

厚生科学研究補助金（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樞神経および生殖細胞に及ぼす影響

分担研究者 渡辺敏明 山形大学医学部衛生学教室助教授

研究要旨

培養胚の神経細胞および生殖細胞を利用して、内分泌かく乱化学物質の新しい試験法を確立する。本年度、estradiol benzoate および diethylstilbestrol によって、ラット培養胚に形態異常が誘発された。また培養胚の心臓、卵黄嚢膜、神経細胞においてエストロゲンレセプター（ER）が発現していることが確認された。培養胚の発育や形態による内分泌かく乱化学物質の検出は難しく、神経細胞における ER やアポトーシスなどを指標とした試験法について、さらに検討する。

A. 研究目的

本研究においては、哺乳動物全胚培養法を利用して、内分泌かく乱化学物質の新しい試験法を確立する。本年度は、エストロゲン作用をもつ estradiol benzoate (EB) および diethylstilbestrol (DES) の形態形成への影響を調べた。また培養胚におけるエストロゲンレセプター (ER) の発現の有無と局在について検討した。なお、エストロゲン作用は明らかではないが、内分泌-生殖系への影響が報告 (Fuji et al. 1996 など) されている生活環境化学物質であるグルホシネート (GLA) についても検討した。

B. 研究方法

ラットの胎齢 12 日 (ED12) および ED13 胚を用いて、ウエスタンブロット法で ER の発現の有無を検討した。また、培養胚のパラフィン埋包切片を用いて、免疫組織化学染色で ER の局在を調べた。一次抗体として、抗 ER- α 抗体 (rabbit polyclonal IgG: MC-20, Santa Cruz Biotechnology) と抗 ER- β 抗体 (goat polyclonal IgG: Y-19) を用いた。

全胚培養によって、ED9.5 あるいは ED11.5 胚に対する EB (0.01-100 μ g/mL)、DES (0.05-100 μ g/mL) あるいは GLA (0-25 μ g/mL) の影響を、形態学および病理組

織学的に観察をした。

なお、これらの研究は動物の福祉に配慮し、すべての動物実験は山形大学医学部および (財) 食品薬品安全センター秦野研究所の「動物実験指針」に従って、実施した。

C. 研究結果

ウエスタンブロット解析により、ラット胚の ED12 および ED13 において、ER- β の発現がタンパク質レベルで検出された (Fig. 1)。また、免疫組織化学染色により、ER- α および ER- β が、培養胚の心臓 (内皮細胞)、卵黄嚢膜および卵黄嚢動脈 (核や細胞質) において、強く発現していることが確認された (Figs. 2-4)。胚頭部の神経上皮細胞層においても、ER と疑われる陽性細胞がみられた (Fig. 5)。

EB および DES をラット ED9.5 培養胚に暴露すると、EB 暴露胚では発育の抑制はみられなかったが、心臓の腫大、臍帯および肢芽の浮腫などの形態異常が高率に観察された (Table 1) (Figs. 6, 7)。DES 暴露胚では、頭部の出血性変化や腹部の浮腫が特徴的に観察された (Fig. 8)。

GLA 暴露 ED9.5 胚においては、頭部の水疱や前脳の低形成などの顔面頭部の異常が観察された (Table 2) (Fig. 9)。ED11.5 胚に

においても、GLA 暴露によって、前脳や頭部の水疱、前脳の低形成が特異的にみられた (Table 3) (Fig. 10)。これらの胚頭部の神経上皮細胞には多数のアポトーシスが確認された (Fig. 11)。

D. 考察

ラット ED9.5 および ED11.5 胚において、EB および DES 暴露によって浮腫や出血性変化などの形態異常が誘発された。しかし、これらの異常は、胚が死亡する高濃度のみで見られ、EB や DES の毒性によるものと考えられる。このように、培養胚の発育や形態を指標した試験法は感度が低く、内分泌かく乱物質の検出は可能ではない。一方、これらの培養胚においては、ER- α および ER- β が心臓、卵黄嚢膜、卵黄嚢動脈に強く発現していた。また神経細胞においても ER 陽性と疑われる細胞が認められた。これらは、EB および DES 暴露によって形態異常がみられた部位である。

内分泌かく乱化学物質の神経系の発生に対する影響は、これまでほとんど注目されておらず、適切なエンドポイントやバイオマーカーは確立していない。本研究においては、ラット培養胚において、頭部の神経上皮細胞に ER の陽性細胞やアポトーシスの誘発がみられている。そこで、培養胚の神経細胞における ER、アポトーシスやその他のマーカーを指標した内分泌攪乱物質の試験法について、さらに検討していく予定である。

E. 結論

ラット全胚培養法を用いて、EB および DES の胚発育および形態形成に及ぼす影響を検討した。培養胚の発育や形態を指標とした内分泌かく乱物質の検出は困難であり、神経細胞における ER やアポトーシスなどを指標とした試験法について今後検討する。

本研究は、(財) 食品薬品安全センター 桑野研究所の桑形麻樹子氏との共同で行ったものである。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Kuwagata M, Watanabe C, Takashima H, Aoyama H, Watanabe T, Ono H. Evaluation of embryotoxicity of estradiol benzoate and diethylstilbestrol using whole embryo culture. *Altern Ani Test Exp* 1999;6. (in press)
2. Kato T, Watanabe T, Sakurada K, Wakabayashi I, Maeda K, Hachiya M, Akashi M. Mutagenic effects of heavy-ion beams on spermatogenesis in mice. *Teratology* 1999. (in press)
3. Watanabe T, Kato T, Sakurada K, Wakabayashi I, Kato M, Hachiya M, Akashi M. Effects of heavy-ion beams on sperm morphology and motility in mice. *Teratology* 1999. (in press)

厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Table 1. Effects of estradiol benzoate and diethylstilbestrol on embryonic development of rats in culture

Compounds doses ($\mu\text{g/mL}$)	Number of embryos cultured	Number of dead embryos	Number of live embryos	Viability index (%)	Crown-rump length (mm)	Head length (mm)	Number of embryos with morphological defects (%)
DMSO(Control)	20	3	17	85.0	8.0 \pm 2.5 ^a	4.3 \pm 2.4	0(0)
Estradiol benzoate							
100	9	8	1	11.1**	8.0	4.2	1(100)
80	10	10	0	0.0**	-	-	-
50	10	6	4	40.0*	7.6 \pm 0.4	4.3 \pm 0.2	3(75.0)**
1	9	4	5	55.6	7.5 \pm 0.4	4.2 \pm 0.2	3(60.0)**
0.01	8	0	8	100.0	7.6 \pm 1.0	4.2 \pm 0.7	0(0)
Diethylstilbestrol							
100	2	2	0	0.0*	-	-	-
50	10	5	5	50.0	6.7 \pm 0.3 [#]	3.7 \pm 0.2	5(100)**
5	5	1	4	80.0	8.2 \pm 1.3	4.5 \pm 2.4	0(0)
0.5	5	0	5	100.0	7.9 \pm 2.5	4.4 \pm 1.9	0(0)
0.05	3	0	3	100.0	7.6 \pm 1.4	4.4 \pm 2.1	0(0)

^amean \pm SD

*p<0.05, **p<0.01, compared with the control.

[#]p<0.1, compared with the control.

Table 2. Effects of glufosinate on embryonic development of rats from ED 9.5 to 11.5 in culture

	Glufosinate ($\mu\text{g/ml}$)					
	0(Control)	1.25	5	10	15	20
Number of embryos cultured	32	24	20	20	24	24
Yolk sac diameter (mm)	4.46 \pm 0.24 ^a	4.46 \pm 0.29	4.65 \pm 0.33	4.60 \pm 0.28	4.51 \pm 0.27	4.48 \pm 0.29
Placenta diameter (mm)	1.09 \pm 0.19	0.97 \pm 0.13	1.11 \pm 0.17	1.10 \pm 0.10	1.08 \pm 0.10	1.09 \pm 0.11
Crown-rump length (mm)	3.89 \pm 0.29	3.74 \pm 0.21	3.76 \pm 0.32	3.50 \pm 0.24**	2.69 \pm 0.34**	2.52 \pm 0.32**
Head length (mm)	1.98 \pm 0.19	1.91 \pm 0.15	1.91 \pm 0.22	1.68 \pm 0.16**	1.30 \pm 0.16**	1.12 \pm 0.17**
Number of somites paired	28.2 \pm 1.20	28.1 \pm 1.30	27.6 \pm 1.73	26.8 \pm 2.31*	24.7 \pm 2.27**	21.5 \pm 3.82**
Morphological score	39.2 \pm 0.90	38.9 \pm 0.88	39.2 \pm 0.70	39.1 \pm 0.99**	27.6 \pm 4.92**	22.7 \pm 3.42**
Number of embryos with						
morphological defects	0	1(4.2)	0	20(100)	24(100)	24(100)
non-turning in body axis	0	0	0	0	1(4.2)	8(33.3)**
prosencephalon hypoplasia	0	0	0	20(100)**	13(54.2)**	4(16.7)*
prosencephalon blister	0	0	0	0	3(12.5)	5(20.8)*
craniofacial cleft	0	0	0	0	10(41.7)**	20(83.3)**
craniofacial asymmetry	0	0	0	0	9(37.5)**	1(4.2)
lateral head blister	0	0	0	4(20.0)*	16(66.7)**	16(66.7)**
anterior neuropore open	0	0	0	0	1(4.2)	1(4.2)
caudal neuropore open	0	0	0	0	0	1(4.2)
heart tube dysmorphogenesis	0	0	0	0	0	2(8.3)
inverted hear tube	0	1(4.2)	0	0	2(8.3)	1(4.2)

^amean \pm SD. (): %.

*p<0.05, **p<0.01, significant difference from the control.

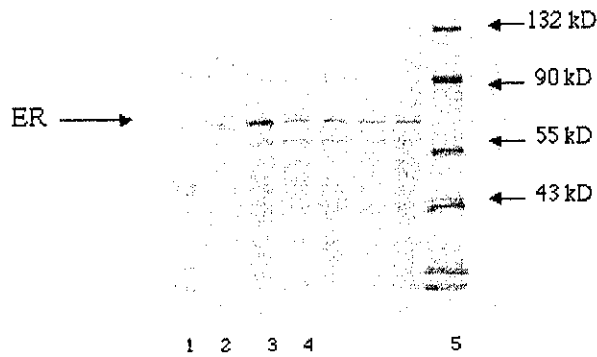
厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Table 3. Effects of glufosinate on embryonic development of rats from GD 11.5 to 13.5 in culture

	Glufosinate($\mu\text{g/ml}$)			
	0(Control)	1.25	5	20
Number of embryos cultured	18	18	18	18
Number of dead embryos	0	0	0	2(11.1)
Number of live embryos analyzed	18	18	18	16
Placenta diameter (mm)	2.8 \pm 0.30 ^a	2.9 \pm 0.36	2.8 \pm 0.27	2.6 \pm 0.27
Head length (mm)	4.1 \pm 0.21	4.1 \pm 0.14	4.0 \pm 0.19	3.8 \pm 0.18*
Crown-rump length (mm)	7.9 \pm 0.47	7.7 \pm 0.39	7.3 \pm 0.33*	7.2 \pm 0.40*
Number of somites paired	47.8 \pm 0.94	47.8 \pm 0.86	47.4 \pm 1.04	47.3 \pm 1.08
Number of embryos with				
morphological defects	0	0	18(100)*	16(100)*
yolk sac diffused white patch	0	0	9(50.0)*	16(100)*
primary palate blister	0	0	7(38.9)*	16(100)*
nasal processes hypoplasia	0	0	18(100)*	16(100)*
prosencephalon hypoplasia	0	0	18(100)*	16(100)*
prosencephalon blister	0	0	2(11.1)	8(50.0)*
lateral head blister	0	0	0	12(75.0)*
eye deformation	0	0	4(22.2)	16(100)*
forelimb bud hypoplasia	0	0	14(77.8)*	16(100)*
hindlimb bud hypoplasia	0	0	18(100)*	16(100)*

^amean \pm SD. ():%.

*p<0.01, significant difference from the control.



- 1; molecular marker
- 2; ラット子宮（陽性対照）
- 3; 胎齢12日胚
- 4; 胎齢13日胚
- 5; molecular marker

Fig. 1 ウェスタンブロット法によるERの検出

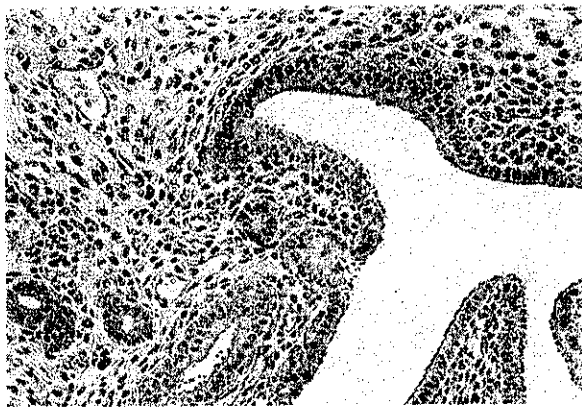


Fig. 2 ER- α の検出（IHC法、成獣子宮）

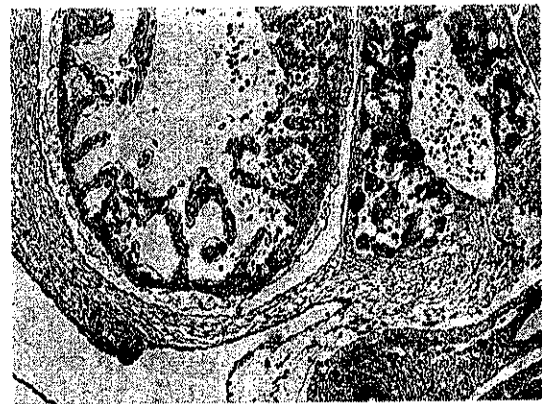


Fig. 3 培養胚の心臓（ER- α ）

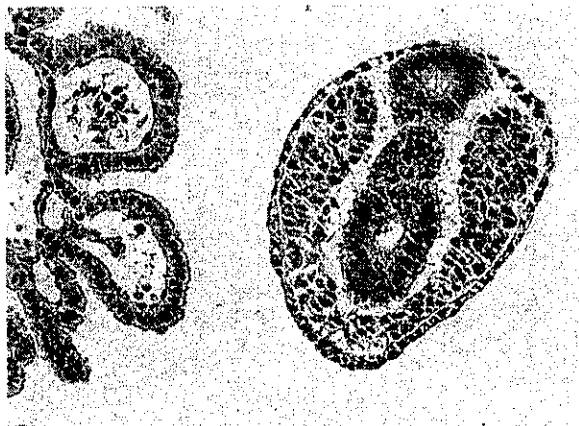


Fig. 4 培養胚の卵黄嚢膜・卵黄嚢動脈（ER- β ）

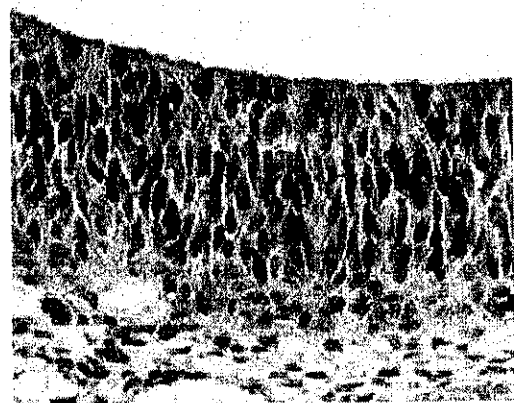


Fig. 5 培養胚の神経細胞（ER- α ）



Fig. 6 对照胚



Fig. 7 EB 暴露培養胚

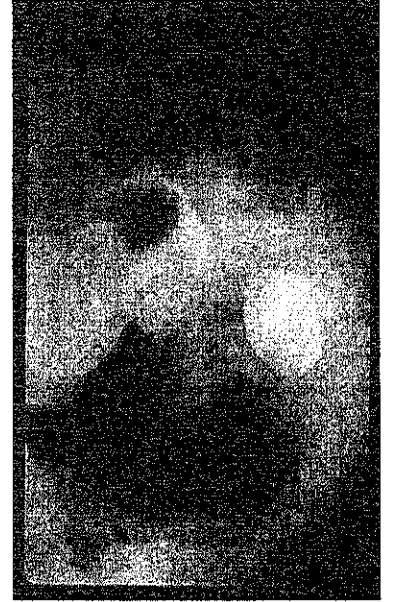


Fig. 8 DES 暴露培養胚



Fig. 9 GLA 暴露培養胚 (ED9.5)



Fig. 10 GLA 暴露培養胚 (ED11.5)

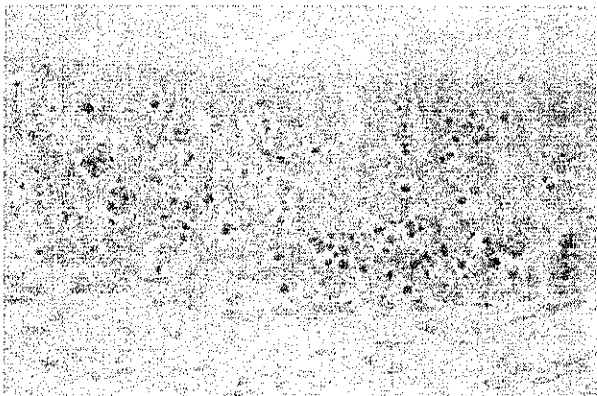


Fig. 11 GLA 暴露培養胚の神経細胞における
アポトーシス (Tunel 染色)

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等、生活環境中化学物質による人の影響についての
試験法に関する調査研究（H11-生活-018）
分担研究 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
生物試験部第二室長

研究要旨

ラットの妊娠0-8日に250, 500, 750, 1000, 1250 または1500 mg/kg の dibutyl phthalate (DBP) を経口投与して胎児に対する影響を調べた。1250 及び 15000 mg/kg で着床前胚死亡率が有意に上昇し、750 mg/kg 以上で着床後胚死亡率が有意に上昇した。同用量の DBP を偽妊娠0-8日のラットに経口投与して偽妊娠9日の子宮重量を脱落膜反応の指標とした。子宮の脱落膜腫形成は750 mg/kg 以上で有意に抑制された。これらの結果から、DBP による早期胚致死作用は子宮機能の低下に起因することが示唆された。

A. 研究目的

可塑剤として使われているフタル酸エステル類 (PAEs) は地球規模の環境汚染物質である。PAEs の一つである dibutyl phthalate (DBP) は安全ガラス、印刷用インク、紙のコーティング剤、接着剤等に使用されており、また、各種化粧品にも使われている。

DBP はラット及びマウスにおいて発生毒性を示すことが知られている。我々は先に、ラット胎児の器官形成期に DBP を投与したとき、胚致死作用と催奇形作用を示すことを明らかにした。更に、ラットの妊娠7-9日または妊娠13-15日に DBP を投与したときに催奇形作用を示し、妊娠前半に DBP を投与したとき強い胚致死作用を示すことを報告した。

最近、DBP や butyl benzyl phthalate (BBP) などの PAEs が組み替え酵母やヒト乳癌細胞を用いた in

vitro の実験においてエストロゲン作用を示すことが報告され、DBP 及び BBP 等の PAEs は内分泌攪乱化学物質として注目されている。このようなことから、PAEs の生殖発生毒性を研究することの重要性は益々高まっている。

昨年度においては、ラットの妊娠前半に DBP を与えたとき著しい胚致死作用を示すことを報告した。

本年度においては、DBP をラットの妊娠初期に与えたときの影響について再検討し、更に、胚の生存にとって重要な役割を果たす子宮機能に対する DBP の影響について偽妊娠ラット子宮における脱落膜反応を指標として調べた。

B. 研究方法

Wistar ラットを使用した。ラットは、室温 24 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12:12

時間 明/暗の動物室にて、水道水と飼料を自由に与えて飼育した。膣垢検査により少なくとも2回連続4日の性周期を示したメスラットを使用した。

メスラットを同系統のオスラットと同居させ、翌朝膣垢内に精子を認めたメスを妊娠とし、この日を妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。ラットは妊娠20日に開腹し、着床数、生存及び死亡胎児数、吸収胚数を記録した。子宮は2%水酸化ナトリウム溶液に浸けて着床の有無を確認した。

メスラットを同系統の精管結紮したオスラットと同居させ、翌朝膣栓を認めたメスを偽妊娠とし、この日を偽妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。偽妊娠4日の11:00から13:00の間に、エーテル麻酔下で開腹して両子宮角の創傷または疑似手術を行った。先の曲がった細針金を子宮角分岐部に挿入し卵管接合部まで子宮内膜を創傷することによって脱落膜反応を惹起した。ラットは偽妊娠9日に開腹し、子宮及び卵巣重量を測定した。偽妊娠9日の子宮重量を子宮の脱落膜反応の指標とした。また、このときの血清中のプロゲステロン及びエストラジオール濃度を測定した。

妊娠及び偽妊娠ラットの0日から8日まで250, 500, 750, 1000, 1250または1500 mg/kgのDBPを経口投与した。DBPはオリーブ油に溶解し、投与日の体重に基づいて5 ml/kg与えた。対照群のラットにはオリーブ油だけを経口投与した。

胎児に関する成績は一腹を単位として統計処理を行った。

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

妊娠ラットの所見をTable 1に示した。いずれの群にも死亡ラットはみられな

かった。高投与量群では被毛の汚れや立毛等の毒性徴候を示すラットが観察された。妊娠0-9日の母体体重増加及び摂餌量が500 mg/kg以上の投与群において有意に低下した。また、1500 mg/kg投与群においては妊娠9-20日の母体体重増加も有意に低下した。子宮を除いた補正母体体重増加にはDBP投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

生殖に関する所見をTable 2に示した。対照群、200, 500, 750及び1000 mg/kg投与群における交配成立メスラットは全て妊娠していた。1250 mg/kg投与群の13匹中5匹、1500 mg/kg投与群の13匹中7匹のメスラットが不妊であり、これらの投与群における妊娠率は対照群に比べて有意に低かった。1250及び1500 mg/kg投与群において着床数が有意に減少し、着床前胚死亡率が有意に上昇した。妊娠ラットについての集計では、黄体数及び着床数にはDBP投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。1000 mg/kg以上の投与群で死亡胚数が有意に増加し、750 mg/kg以上の投与群で生存胎児数が有意に減少した。1500 mg/kg投与群で着床前胚死亡率が有意に上昇し、750 mg/kg以上の投与群で着床後胚死亡率が有意に上昇した。

偽妊娠ラットの所見をTable 3に示した。いずれの群にも死亡ラットはみられなかった。高投与量群では被毛の汚れや立毛等の毒性徴候を示すラットが観察された。偽妊娠0-9日の母体体重増加が750 mg/kg以上の投与群において有意に低下した。偽妊娠0-9日の摂餌量が500 mg/kg以上の投与群で有意に低下した。

偽妊娠9日の卵巣重量をFig. 1に示した。1250及び1500 mg/kg投与群において有意に低い卵巣重量が認められた。

Fig. 2 に偽妊娠 9 日の黄体数を示した。DBP 投与群と対照群の間に有意の差はみられなかった。

偽妊娠 9 日の子宮重量を Fig. 3 に示した。750 mg/kg 以上の投与群の子宮重量は対照群と比べて有意の低下が観察され、特に 1250 及び 1500 mg/kg 投与群における低下は著しかった。

偽妊娠 9 日の血清中プロゲステロン濃度を Fig. 4 に示した。1500 mg/kg 投与群において対照群及び偽手術群と較べて血清中プロゲステロン濃度の有意な減少がみられた。

Fig. 5 に偽妊娠 9 日の血清中エストロジオール濃度を示した。DBP 投与群の血清中エストロジオール濃度には対照群及び偽手術群と較べて有意な差はみられなかった。

D. 考察

投与期間中の母体体重増加及び摂餌量の低下などの DBP の母体に対する悪影響が、500 mg/kg 以上の投与量で観察された。低投与量では、DBP 投与終了後妊娠ラットの母体体重及び摂餌量は回復したが、高投与量では実験終了まで回復しなかった。これらは高用量では胎児を欠いていることによるものと考えられる。更に、高投与量でも補正体重の増加には有意な減少はみられなかったことは、DBP の母体ラットに対する毒性が一過性であることを示している。

今回の実験における投与期間は、着床前、着床中及び着床後の期間に相当している。胚に対する化学物質の着床前の悪影響は着床前胚死亡、すなわち着床数減少、着床後の悪影響は着床後胚死亡、すなわち吸収胚増加、を引き起こすと考えられる。我々の以前の実験において、妊娠 0-11 日に DBP を 2.0% 含む飼料を与えたラットにおいて着床後胚死亡の著しい増加が観察された。今回の実験におい

ては妊娠初期の DBP の胚に対する影響をより詳しく調べるために、比較的高投与量の DBP を投与した。1250 及び 1500 mg/kg の投与量で着床前胚死亡率の有意な上昇が、500 mg/kg 以上の投与量で着床後胚死亡率の有意な上昇が観察された。これらのことから、DBP は着床前期間より着床後期間により強い悪影響を及ぼすと考えられる。

妊娠ラットにおいて着床後胚死亡の有意な増加が 750 mg/kg 以上の投与量でみられ、偽妊娠ラットにおいて子宮重量の有意の低下、すなわち子宮の脱落膜反応の抑制、が 750 mg/kg 以上の投与量でみられた。これらの所見は DBP による早期の胚死亡は子宮の脱落膜腫形成の抑制に起因することを示唆している。

妊娠 0-11 日に DBP を 2.0% 含む飼料を与えると、卵巣重量の低下、子宮重量の低下及び血清中プロゲステロンの低下を引き起こすことを我々は先に報告した。今回の実験で観察された DBP 投与後の脱落膜反応の抑制が、妊娠子宮重量の低下の要因と考えられる。プロゲステロンは妊娠の維持及び胚・胎児の正常な発育に不可欠な役割を果たしており、十分量のプロゲステロンが子宮の脱落膜反応、すなわち子宮機能維持、に必要である。今回の実験では、750 mg/kg 以上で脱落膜反応抑制、1500 mg/kg で血清中プロゲステロン濃度の著しい減少が観察され、脱落膜反応抑制とプロゲステロン濃度低下との明確な相関性は示されなかった。これらのことから、プロゲステロン濃度の低下が子宮の脱落膜反応抑制の第一の要因ではないと考えられる。しかしながら、Gray らは、メスラットに DBP を離乳から継続的に投与すると、妊娠率、着床数、胚の生存率及びプロゲステロンの分泌が低下することを示し、DBP が卵巣機能を阻害し繁殖障害を引き起こすこと

を示唆した。このことは DBP の黄体機能に対する悪影響が胚致死を惹起する可能性を示唆している。今回の実験成績は、DBP を妊娠 1-8 日に投与したとき、着床数、妊娠子宮重量、卵巣重量、プロゲステロン濃度及び脱落膜反応に影響を与えなかったという Cummmings と Gray の実験成績とは一致しない。彼らの実験成績との相違は、ラットの系統差、投与期間の違い等の実験条件の差異によるのかもしれない。

我々は先に、DBP 及び BBP の代謝物であるモノブチルフタレート (MBuP) によって引き起こされる胚致死や胎児奇形の投与日による差が、DBP 及び BBP によるものとよく一致していることを明かにし、MBuP が DBP 及び BBP による発生毒性の活性代謝物であることを示唆した。この仮説は、ラットの妊娠 14 日に DBP を投与したとき血清及び胚組織には微量の DBP と多量の MBuP が検出されることから支持されている。我々は以前、BBP が妊娠ラット及び偽妊娠ラットの生殖機能に悪影響を及ぼすことを報告した。妊娠 0-8 日に BBP を投与したとき、750 mg/kg 以上の用量で着床前及び着床後の胚死亡率の有意の上昇がみられ、同じ投与量で子宮の脱落膜反応の有意な抑制が引き起こされた。これらの成績から、モノエステル体の MBuP が早期の胚死亡に関与していると考えられる。このような観点から更なる研究を進めている。

E. 結論

ラットの妊娠に DBP を与えて胚致死作用、偽妊娠に DBP を与えて子宮の脱落膜反応に対する影響を調べたところ、同じ投与量で胚死亡率の上昇と脱落膜腫形成の抑制が観察された。これらのことから、妊娠初期に与えた DBP による胚致死作用には子宮における脱落膜反応の

抑制、すなわち子宮機能の低下、が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (in press). *Reprod. Toxicol.*

Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-*n*-butyl phthalate during late pregnancy. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (in press). *Toxicol. Lett.*

ジクロロ酢酸の毒性評価と経口摂取による耐用 1 日摂取量の算定、長谷川隆一、広瀬明雄、紅林秀雄、江馬 眞、黒川雄二 (1999) *水環境学会誌*, 22, 821-826. Developmental effects of plasticizer butyl benzyl phthalate after a single administration in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). *J. Appl. Toxicol.*, 19, 357-365.

Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). *Toxicol. Lett.*, 108, 17-25.

Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). *Arch. Toxicol.*, 73, 175-179. Developmental toxicity of triphenyltin chloride after administration on three consecutive

days during organogenesis in rats.
Ema, M., Miyawaki, E. and
Kawashima, K. (1999). Bull. Environ.
Contam. Toxicol., 62, 363-370.

2. 学会発表

Early embryonic loss induced by
dibutyltin dichloride (DBTCI) in rats.
Ema, M., Harazono, A. and
Kawashima, K. 39th Annual Meeting,
Society of Toxicology

トリブチルスズによるラットにおける
着床害作用 原園 景、江馬 眞、川島
邦夫 第 64 回関西実験動物研究会
妊娠初期に投与した diphenyltin
dichloride による胚致死作用 江馬
眞、宮脇英美子、川島邦夫 第 26 回日
本トキシコロジー学会

可塑剤 dibutyl phthalate の妊娠及び偽
妊娠ラットにおける生殖障害 江馬
眞、宮脇英美子、川島邦夫 第 39 回日
本先天異常学会

Triphenyltin chloride のラットにおけ
る発生毒性 江馬 眞、宮脇英美子、川
島邦夫 第 39 回日本先天異常学会
有機スズ化合物のラット生殖発生毒性

江馬 眞 第 39 回日本先天異常学会
CASA-System を用いた
Nitrobenzene 関連化合物の精子試験
I. Nitrobenzene 宮脇英美子、前田秀
子、原園 景、江馬 眞、川島邦夫 第
4 回 Testes Workshop 精子形成・精巢
毒性研究会

CASA-System を用いた
Nitrobenzene 関連化合物の精子試験
II. 1, 4-dichloro-2-nitrobenzene 前
田秀子、宮脇英美子、原園 景、江馬 眞、
川島邦夫 第 4 回 Testes Workshop 精
子形成・精巢毒性研究会

CASA-System を用いた
Nitrobenzene 関連化合物の精子試験
III. Nitrobenzene 及び 1, 4-dichloro-
2-nitrobenzene の相対効力検定 原
園 景、前田秀子、宮脇英美子、前田秀
子、江馬 眞、川島邦夫 第 4 回 Testes
Workshop 精子形成・精巢毒性研究会

【協力研究者】

原園 景 (国立医薬品食品衛生研究所大
阪支所 生物試験部)

宮脇英美子 (国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所 生物試験部)

Table 1. Body weight gain and food consumption in rats given DBP on days 0 to 8 of pregnancy

DBP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750	1000	1250	1500
No. of females successfully mated	13	13	13	13	13	13	13
No. of dead females	0	0	0	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	234 ± 12	230 ± 3	236 ± 10	230 ± 7	234 ± 9	230 ± 5	233 ± 9
Body weight gain (g) ^a							
Days 0-9	15 ± 9	19 ± 6	-3 ± 26*	-16 ± 24**	-23 ± 17**	-27 ± 16**	-13 ± 11**
Days 9-20	81 ± 16	88 ± 9	93 ± 11	90 ± 13	77 ± 20	63 ± 22	49 ± 26**
Adjusted weight gain ^b	28 ± 10	34 ± 9	33 ± 10	31 ± 13	26 ± 8	17 ± 16	22 ± 15
Food consumption (g) ^a							
Days 0-9	107 ± 11	110 ± 8	63 ± 29**	47 ± 31**	47 ± 21**	48 ± 21**	60 ± 24**
Days 9-20	195 ± 16	199 ± 19	212 ± 21	213 ± 33	212 ± 16	192 ± 20	207 ± 23

^a Values are given as mean ± SD.

^b Adjusted weight gain refers to body weight gain excluding the uterus.

*,** Significantly different from the control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

Table 2. Reproductive findings in rats given DBP on days 0 to 8 of pregnancy

DBP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750	1000	1250	1500
No. of females successfully mated	13	13	13	13	13	13	13
No. (%) of nonpregnant females	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)	0(0)	5 (38.5)*	7 (53.8) *
No. (%) of pregnant females	13(100)	13(100)	13(100)	13(100)	13(100)	8 (61.5)*	6 (46.2) *
No. of implantations per female ^a	15.0 ± 1.8	14.8 ± 1.5	15.0 ± 1.4	13.9 ± 2.0	13.5 ± 3.1	8.8 ± 7.4**	6.4 ± 7.2**
Preimplantation loss per female(%) ^b	4.6	5.8	6.6	12.9	13.2	43.7*	62.0**
No. of litters	13	13	13	13	13	8	6
No. of litters totally resorbed	0	0	0	1	1	0	0
No. of corpora lutea per litter ^a	15.7 ± 1.4	15.7 ± 1.5	16.1 ± 1.1	16.2 ± 1.7	15.5 ± 0.9	15.5 ± 1.3	16.8 ± 1.3
No. of implantations per litter ^a	15.0 ± 1.8	14.8 ± 1.5	15.0 ± 1.4	13.9 ± 2.0	13.5 ± 3.1	14.3 ± 2.3	13.8 ± 1.0
Preimplantation loss per litter (%) ^b	4.6	5.8	6.3	12.9	13.2	8.5	17.6**
No. of resorption and dead fetuses per litter ^a	1.4 ± 2.0	0.5 ± 0.7	3.4 ± 3.8	4.2 ± 3.3	7.9 ± 2.5**	8.6 ± 4.4**	8.7 ± 2.9**
Postimplantation loss per litter (%) ^b	9.4	3.3	22.8	31.6**	61.1**	59.2**	62.7**
No. of live fetuses per litter ^a	13.6 ± 2.8	14.3 ± 1.8	11.6 ± 3.8	9.8 ± 4.2*	5.5 ± 3.0**	5.6 ± 3.6**	5.2 ± 2.9**
Sex ratio of live fetuses (male / female)	91 / 86	99 / 87	77 / 74	60 / 67	39 / 33	26 / 19	20 / 11
Body weight of live fetuses (g) ^a							
Male	3.30 ± 0.21	3.43 ± 0.23*	2.91 ± 0.39**	2.58 ± 0.32**	2.26 ± 0.34**	2.11 ± 0.46**	2.25 ± 0.34**
Female	3.16 ± 0.20	3.22 ± 0.16**	2.71 ± 0.40**	2.33 ± 0.29**	2.08 ± 0.34**	1.98 ± 0.45**	1.98 ± 0.60**

^a Values are given as mean ± SD.

^b [(No. of corpora lutea - no. of implantations)/no. of corpora lutea] x 100.

^a [(No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) x 100.

*,** Significantly different from the control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

Table 3. Body weight gain and food consumption in rats given DBP by gastric intubation on days 0-8 of pseudopregnancy

DBP (mg/kg)	0 (Control)	250	500	750	1000	1250	1500
No. of pseudopregnant rats	10	10	10	10	10	10	13
No. of dead rats	0	0	0	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	235 ± 6	230 ± 18	235 ± 10	236 ± 13	237 ± 12	235 ± 13	235 ± 8
Body weight gain (g) ^a							
Days 0-9	7 ± 5	8 ± 5	-6 ± 8	-20 ± 22**	-16 ± 13**	-24 ± 14**	-23 ± 8**
Food consumption (g) ^a							
Days 0-9	81 ± 12	85 ± 7	60 ± 17*	43 ± 20**	47 ± 14**	41 ± 18**	49 ± 16**

^a Values are given as mean ± SD.

*,** Significantly different from the control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

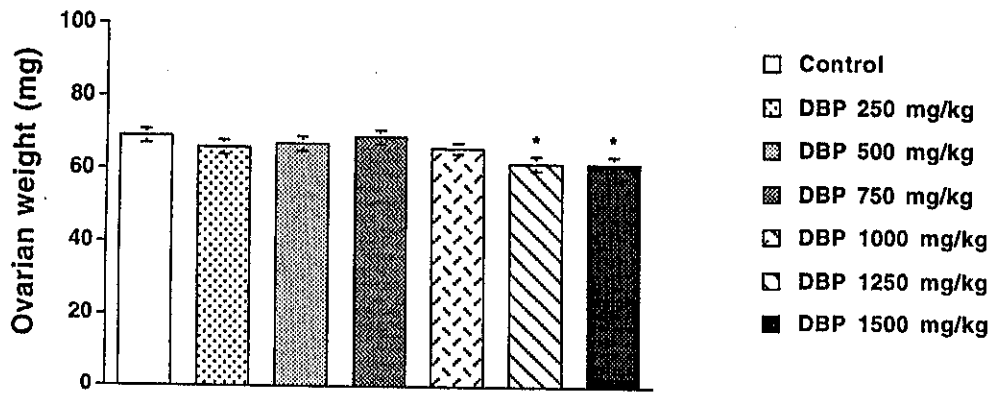


Fig. 1. Ovarian weight of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean \pm SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups and 13 different rats for the 1500 mg/kg group. * Significantly different from the control group, $P < 0.05$.

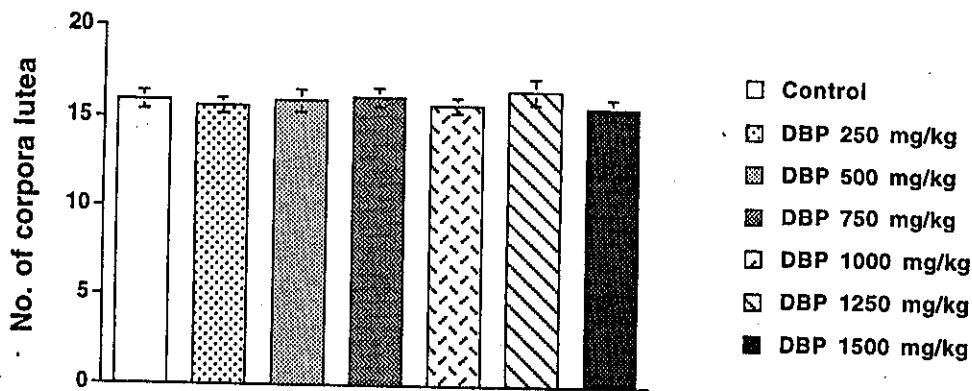


Fig. 2. Number of corpora lutea of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean \pm SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups and 13 different rats for the 1500 mg/kg group.

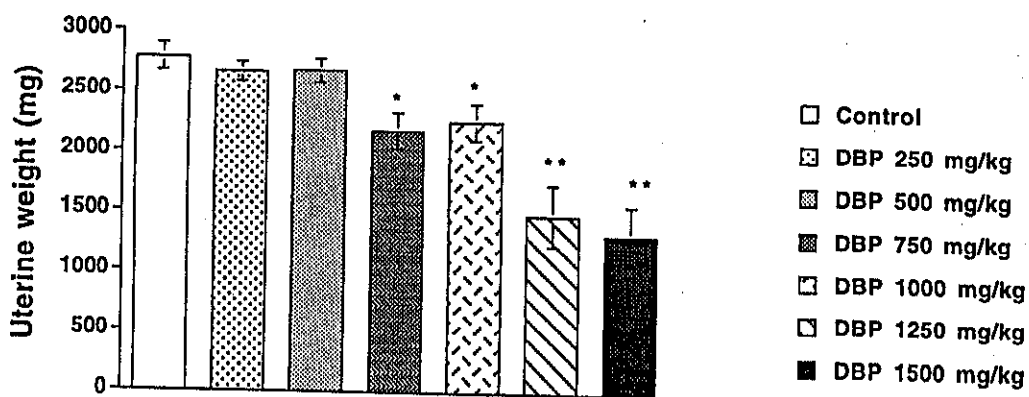


Fig. 3. Uterine weight of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean \pm SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups and 13 different rats for the 1500 mg/kg group. *, ** Significantly different from the control group, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

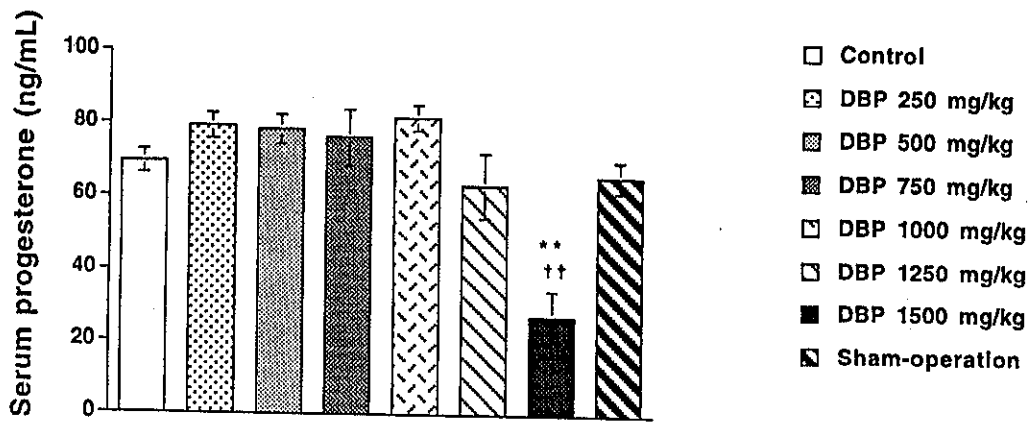


Fig. 4. Serum progesterone level in rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean \pm SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups, 13 different rats for the 1500 mg/kg group and 11 different rats for the sham-operation group. ** Significantly different from the control group, $P < 0.01$. †† Significantly different from the sham-operation group, $P < 0.01$.

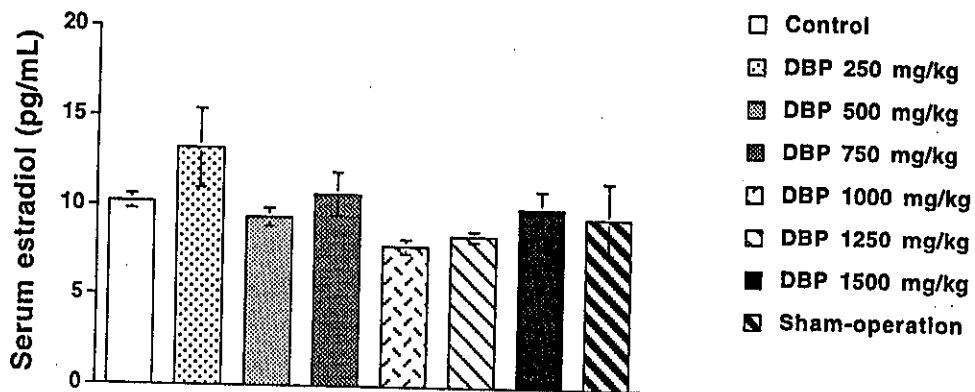


Fig. 5. Serum estradiol level in rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean \pm SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups, 13 different rats for the 1500 mg/kg group and 11 different rats for the sham-operation group.

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 名古屋市立大学 医学部 第一病理学教室 白井 智之 教授

研究要旨

ラット肝中期発がん性試験法を用いて、内分泌かく乱物質の発がんプロモーション作用の有無の検討を行っている。まず、その基礎的データを得ることを目的として、中期発がん性試験法の開始1週後に、雌雄のラットそれぞれに卵巣摘出、精巣摘出を行い、内在性ホルモンによる肝の前がん病変発生への影響を検討した。その結果、雌雄とも性腺摘出による変化は認められず、内在性の性ホルモンは肝の前がん病変の発生に影響しないものと考えられた。

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。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。本年度は内在する性ホルモンがラット肝の前がん病変の発生に及ぼす影響を検索する目的で、雌雄ラットを用い、それぞれ卵巣摘出、精巣摘出を実験開始の早期に行い、ラット肝の前がん病変である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢の発生を検討した。

B. 研究方法

肝中期発がん性試験法は6週齢のF344雄ラットを用い、diethylnitrosamine (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。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) 陽性細胞巢を免疫組織学的に染色する

。このGST-P陽性細胞巢を指標として、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。本年度はこの方法を応用し、6週齢の雌雄のラットを用い、DEN投与1週後に雌では卵巣摘出を、雄は精巣摘出を外科的に行う群、ならびにそれぞれsham手術を行う群を設け、いずれの群も実験開始3週目に2/3肝部分切除を行った。実験期間は8週間で終了し、血中の性ホルモンのレベル、体重、主要臓器の臓器重量を計測するとともに、肝の病理組織標本を作成し、GST-P抗体を用いた免疫染色を行った。肝の免疫組織標本は画像処理装置 (IPAP-Win)を用いて、肝切片の面積とGST-P陽性細胞巢の面積ならびに個数を計測し、肝の単位面積当りのGST-P陽性細胞巢の数ならびに個数を算出した (図1)。

C. 実験結果

体重は雌では卵巣の摘出した群で増加し、雄では精巣の摘出により逆に減少した (図2)。一方、肝の相対重量は雌雄とも、性腺の摘出によりともに減少した。臓器重量を見ると性腺の摘出により雄では前立腺ならびに精囊の著明な重量の減少がみられ、雌では子宮の著明に臓器重量が減少した。血中のホルモンレベルを見ると、性腺の摘出により雌のestradiolと雄のtestosteroneの減少が見られ、逆にLHの著明な増加が雌雄とも認められた (図3) 肝のGST-P陽性細胞巢の数および面積を計測した結果を表1と図4に示す。GST-P陽性細胞巢はその数、面積とも雄より雌の方が多く認められたが、性腺摘出による影響は認められなかった。

D. 考察

今回の実験結果から内在性の性ホルモンは肝の前がん病変である GST-P陽性細胞巢の発生に影響しないことが明らかとなった。このことは、内在するレベルでの性ホルモンは肝の発がんに影響しないものと考えられる。従って、この肝中期発がん性試験法で現在までに検索を終了したものうち、内分泌かく乱物質とされている農薬 (Alachlor, Aldrin, DDT, Dieldrin, Permethrin, Trifluralin, Vinclozolin など) やDESなど陽性を示した化合物の肝の前がん病変の発生 促進作用として、内分泌かく乱作用を経たものではないことが示唆された。

E. 結論

ラット肝中期発がん性試験法の開始1週後に、雌雄のラットそれぞれに卵巣摘出、精巣摘出を行い、内在性ホルモンによる肝の前がん病変発生への影響を検討した。その結果、雌雄とも性腺摘出による変化は認められず、内在性の性ホルモンは肝の前がん病変の発生に影響しないものと結論づけた。

F. 研究業績

M. Hirose, S. Fukushima, K. Imaida, N. Ito and T. Shirai : Modifying effects of phytic acid and γ -oryzanol on the promotion stage of rat carcinogenesis., *Anticancer Res.* 19: 3665-3670, 1999.

Y. Ikeda, S. Takahashi, J. Kimura, Y. M. Cho, K. Imaida, S. Shirai and T. Shirai : Anophthalmia in litters of female rats treated with the food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine., *Toxicol. Pathol.* 27: 628-631, 1999.

T. Shirai, L. Cui, S. Takahashi, M. Futakuchi, M. Asamoto, K. Kato and N. Ito : Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat prostate and induction of invasive carcinomas by subsequent treatment with testosterone propionate., *Cancer Lett.* 143: 217-221, 1999.

T. Shirai, M. Hirose and N. Ito Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. In: D. B. McGregor, J. M. Rice, S. Venitt (eds.), *The Use of Short- and Medium-term Tests for*

Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation, Vol. IARC Scientific Publications No. 146, pp. 251-272. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1999.

S. Iwasaki, K. Kato, T. Mori, S. Takahashi, M. Futakuchi and T. Shirai : Development of androgen-independent carcinomas from androgen-dependent preneoplastic lesions in the male accessory sex organs of rats treated with 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone propionate., *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 23-30, 1999.

M. A. Moore, H. Tsuda, S. Tamano, A. Hagiwara, K. Imaida, T. Shirai and N. Ito : Marriage of medium-term liver model to surrogate markers - a practical approach for risk and benefit assessment., *Toxicol. Pathol.* 27: 237-242, 1999.

A. Hagiwara, T. Murai, H. Yoshino, H. Goshima, S. Mori, A. Takashima, T. Shirai and S. Fukushima : Hepatocarcinogenic activity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats is not modified by sodium L-ascorbate., *Terato. Carcin. Mut.* 19: 33-42, 1999.

A. Hagiwara, P. Boonyaphiphat, H. Tanaka, M. Kawabe, S. Tamano, H. Kaneko, M. Matsui, M. Hirose, N. Ito and T. Shirai : Organ-dependent modifying effects of caffeine, and two naturally occurring antioxidants α -tocopherol and *n*-tritriacontane-16,18-dione, on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary and colonic carcinogenesis in female F344 rats., *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 399-405, 1999.

W. Thamavit, T. Shirai and N. Ito Liver flukes and biliary cancer. In: J. Parsonnet (ed.) *Microbes and Malignancy Infection as a Cause of Human Cancers*, pp. 346-371. New York, Oxford: Oxford University Press, 1999.

K. Ogawa, H. Tsuda, T. Shirai, T. Ogiso, K. Wakabayashi, D. W. Dalgard, U. P. Thorgeirsson, S. S. Thorgeirsson, R. H. Adamson and T. Sugimura : Lack of Carcinogenicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in

cynomolgus monkeys., Jpn. J. Cancer Res. 90: 622-628, 1999.

T. Shirai : Commentary: Oncosis and apoptosis: Two faces of necrosis in a new proposal to clear up the confusion regarding cell death., Toxicol. Pathol. 27: 495-496, 1999.

M. Hirose, K. Hakoi, S. Takahashi, T. Hoshiya, K. Akagi, L. Cui, K. Saito, H. Kaneko and T. Shirai : Sequential morphological and biological changes in the glandular stomach induced by oral administration of catechol to male F344 rats., Toxicol. Pathol. 27: 448-455, 1999.

M. Sano, A. Hagiwara, S. Tamano, R. Hasegawa, K. Imaida, N. Ito and T. Shirai : Dose-dependent induction of carcinomas and glutathione S-transferase placental form negative eosinophilic foci in the rat liver by di(2-ethylhexyl)phthalate after diethylnitrosamine initiation., J. Toxicol. Sci. 24: 177-186, 1999.

M. Hirose, S. Takahashi, K. Ogawa, M. Futakuchi, T. Shirai, M. Shibusaki, C. Uneyama, K. Toyoda and H. Iwata : Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats., Cancer Lett. 143: 173-178, 1999.

E. Okochi, N. Watanabe, Y. Shimada, S. Takahashi, K. Wakazono, T. Shirai, T. Sugimura, M. Nagao and T. Ushijima : Preferential induction of guanine deletion at 5'-GGGA-3' in rat mammary glands by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine., Carcinogenesis. 20: 1933-1938, 1999.

M. Futakuchi, M. Hirose, T. Ogiso, K. Kato, M. Sano, K. Ogawa and T. Shirai : Establishment of an *in vivo* highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model., Jpn. J. Cancer Res. 90: 1196-1202, 1999.

K. Ogawa, M. St. John, M. L. de Oliveira, L. Arnold, T. Shirai, T.-T. Sun and S. M. Cohen : Comparison of uroplakin expression during urothelial carcinogenesis induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats and mice., Toxicol. Pathol. 27: 645-651, 1999.

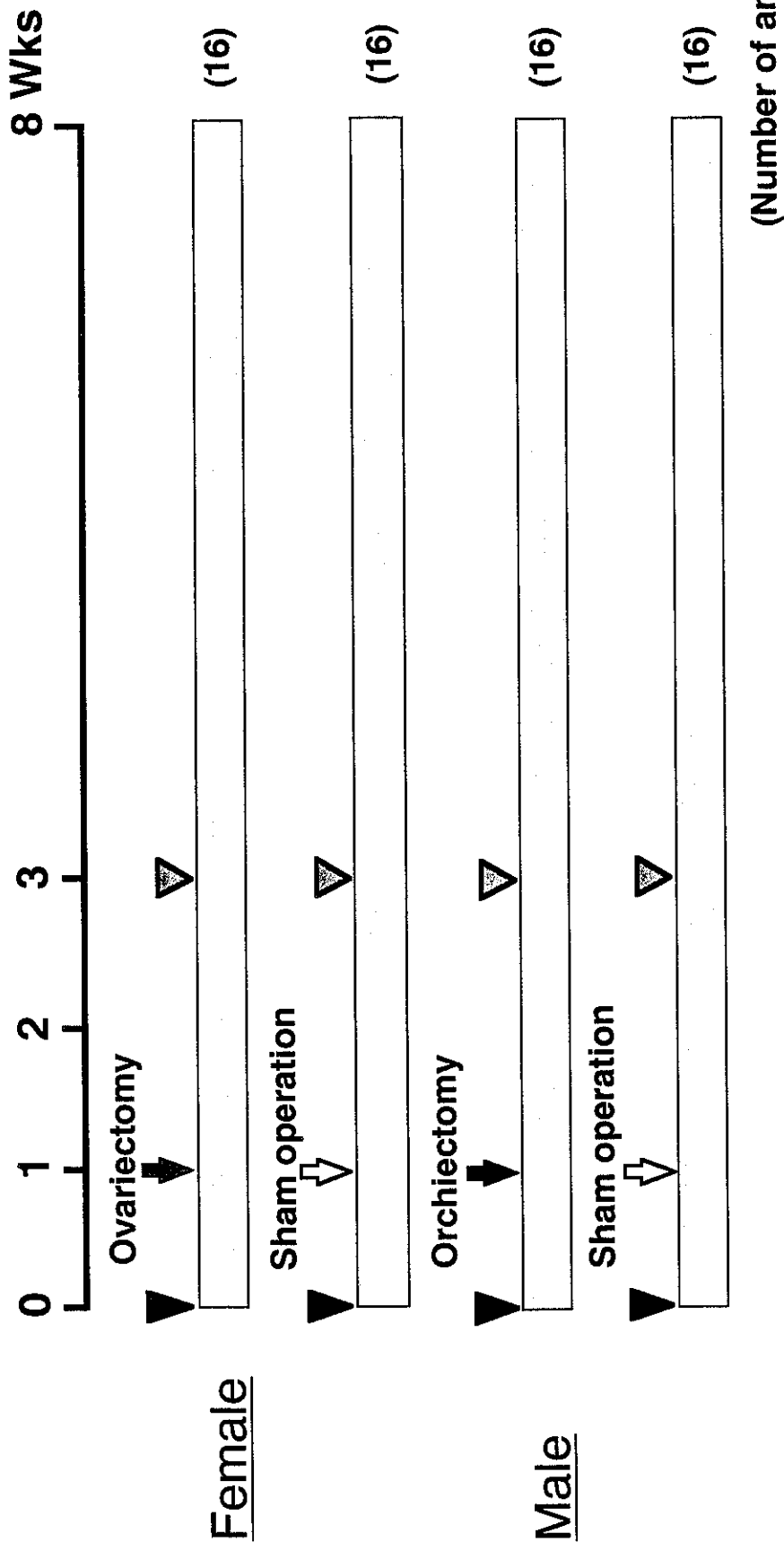
G. 知的所有権の取得状況

なし

表1

Quantitative analysis of the liver GST-P foci

Sex	Treatment	No. of Rat	GST-P Positive Foci/ Total Area	
			Number (No./cm ²)	Area (mm ² /cm ²)
F	DEN + Ovariectomy	13	13.86 ± 5.32	1.07 ± 0.48
F	DEN + Sham	12	10.91 ± 3.94	1.23 ± 0.42
M	DEN + Orchiectomy	14	8.58 ± 3.41	0.61 ± 0.33
M	DEN + Sham	15	8.38 ± 3.13	0.56 ± 0.22

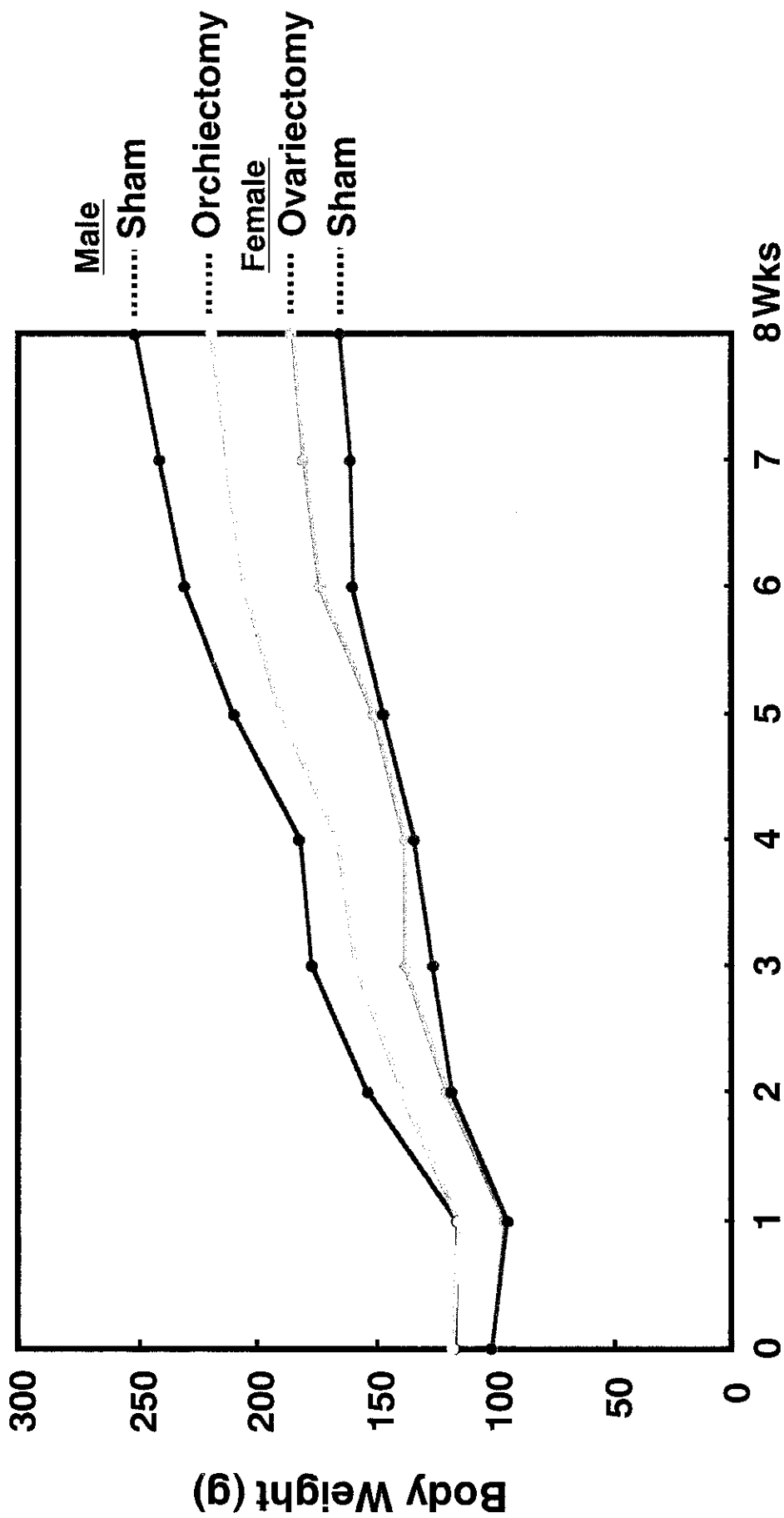


Animal: 6-week-old, male and female F344/DuCrj rats

▼ DEN, 200mg/kg, ip

▽ 2/3 Partial Hepatectomy

Effects of endogenous sex hormones in a rat medium-term liver bioassay for carcinogens



Growth curve