5)	4 mg/kg (5)
No. of sperms in the testis (x10 ⁶ /g)	147.9 ± 11.0	150.1 ± 14.5	158.1 ± 19.5	137.7 ± 11.9
No. of sperms in the epididymis (x10 ⁶ /g)	711.4 ± 116.0	626.5 ± 152.6	675.7 ± 208.0	541.6 ± 148.3
Motility of sperms (%)	82.6 ± 3.5	81.2 ± 8.3	76.1 ± 9.4	78.4 ± 7.4
No. of sperms examined	128 ± 37	114 ± 44	91 ± 45	72 ± 22
No. of moveless sperms	22 ± 8	19 ± 5	20 ± 8	15 ± 5
Incidences of abnormal sperms (%)	6.9 ± 0.9	7.4 ± 3.2	6.6 ± 3.0	6.7 ± 3.5
No hook (no./1000 sperms)	1	0	1	1
Excessive hook (no./1000 sperms)	0	0	0	0
Amorphous (no./1000 sperms)	33	32	35	38
No head (no./1000 sperms)	35	42	30	27
Pin head (no./1000 sperms)	0	0	0	1
Two head (no./1000 sperms)	0	0	0	0
Short tail (no./1000 sperms)	0	0	0	0
Two tail (no./1000 sperms)	0	0	0	0

a : numbers in parentheses represent the numbers of rats examined.
Data represent mean values ± S.D.

Table 22. Sperm number, motility and morphology in male rats treated with methyltestosterone for 28 days

Dose level	0 mg/kg (5) ^a	5 mg/kg (5)	20 mg/kg (5)	80 mg/kg (5)
No. of sperms in the testis (x10 ⁶ /g)	153.8±23.7	166.1±15.1	153.8±11.5	170.8±19.7
No. of sperms in the epididymis (x10 ⁶ /g)	936.9±110.1	845.5±123.2	739.8±229.9	768.0±193.2
Motility of sperms (%)	82.7±10.1	82.7±7.9	65.0±29.6	78.7±17.1
No. of sperms examined	112±28	87±13	89±27	94±50
No. of moveless sperms	17±6	14±5	25±13	16±6
Incidences of abnormal sperms (%)	9.8±4.6	14.2±5.0	19.7±13.7	15.3±3.1
No hook (no./1000 sperms)	0	1	0	0
Excessive hook (no./1000 sperms)	0	0	0	0
Amorphous (no./1000 sperms)	60	79	37	76
No head (no./1000 sperms)	38	61	160	77
Pin head (no./1000 sperms)	0	1	0	0
Two head (no./1000 sperms)	0	0	0	0
Short tail (no./1000 sperms)	0	0	0	0
Two tail (no./1000 sperms)	0	0	0	0

^a : Numbers in parentheses represent the numbers of rats examined.
Data represent mean values ± S.D.

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

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リデーションプロジェクト)

子宮重量等を指標とした生体試験

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・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、子宮重量等を指標とした生体試験を行うことを目的とした基礎的研究を行った。当初の予定では、経済協力開発機構 (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、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。すなわち、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学問的情報が不足していることが認識され、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。

ハーシュバーガー試験については、米国内でのリードラボの選定が大幅におくれ、暫定プロトコルの設定すら行われなかったため、実質的検討が行えず、従って本研究年度中にはごく初期の段階の検討実験を行うに留まった。

A. 研究目的

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る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で、そのような作用の物質の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た。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。本研究では、それを受け、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。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、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。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。

この OECD の子宮肥大試験プロジェクトにおいて、当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。

B. 研究方法

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、ゲニステイン、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ル作成に必要な基礎データを収集した。

C. 研究結果

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、組織学的に卵巢における黄体発現 (性周期の開始) と一致しており、卵巢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。また、膣開口日が用量依存的に早くなることも確認されたが、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。卵巢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：

卵巢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週令および6週令の雄SDラットを去勢後7日目より種々の容量のテストステロンプロピオネートおよび一定量のフルタミドを皮下投与し、前立腺腹側葉、性腺凝固腺、球海綿体筋、精巣上体の重量変化を観察した。その結果、テストステロンの容量に相関した上記標的臓器の重量増加と、そのフルタミドによる阻害効果が確認された。また、身体の大い6週令動物を用いた方が、手技的に扱いが容易で、結果としてホルモン作用の検出感度が良好であることが示された。

D. 考察

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巢機能の開始と重なるため、系の感度が悪くなること、絶対的感度は卵巢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。

E. 結論

本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ラボとなったと考えられる。

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 Ca²⁺ 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- β 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 H 10 年 7 月

2. 学会発表

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto, Atsuya Takagi, 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

平成 10 年度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

分担課題:子宮重量を指標とした生体試験

分担研究者 山崎寛治 (財)化学品検査協会化学品安全センター日田研究所・試験研究課長

研究要旨

エストロゲン作用物質である ethynyl estradiol (EE)及び抗エストロゲン作用物質である ZM189154 (ZM)を 19 日齢の幼若雌 Crj: CD® (SD) IGS BR ラットに 3 日間経口または皮下投与し、子宮重量を指標として、これらの作用の検出が可能かどうか、またいずれの投与経路が感度において優れているかを検討した。さらに、卵巣を摘出した成熟ラットを用いて、皮下投与による同様の実験を行った。各々の実験において、無処置対照群、媒体対照群、EE 投与群として 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、ZM 投与群として 0.1、1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の各群を設け、毎日 1 回 3 日間投与した。なお、ZM 投与群の動物には、EE を陽性対照物質として ZM と同時に投与した。最終投与の約 24 時間後にエーテル麻酔下にて放血安楽死させた。子宮重量測定の際、子宮腔内の内容液を取り除かないままの状態の重量(wet weight)に加え、両子宮角に割を入れ、湿らせたろ紙に子宮腔内の内容液をしみ出させた後の重量(blotted weight)を測定した。幼若雌ラット経口投与、皮下投与、卵巣摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、EE のエストロゲン作用及び ZM の抗エストロゲン作用を検出することができた。また、子宮の絶対重量、相対重量、wet weight、blotted weight のいずれにおいても同様の検出感度が得られた。投与経路については、幼若ラット皮下投与では EE 0.3、経口投与では EE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の群で子宮重量の有意な増加がみられ、前者が後者に比べて EE の作用を高感度に検出した。また、幼若ラットと卵巣摘出ラットの皮下投与では、同様の感度を示した。今回の実験は、強力なエストロゲン作用を持つ物質用いたものであり、投与経路及びどのような動物を使用するかについては、今後さらに弱い作用を持った物質を用いた validation 作業において検討する必要がある。

A. 研究目的

近年、いくつかの化学物質が生体の内分泌機能を攪乱し、ヒトあるいは野生動物の生活に影響を及ぼす懸念が報告されている。そこで、化学物質をげっ歯類に投与し、子宮重量を指標として、内分泌攪乱作用を短期間に検出する試みがなされてきた。最近、子宮増殖アッセイが in vivo における化学物質のエストロゲンあるいは抗エストロゲン作用を検出するためのスクリーニング手法として提案されている。しかし、これらの検出試験に用いられる動物や化学物質の投与経路などは様々であり、未だ決まった方法は確立されていない。そこで我々は、強いエストロゲン作用を持つ ethynylestradiol (EE)及びエストロゲンの完全アンタゴニストである ZM189154 (ZM)を用い、これら

を春期発動以前の幼若雌ラットに3日間経口または皮下投与し、子宮重量を指標として、これらの物質の持つエストロゲン作用または抗エストロゲン作用の検出が可能かどうか、またいずれの投与経路が感度において優れているかを検討した。さらに、卵巣摘出成熟ラットを用いて、皮下投与による同様の実験を行い、幼若ラットとの検出感度の違いの有無を検討した。

B. 研究方法

試験物質: エストロゲン作用物質として、ethynylestradiol (Schering AG、ベルリン、ドイツ)を、抗エストロゲン作用物質として ZM189154 (AstraZeneca Central Toxicology Laboratory、マクレスフィールド、イギリス)を用いた。媒体には皮

下投与、経口投与ともに、10%エタノールオリーブ油を用いた。エタノールは和光純薬株式会社(大阪)から、オリーブ油は株式会社フデミ製薬所(大阪)から購入した。

動物:いずれの動物も、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、換気回数 10-15 回/時、明暗サイクル 12 時間明(7:00-19:00)、12 時間暗(19:00-7:00)のバリアシステム環境下で飼育した。

1) 幼若雌ラット

妊娠 14 日目の Crj: CD® (SD) IGS BR ラット(日本チャールズリバー株式会社、滋賀)を購入した。自然分娩させ得られた出生児を生後 17 日に離乳し、体重無作為抽出法で群分け後試験に使用した。体重の均一化を考慮し分娩 4 日目に親 1 匹につき出生児数が 8 匹になるように腹児数を調節した。飼料は離乳前は CRF1(オリエンタル酵母株式会社、東京)、離乳後は MF (オリエンタル酵母株式会社、東京)を自由摂取させた。水は離乳前は吸水ビンにより、離乳後は自動給水装置により自由摂取とした。飼育様式は離乳前はポリカーボネートケージによる群飼育、離乳後は金網ケージによる個別飼育とした。投与開始日は群分け 2 日後とした。

各実験の群構成を表に示す。

幼若ラット経口投与

実験群	動物数	投与容量 (ml/kg)
無処置対照群	6	0
媒体対照群	6	4
EE 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	4
EE 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	4
EE 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	4
EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	4
EE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	4
EE 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	4
EE 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	4
ZM 0.1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ + EE 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	ZM 2 + EE 2
ZM 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ + EE 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群	6	ZM 2 + EE 2

2) 卵巣摘出ラット

5 週齢の Crj: CD® (SD) IGS BR ラット(日本チャールズリバー株式会社、滋賀)を購入した。6 週齢時に卵巣摘出術を施し、術後群分け時まで性周期検査を実施し、性周期が休止期を示していることが確認された動物を 7 週齢で群分けに供した。飼料は MF (オリエンタル酵母株式会社、東京)を、また水は自動給水装置により自由摂取させた。飼育様式は金網ケージによる個別飼育とした。投与開始日は群分け 1 日後とした。

投与: 幼若ラット経口投与、幼若ラット皮下投与、卵巣摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、無処置対照群、媒体対照群、EE 投与群として 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、ZM 投与群として 0.1、1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の各群を設け、毎日 1 回 3 日間投与した。なお、ZM 投与群の動物には、EE を陽性対照物質として、幼若ラット経口投与実験では 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、幼若ラット皮下投与及び卵巣摘出ラット皮下投与実験では 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を ZM と同時に投与した。また、各群の動物数は 6 匹とした。なお、経口投与は金属ゾンデによる強制経口投与、皮下投与は注射筒と注射針による頸背部皮下への投与とした。

幼若ラット皮下投与、卵巢摘出ラット皮下投与

実験群	動物数	投与容量 (ml/kg)
無処置対照群	6	0
媒体対照群	6	4
EE 0.01 µg/kg/day 群	6	4
EE 0.03 µg/kg/day 群	6	4
EE 0.1 µg/kg/day 群	6	4
EE 0.3 µg/kg/day 群	6	4
EE 1 µg/kg/day 群	6	4
EE 3 µg/kg/day 群	6	4
EE 10 µg/kg/day 群	6	4
ZM 0.1 mg/kg/day + EE 0.3 µg/kg/day 群	6	ZM 2 + EE 2
ZM 1 mg/kg/day + EE 0.3 µg/kg/day 群	6	ZM 2 + EE 2

検査項目:投与期間中の体重、摂餌量は毎日測定した。一般状態の観察は毎日行った。最終投与の約 24 時間後にエーテル麻酔下にて両大腿動脈から放血安楽死させた。子宮は、脂肪及び付属組織を丁寧に切り離し、重量測定を行った。この際、子宮腔内の内容液を取り除かないままの状態の重量(wet weight)に加え、両子宮角に割を入れ、湿らせたろ紙に子宮腔内の内容液をしみ出させた後の重量(blotted weight)を測定した。

統計学的処理:試験群の器官重量について、各群の 2 群間で F 検定による等分散検定を行い、5%有意水準で等分散が認められた場合、Student の t 検定を行った。等分散が認められない場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。

C. 研究結果

幼若ラット経口投与:投与期間中の一般状態、体重、摂餌量に異常はみられなかった。群分け日から投与 1 日目にかけて、無処置、媒体対照を含むすべての群で体重の減少がみられた (Fig 1 A)。子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight とも同様の傾向を示した。すなわち、EE 投与群では、1µg/kg 以上の群で有意な増加がみられた。また、最高用量群 (10µg/kg 群)でも子宮重量の曲線はプラトーに達せず、子宮重量増加は飽和に至らなかった。ZM 投与群では、0.1mg/kg 群で、同用量の EE のみを投与した EE 3µg/kg 群と比較して、有意な子宮重量の減少がみられた (Fig. 2, 3)。

幼若ラット皮下投与:投与期間中の一般状態、体重、摂餌量に異常はみられなかった。群分け日から投与 1 日目にかけて、無処置、媒体対照を含むすべての群で体重の減少がみられた (Fig. 1 A)。子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight とも同様の傾向を示した。すなわち、EE 投与群では、0.3 µg/kg 以上の群で有意な増加がみられた。また、wet weight では 3 µg/kg 以上の群、blotted weight では 1 µg/kg 以上の群で、子宮重量増加曲線は傾きを減じ、EE 投与に対する子宮重量増加反応は飽和状態に達したことが示唆された。ZM 投与群では、0.1 mg/kg 群で、同用量の EE のみを投与した EE 0.3 µg/kg 群と比較して、有意な子宮重量の減少がみられた (Fig. 4, 5)。

卵巢摘出ラット皮下投与:投与期間中の一般状態に異常はみられなかった。体重の増加抑制傾向及び摂餌量の減少傾向が EE の投与量の増加とともに顕著にみられた (Fig. 1 A, B)。子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight とも、同様の傾向を示した。すなわち、EE 投与群では、0.3 µg/kg 以上の群で有意な増加がみられた。また、wet weight では 3 µg/kg 以上の群、blotted weight では 1 µg/kg 以上の群で、子宮重量増加曲線は傾きを減じ、EE 投与に対する子宮重量増加反応は飽和状態に達したことが示唆された。ZM 投与群では、0.1 mg/kg 群で、同用量の EE のみを投与した EE 0.3 µg/kg 群と比較して、有意な子宮重量の減少がみられた (Fig. 6, 7)。

D. 考察

EE 及び ZM を幼若雌 Crj: CD® (SD) IGS BR ラットに 3 日間経口または皮下投与し、子宮重量を指標として、エストロゲン作用または抗エストロゲン作用の検出が可能かどうか、またいずれの投与経路が感度において優れているかを検討した。さらに、卵巢摘出ラットを用いて、皮下投与による同様の実験を行った。幼若雌ラット経口投与、皮下投与、卵巢摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、EE のエストロゲン作用及び ZM の抗エストロゲン作用を検出することができた。

しかし、幼若ラット経口投与と皮下投与を比較した場合、絶対重量、相対重量、wet weight、blotted weight すべてにおいて、皮下投与では EE 0.3 µg/kg 以上の群で有意な子宮重量増加がみられたのに対し、経口投与における子宮重量増加は EE 1 µg/kg 以上の群でみられ、また高用量の 10 µg/kg 群でも子宮重量の曲線はプラトーに達しなかったことから、皮下投与の方が経口投与よりも高感度に EE のエストロゲン作用を検出できると考えられる。EE と同様に、17β-estradiol、estradiol benzoate においても、皮下投与が経口投与よりも高感度にその作用が子宮増殖アッセイにおいて検出されたとする報告がある。一方、methoxychlor のように、経口投与の方が皮下投与に比べてより低い用量でエストロゲン作用が検出されるような物質も存在する。本物質は哺乳動物において生殖毒性を引き起こすことが知られており、またその代謝物がエストロゲン活性を持つことが示されている。一方、幼若ラット皮下投与及び卵巢摘出ラット皮下投与間では感度の差は認められなかった。今回の子宮重量測定では、wet weight 及び blotted weight を測定した。blotted weight は、子宮内に貯留する水様液を除いた重量である。今回のいずれの実験においても、wet weight 及び blotted weight の間に感度の差はみられなかった。子宮内の水様液の貯留はエストロゲン作用に特異的な所見であり、投与後約 6 時間でピークに達するとされているが感度は低いといわれている。我々の実験においても、wet weight と blotted weight の差がみられ始めた、すなわち、子宮内への水様液の貯留がみられ始めたのは有意な子宮重量増加がみられた用量よりも高い用量からであった (Fig. 2-7)。今後我々がスクリーニングを行っていくであろう化学物質は、今回用いた EE ほど強力なエストロゲン作

用を持っているとは考えにくく、したがって子宮内の水様液の貯留も、少なくとも最終投与 24 時間後の解剖では観察されにくいと考えられる。

卵巢摘出ラットにおいて、EE の用量に依存して体重の増加抑制がみられた。今回の実験では、子宮の絶対及び相対重量のいずれにおいても EE 0.3 µg/kg 以上の群で有意な増加が同様にみられたが、用量依存性の体重増加抑制がみられた場合、絶対重量に差がみられなくとも相対重量に差がみられる場合がある可能性があり、相対重量も重要なエンドポイントとなると考えられる。

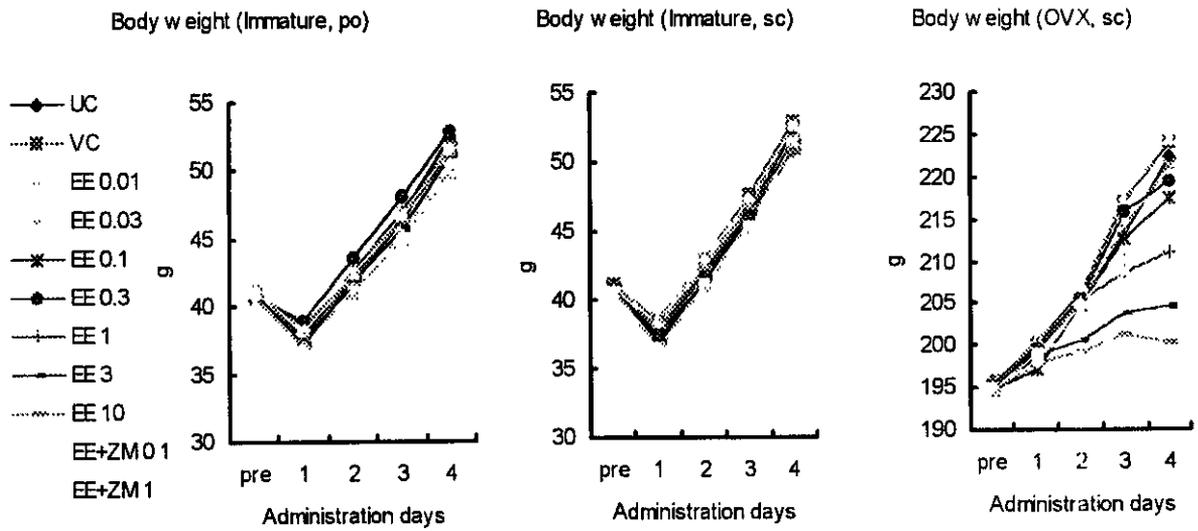
幼若ラットを用いたいずれの実験においても群分け日から投与開始日にかけて体重減少がみられた。これは、離乳から個別飼育という環境の変化によるストレスが原因と考えられる。投与開始日以降は順調に体重増加がみられ、またエストロゲン作用が期待されたとおりに検出可能であったとはいえ、動物の環境への適応が不完全な状態において実験を開始することは好ましいことはいえない。今後、離乳時のストレスを軽減するような飼育方法について考慮する必要がある。

E. 結論

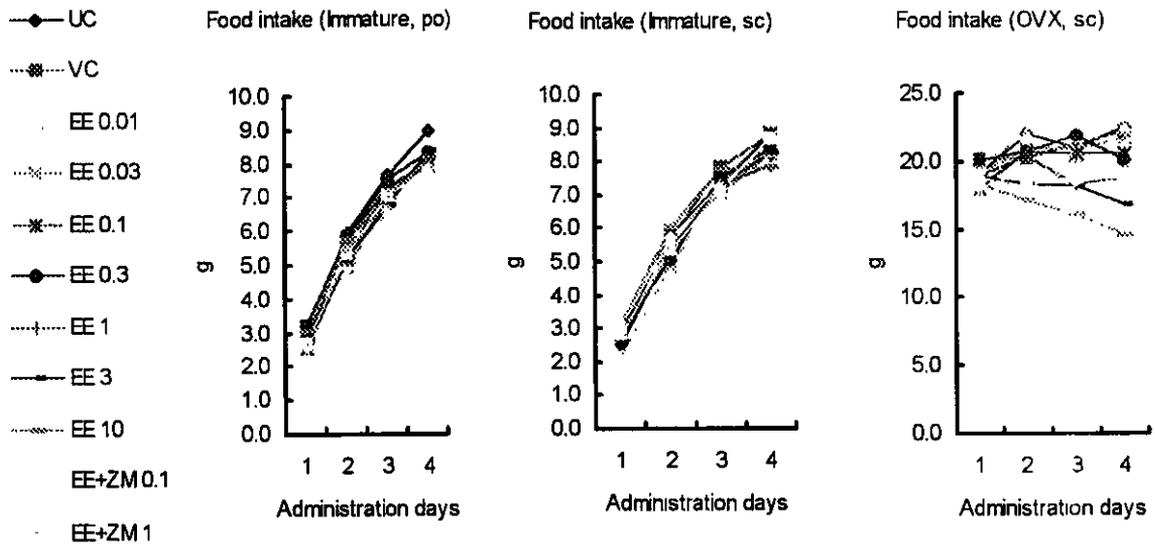
幼若雌ラット経口投与、皮下投与、卵巢摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、EE のエストロゲン作用及び ZM の抗エストロゲン作用を検出することができた。また、子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight のいずれにおいても同様の検出感度が得られた。投与経路については、皮下投与が経口投与に比べて EE の作用を高感度に検出した。ただし、methoxychlor のような経口投与においてより高感度に検出できる化学物質も存在するため、一概に皮下投与が高感度とはいえず、本件は今後の validation 作業においてさらに検討する必要がある。また、幼若ラットと卵巢摘出ラットについては、同様の感度を示したが、今回の実験は強力なエストロゲン作用を持つ物質用いたものであり、より弱い作用を持つ化学物質を用いた validation 作業において今後も検討する必要がある。この他、課題として、幼若ラットを用いる際の群分け後の体重減少を来すようなストレスを軽減する飼育方法の検討が必要と考えられる。

F. 研究発表

なし



A



B

Figure 1 (A) Mean body weights and (B) Mean food intakes in each study.
 po, oral administration; sc, subcutaneous administration; OVX, ovariectomized.
 Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, respectively.
 UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

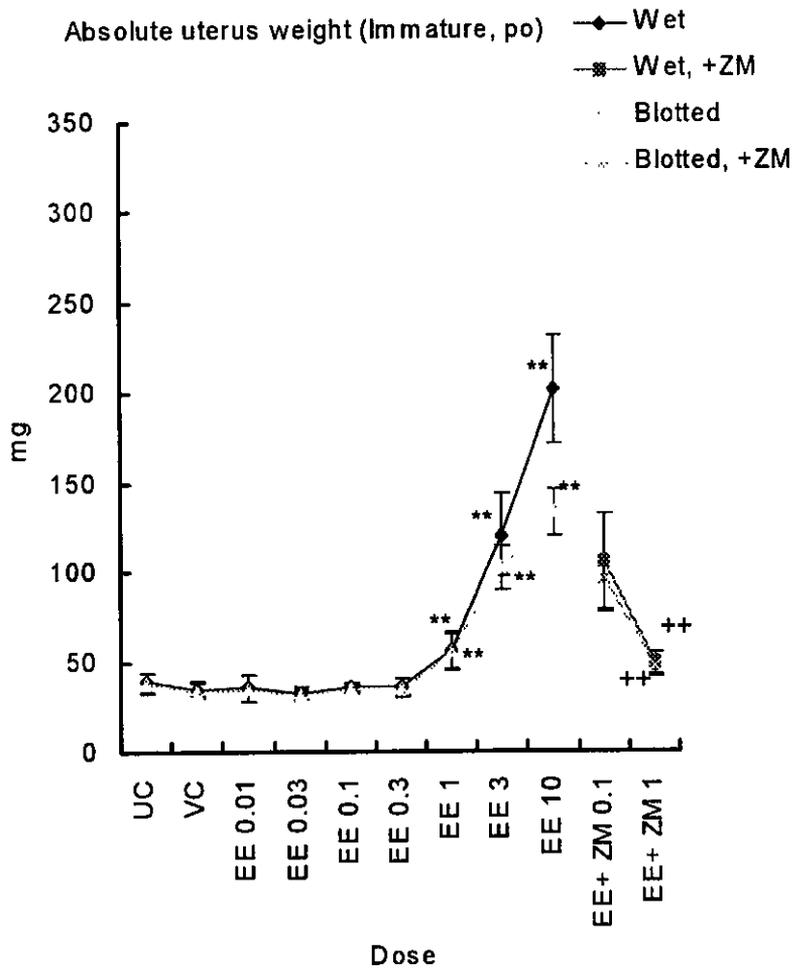


Figure 2 Absolute uterus weight of intact immature rats in oral administration study
 Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, respectively
 UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

** , Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++ , Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

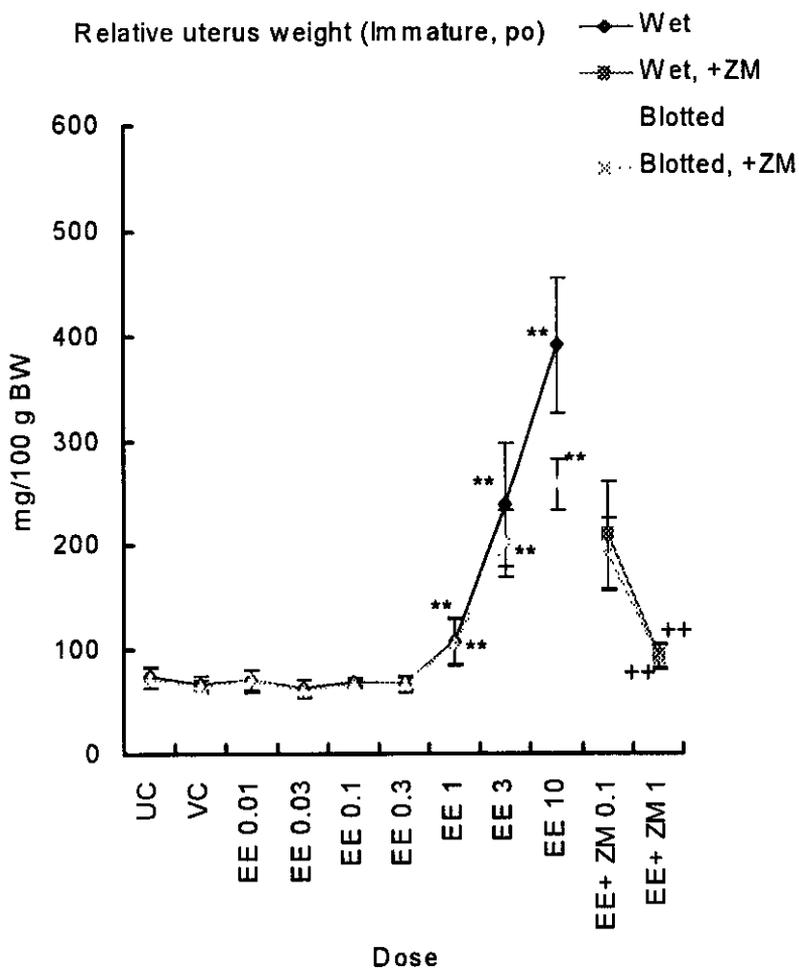


Figure 3 Relative uterus weight of intact immature rats in oral administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

** , Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++ , Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test)

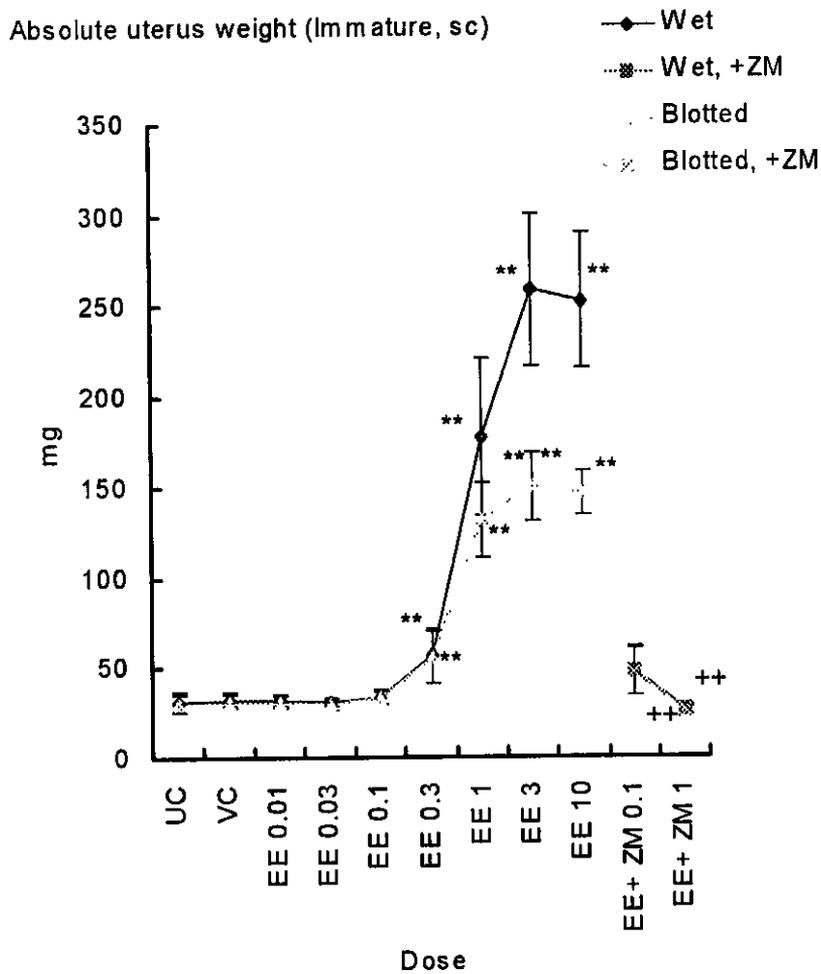


Figure 4 Absolute uterus weight of intact immature rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

** , Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test)

++ , Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

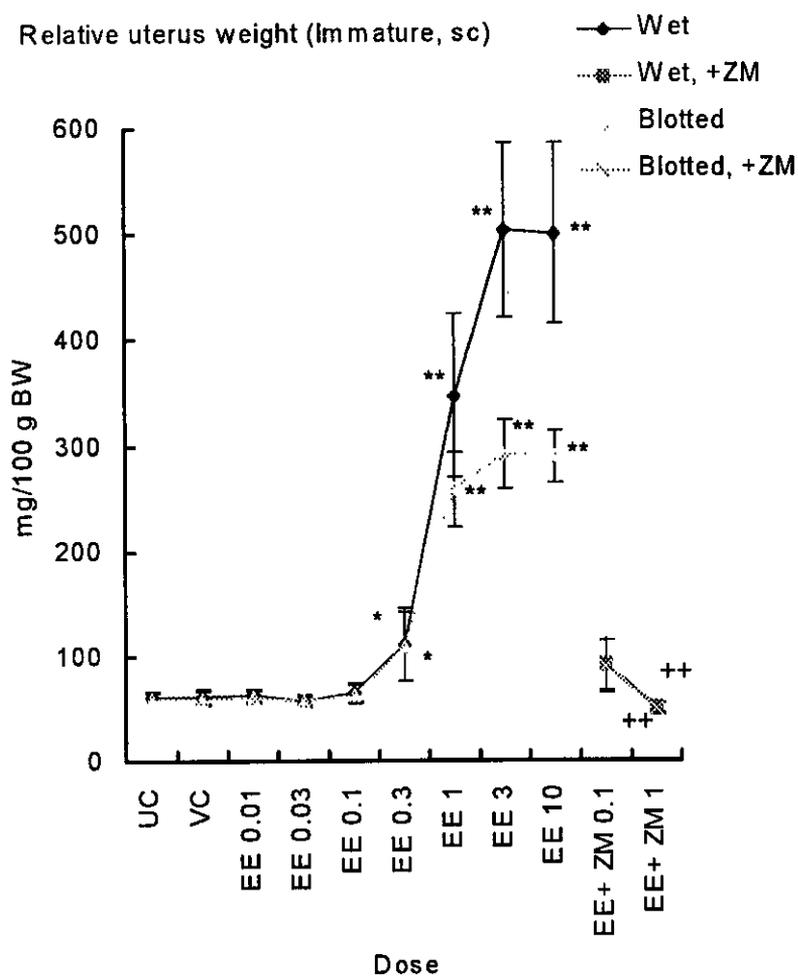


Figure 5 Relative uterus weight of intact immature rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

*, Significantly different from vehicle control ($P < 0.05$, t-test).

** , Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++ , Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

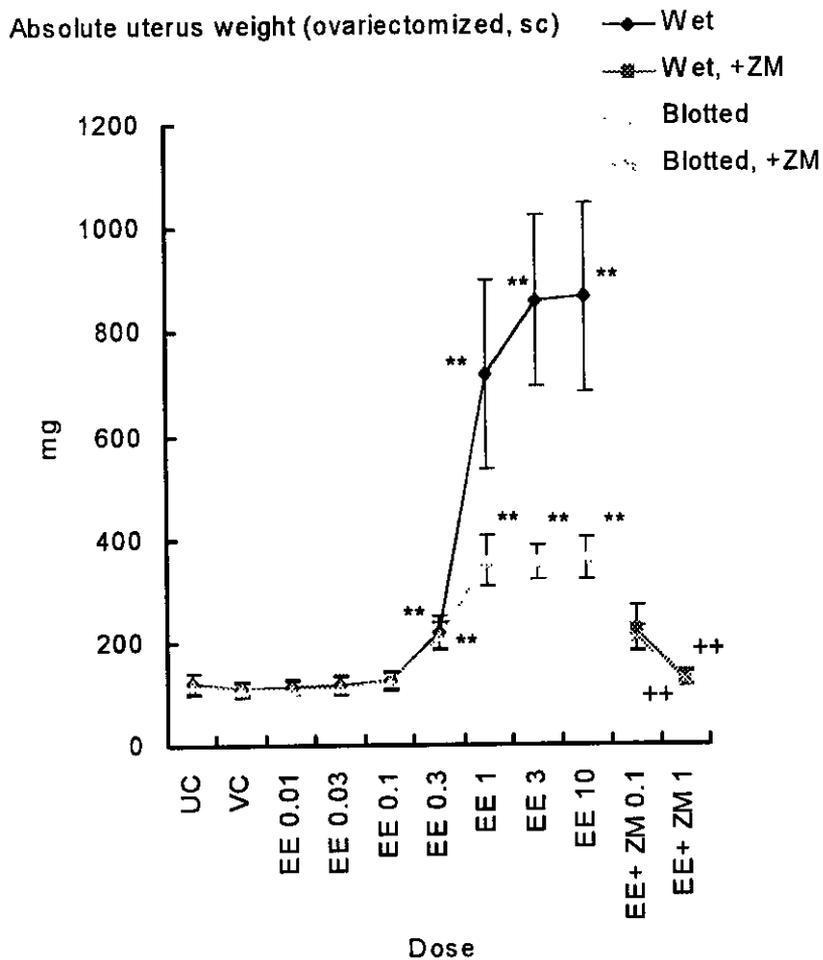


Figure 6 Absolute uterus weight of ovariectomized rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

** , Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++ , Significantly different from EE 0.3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

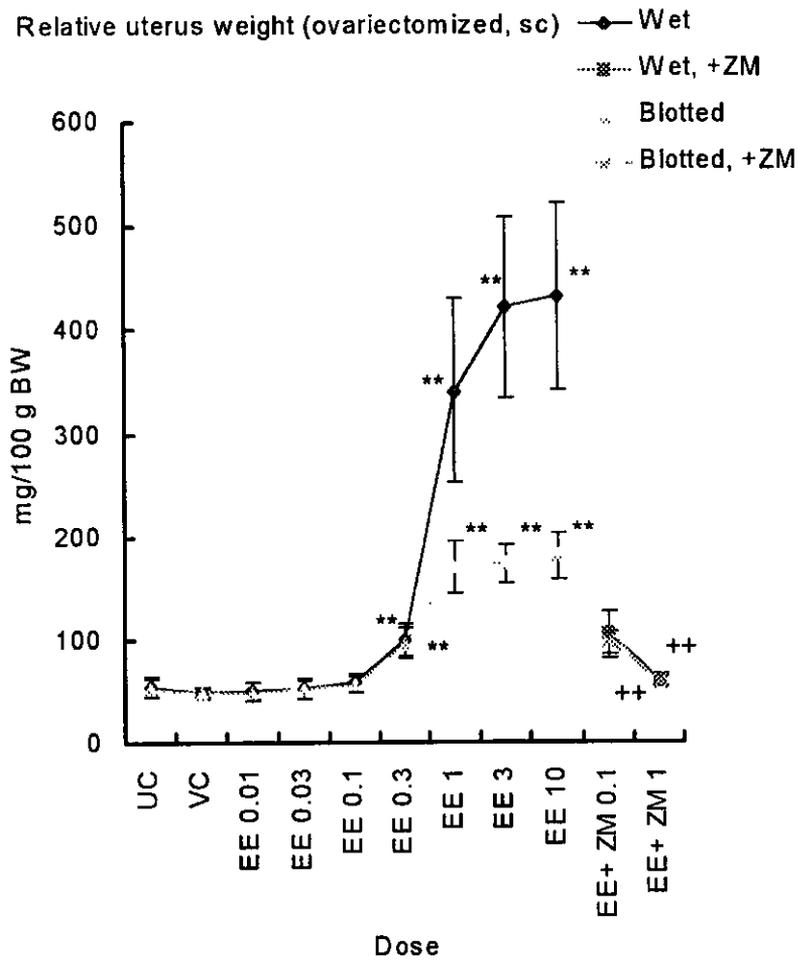


Figure 7 Relative uterus weight of ovariectomized rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, respectively
 UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

** , Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++ , Significantly different from EE 0.3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

平成 10 年度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

分担課題:子宮重量を指標とした生体試験

分担研究者 藤井 治 三菱化学安全科学研究所鹿島研究所・取締役所長

研究要旨

17-ethinyl oestradiol (EE) および ZM 189.154 (ZM) を卵巣摘出した成熟雌性 SD 系ラットに皮下投与し、EE の子宮重量に対する用量反応性ならびに ZM の抗エストロゲン活性を確認した。卵巣摘出は 6 週齢で実施し、8 日後 (7 週齢) に投与を開始した。投与回数は 1 日 1 回、3 日間とし、最終投与後約 24 時間に解剖を行った。与量は、EE 用量反応性の検討では、0.01、0.03、0.10、0.30、1.00、3.00、10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 7 用量とし、対照群として、未処置対照群と溶媒対照群 (9.95% エタノール含有ゴマ油) を設定した。ZM の抗エストロゲン活性の確認では、EE 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群を対照群とし、ZM 0.1 および 1.0 mg/kg を EE と同時に投与した。1 群 6 匹の動物を用いた。一般状態、体重および子宮重量 (内液を含む場合、含まない場合) について観察・測定した。溶媒対照群、EE 0.10 および 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ については子宮および膣の病理組織学的検査を実施した。

A. 研究目的

- (1) 17-ethinyl oestradiol を卵巣摘出成熟ラットに皮下投与し、子宮重量の用量反応性を確認する。
- (2) 施設間差を検討するためのデータとする。
- (3) PROTOCOL A (幼若ラット、経口投与)、PROTOCOL B (幼若ラット、皮下投与) および PROTOCOL C (卵巣摘出成熟ラット、7 日間皮下投与) で得られる結果と比較するためのデータとする。
- (4) ZM 189.154 の抗エストロゲン活性を確認する。

号:29052944、純度:97.0%以上)、reference

anti-oestrogen として ZM189.154 (ZM、CAS No.:101908-22-9、Zeneca、ロット番号:174321、純度:推定 98%以上) を使用した。

2. 試験動物

動物 (4.5 週齢の Crj:CD (SD) IGS ラット雌 83 匹) 入荷後、12 日間検疫・馴化し、健康状態が良好であることを確認し、6 週齢で、チオペンタール麻酔下で両側の卵巣を摘出した (卵巣摘出手術において 1 匹が死亡)。卵巣摘出手術後 7 日に膣垢検査ならびに群分けを実施した。術後の回復が良好であり、発情休止期にあることを確認した動物のうち 66 匹を体重別層化無作為抽出法によって各群の体重がほぼ均一になるように群分けした。体重範囲は 188.5~217.8 g であった。なお、危険率 5% で群間に有意差のないことを確認した。投与開始時

B. 研究方法

1. 試験物質

reference oestrogen として 17-ethinyl oestradiol (EE、CAS No.:57-63-6、Schering AG、ロット番