

(群分けの翌日)の週齢は7週齢、体重範囲は197.0~232.5 gであった。動物は油性インクで尾に番号付けをして個体識別し、ケージには試験番号、ケージ番号、試験物質名、群番号、動物番号、試験種、性別、用量、投与期間、系統及び動物種を記載したラベルを付けた。

3.動物飼育

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (許容範囲 $19 \sim 25^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 $55 \pm 15\%$ (許容範囲 $35 \sim 70\%$)、換気約 15 回/時、照明 12 時間/日(7:00~19:00)に自動調節した飼育室を使用した。

4.投与

1日1回、3日間、被験物質投与液を皮下投与し

た。3日間ほぼ同時刻に、同順序で投与した。ZMの評価の場合には、ZMの投与直後にEEを投与した。投与用量は群構成の項に示す。投与液量は2 mL/kgとし、至近日に測定した体重に基づいて算出した。なお、EEとZMとを投与する場合には各1 mL/kgとした。被験物質は所定量を秤量し、99.5%エタノール(EtOH、和光純薬工業㈱、ロット番号:ACG2697)に溶解した後、99.5%EtOHおよびゴマ油(関東化学㈱、ロット番号:101G1899)を用いて希釈し、所定濃度の投与液(溶媒は9.95%EtOH含ゴマ油となるように)を調製した。EEの調製は投与開始前日に行い、投与に供するまで冷蔵・暗所に保存した。ZMは用時調製した。

5.群構成

以下のとおりである。

群名	N	用量		経路	動物番号
		EE (microgram/kg)	ZM (milligram/kg)		
1 (溶媒対照)	6	0	0	s.c.	50101-50106
2	6	0.01	0	s.c.	50201-50206
3	6	0.03	0	s.c.	50301-50306
4	6	0.10	0	s.c.	50401-50406
5	6	0.30	0	s.c.	50501-50506
6	6	1.00	0	s.c.	50601-50606
7	6	3.00	0	s.c.	50701-50706
8	6	10.00	0	s.c.	50801-50806
9	6	0.3	0.1	s.c.	50901-50906
10	6	0.3	1.0	s.c.	51001-51006
11 (未処置対照)	6	0	0	非適用	51101-51106

6. 観察・測定項目

下記の項目を検査した。なお、日の表記は投与開始日を第1日とした。

6.1 一般状態

投与期間は1日2回(午前、午後)、それ以外の日には1日1回午前中に観察した。

6.2 体重

全例の体重を、上皿電子天秤 (PM3000、メラー・トレド(株)) を用いて、群分け日から解剖日まで毎日 0.1 g 単位で測定した。

6.3 病理学的検査

1) 器官重量

最終投与日の約 24 時間後に、全例をチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、上皿電子天秤 (AE260、メラー・トレド(株)) を用いて、子宮重量を 0.1mg 単位で測定した(まず、子宮の外側の水分をガーゼで軽くぬぐい重量測定した。次に、子宮角の上端にハサミを入れ、内腔液をガーゼ上で抜き取ってから重量測定した)。また、解剖日の体重に基づいて相対重量(対体重比)を算出した。

2) 病理組織学的検査

全動物の子宮および膣を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。なお、EE 0.10 μ g/kg 群の 1 例(動物番号: 50402)で、同群の他の動物と比べて子宮重量が著しく高かったことから、この原因を明らかにするために、子宮および膣について病理組織

学的検査を実施した。すなわち、溶媒対照群、EE 0.10 μ g/kg 群、EE 0.30 μ g/kg 群の全例の子宮および膣について脱水、パラフィン包埋を行った後、パラフィン包埋ブロックを 5 μ m の厚さに薄切し、スライド貼付切片を作製した。常法に従いヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、鏡検した。

7. 統計学的解析

1~11 群間の比較の場合には、F 検定で等分散の検定を行い、分散が等しい場合には t 検定、分散が等しくない場合には Welch の検定を行った。1~8 群間ならびに 5、9、10 群間の比較の場合には、多重比較検定法で統計学的有意性を解析した。すなわち Bartlett 法による等分散の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析、分散が等しくない場合は Kruskal-Wallis の検定を行った。群間に有意な差が認められた場合は Dunnett 法または Dunnett 型の多重比較検定を行った。

なお、EE 0.30 μ g/kg 群の子宮重量は溶媒対照群に比して約2倍であり、値の偏差も小さいにも関わらず、1~8 群間で比較した場合には統計学的有意性が得られなかった。そこで、1~5 群間での検定を追加実施した。

C. 研究結果

1. 一般状態

検疫・馴化および投与期間を通じて、いずれの動物にも異常は認められなかった。

2. 体重 (Table 1)

EE 投与群では、EE 3.00 μ g/kg および 10.00 μ g/kg 群で解剖日の体重に低値が認められた。ZM 投与群は、対照群 (EE 0.30 μ g/kg 群) と同様に推移した。溶媒対照群と未処置対照群の間に有意な差は認められなかった。

3. 子宮重量 (Table 2、3)

3.1 内液を含まない場合

未処置対照群と溶媒対照群の間に有意な差は認められなかった。

EE の用量反応性の検討では、EE 1.00 μ g/kg 以上の群で (1~8 群間で検定した場合)、子宮絶対重量および相対重量の高値が認められた。なお、EE 0.30 μ g/kg 群の子宮重量は溶媒対照群に比して約 2 倍であり、1~5 群間で検定した場合には、絶対重量および相対重量の高値が認められた。

ZM の用量反応性の検討では、EE 0.30 μ g/kg 群に対し、EE 0.30 μ g/kg + ZM 0.1 mg/kg 群および EE 0.30 μ g/kg + ZM 1.0 mg/kg 群で絶対重量および相対重量の低値が認められた。

3.2 内液を含む場合

EE 1.00 μ g/kg 以上の群で、内液を含む場合の子宮重量は、内液不含の場合に比して 2 倍以上と、著しい内液の貯留が認められた。値の偏差も大であったが、統計学的有意性は内液不含の場合と同様の結果であった。

4. 病理組織学的検査 (Table 4、Appendix 1)

子宮では内膜過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 1 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られ、このう

ち 3 例は白血球の浸潤を伴っていた。

膣では粘膜上皮の過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 5 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られたが、0.30 μ g/kg 群ではその程度が強く、全例の上皮表面に角質化が認められた。このほか溶媒対照群を含む各群で粘膜における白血球浸潤と粘膜上皮の粘液細胞化が認められたが、発現状況と用量の関連は明瞭でなかった。

子宮重量が高値を示した EE 0.10 μ g/kg 群の 1 例 (動物番号: 50402) では子宮内膜過形成および膣粘膜上皮の過形成が認められ、膣上皮の角質化が認められなかったことを除いて 0.30 μ g/kg 群と同様な組織所見であった。したがって、本例では 0.30 μ g/kg 群に匹敵する反応性を示すことが病理組織学検査でも確認できたが、その原因を明らかにすることはできなかった。

D. 考 察

EE の用量反応性の検討では、0.30 μ g/kg 以上の群で子宮重量の高値が認められた。PROTOCOL A (幼若ラット、経口投与) においては 1.00 μ g/kg 以上の群で、PROTOCOL B (卵巢摘出成熟ラット、皮下投与) においては 0.30 μ g/kg 以上の群で、PROTOCOL C' (卵巢摘出成熟ラット、7日間皮下投与) においては 0.10 μ g/kg 以上の群で子宮重量の高値が認められている。なお、内液の貯留に関して PROTOCOL C' との大きな相違が認められた。すなわち、3日間投与で EE 1.00 μ g/kg 以上の群の全例で著しい内液の貯留が認められたのに対し、7日間

投与では EE 10.00 μ g/kg 群の数例で内液の貯留が認められたにすぎなかった。

なお、EE 0.10 μ g/kg 群において膣の粘膜上皮の過形成が 6 例中 5 例認められたことから、膣の病理組織所見が検出力の高いパラメータであり、重要な知見を与えるものと考えられた。ZM の抗エストロゲン活性の検討において対照とした EE 0.30 μ g/kg 群の子宮重量は溶媒対照群に対して約 2 倍であり、抗エストロゲン活性を評価するのに適当な用量であると考えられる。ZM 0.1 mg/kg 群で子宮重量の低値が認められたが、これは対照とした EE 0.30 μ g/kg 群の偏差が小さいことが寄与していると考えられる。さらに、ZM の用量が 1.0 mg/kg の場合には子宮重量は溶媒対照群のレベルにまで低下した。ZM 1.0 mg/kg 群における子宮重量は、PROTOCOL A では溶媒対照群のレベルにまで低下していないが、PROTOCOL B および C' においては溶媒対照群のレベルになっている。また、卵巣摘出動物を用いる場合には、動物選択の上で何らかの基準を設けるべきであると考えられる。

E. 結論

一般状態は、検疫・馴化および投与期間を通じて、いずれの動物にも異常は認められなかった。

体重は、EE 投与群では、EE 3.00 および 10.00 μ g/kg 群で解剖日に低値が認められた。ZM 投与群は、対照群(EE 0.30 μ g/kg 群)と同様に推

移した。溶媒対照群と未処置対照群の間に有意な差は認められなかった。

EE の子宮重量に対する用量反応性が認められ、EE 0.30 μ g/kg 以上の群で、内液を含む場合、含まない場合のいずれにおいても子宮絶対重量および相対重量の高値が認められた。また、病理組織学的検査の結果、子宮では内膜過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 1 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られた。膣では粘膜上皮の過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 5 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られ、0.30 μ g/kg 群では全例の上皮表面に角質化が認められた。

ZM の抗エストロゲン活性の確認では、ZM 0.1 mg/kg 以上の群において、内液を含む場合、含まない場合のいずれにおいても子宮絶対重量および相対重量の低値が認められた。

F. 研究発表

なし

Table 1		Body Weight - Summary					Unit . g
		Mature Ovariectomised Rats with s.c		3Days			
Group	Day	-1	1	2	3	4	
1 EE 0 µg/kg [control(A)]	Mean	202.9	216.0	221.5	227.5	235.2	
	S.D.	9.9	11.7	12.0	12.2	12.8	
	n	6	6	6	6	6	
2 EE 0.01 µg/kg	Mean	202.1	212.0	218.0	223.7	230.8	
	S.D.	8.8	10.8	10.9	8.5	9.3	
	n	6	6	6	6	6	
3 EE 0.03 µg/kg	Mean	203.5	215.3	220.7	226.8	232.2	
	S.D.	8.8	10.4	8.6	8.8	8.3	
	n	6	6	6	6	6	
4 EE 0.10 µg/kg	Mean	203.9	216.8	221.5	224.2	228.1	
	S.D.	8.7	10.3	11.0	11.3	11.0	
	n	6	6	6	6	6	
5 EE 0.30 µg/kg [control(B)]	Mean	203.9	216.0	221.6	224.3	228.9	
	S.D.	9.1	9.4	10.6	10.3	12.8	
	n	6	6	6	6	6	
6 EE 1.00 µg/kg	Mean	203.0	213.8	219.9	218.0	218.9	
	S.D.	10.2	10.0	11.2	13.1	12.2	
	n	6	6	6	6	6	
7 EE 3.00 µg/kg	Mean	202.3	212.0	216.5	211.8	211.7 **	
	S.D.	8.7	8.2	10.2	11.4	10.9	
	n	6	6	6	6	6	
8 EE 10.00 µg/kg	Mean	203.1	214.6	216.9	214.4	212.4 **	
	S.D.	10.2	11.1	11.0	10.0	10.7	
	n	6	6	6	6	6	
9 EE 0.30 µg/kg + ZM 0.1 mg/kg	Mean	202.5	213.9	219.7	222.6	225.5	
	S.D.	9.6	11.0	10.4	10.1	8.8	
	n	6	6	6	6	6	
10 EE 0.30 µg/kg + ZM 1.0 mg/kg	Mean	202.9	212.0	216.9	218.8	221.0	
	S.D.	7.8	7.5	8.8	9.9	11.0	
	n	6	6	6	6	6	
11 Non-Treat.	Mean	203.0	213.7	220.7	225.6	231.7	
	S.D.	9.8	9.3	10.2	10.3	11.4	
	n	6	6	6	6	6	

Significantly different from control (A) : *,P<0.05; **,P<0.01. (comparison among group 1-8)

Significantly different from control (B) : #,P<0.05; ##,P<0.01. (comparison among group 5,9,10)

Table 2

Uterine Weight - Summary

Unit : mg

Group	Mature Ovariectomised Rats with s.c.		3Days	
			Wet Weight	Blotted Weight
1 EE 0 µg/kg [control(A)]	Mean		121.6	115.9
	S.D.		6.5	5.3
	n		6	6
2 EE 0.01 µg/kg	Mean		110.5	106.4
	S.D.		15.5	14.5
	n		6	6
3 EE 0.03 µg/kg	Mean		124.5	118.6
	S.D.		3.8	3.6
	n		6	6
4 EE 0.10 µg/kg	Mean		151.1	144.4
	S.D.		55.7	54.1
	n		6	6
5 EE 0.30 µg/kg [control(B)]	Mean		231.3 (*)	214.0 (*)
	S.D.		21.6	13.0
	n		6	6
6 EE 1.00 µg/kg	Mean		656.5 *	326.1 **
	S.D.		177.4	60.2
	n		6	6
7 EE 3.00 µg/kg	Mean		1001.5 **	378.4 **
	S.D.		146.8	20.8
	n		6	6
8 EE 10.00 µg/kg	Mean		899.7 **	354.4 **
	S.D.		322.2	54.8
	n		6	6
9 EE 0.30 µg/kg + ZM 0.1 mg/kg	Mean		170.3 ##	163.3 ##
	S.D.		16.8	14.8
	n		6	6
10 EE 0.30 µg/kg + ZM 1.0 mg/kg	Mean		111.2 ##	106.4 ##
	S.D.		16.0	14.6
	n		6	6
11 Non-Treat.	Mean		122.3	117.7
	S.D.		5.5	5.5
	n		6	6

Significantly different from control (A) : *, P<0.05; **, P<0.01. (comparison among group 1-8)

: (*), P<0.05; (**), P<0.01. (comparison among group 1-5)

Significantly different from control (B) : #, P<0.05; ##, P<0.01. (comparison among group 5,9,10)

Table 3

Relative Uterine Weight - Summary

Unit : $\times 10^{-3}\%$

Group	Mature Ovariectomised Rats with s.c.		3Days
		Wet Weight	Blotted Weight
1 EE 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [control(A)]	Mean	51.8	49.4
	S.D.	3.4	3.3
	n	6	6
2 EE 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Mean	47.8	46.1
	S.D.	5.9	5.6
	n	6	6
3 EE 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Mean	53.7	51.1
	S.D.	2.2	2.1
	n	6	6
4 EE 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Mean	66.8	63.8
	S.D.	26.2	25.5
	n	6	6
5 EE 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [control(B)]	Mean	101.5 (*)	93.8 (*)
	S.D.	13.3	9.1
	n	6	6
6 EE 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Mean	298.0 *	148.2 *
	S.D.	71.9	20.9
	n	6	6
7 EE 3.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Mean	475.4 **	179.2 **
	S.D.	80.1	13.6
	n	6	6
8 EE 10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Mean	422.4 **	166.8 **
	S.D.	146.9	24.5
	n	6	6
9 EE 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 0.1 mg/kg	Mean	75.7 ##	72.5 ##
	S.D.	8.3	7.4
	n	6	6
10 EE 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1.0 mg/kg	Mean	50.3 ##	48.1 ##
	S.D.	6.6	6.1
	n	6	6
11 Non-Treat.	Mean	53.0	51.0
	S.D.	4.2	4.3
	n	6	6

Significantly different from control (A) : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. (comparison among group 1-8): (*), $P < 0.05$; (**), $P < 0.01$. (comparison among group 1-5)Significantly different from control (B) : #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$. (comparison among group 5,9,10)

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による相加相乗効果の検討

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究要旨

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た。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。

A. 研究目的

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た。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することを目的とする。

B. 研究方法

子宮肥大試験は、卵巢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、および一世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、後者の一世代試験は単体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ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) を介すると思われるものの組み合わせ、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の組み合わせ (子宮肥大試験および一世代試験)、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-tetrachlorodibenzodioxin, testosterone, vinclozolin, p,p'-ジクロロジフェニルジクロロエチレン (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

上記の理由により、現在、一部の子宮肥大試験、およびハーシュバー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

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暁には、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

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のは遺憾であるが、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

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 内分泌かく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
ファルマシア 35 H11年3月

2. 学会発表

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

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

井上 達、菅野 純 内分泌かく乱物質とは何か。内分泌かく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

菅野 純 内分泌かく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

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 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 内分泌かく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、高木敦也、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