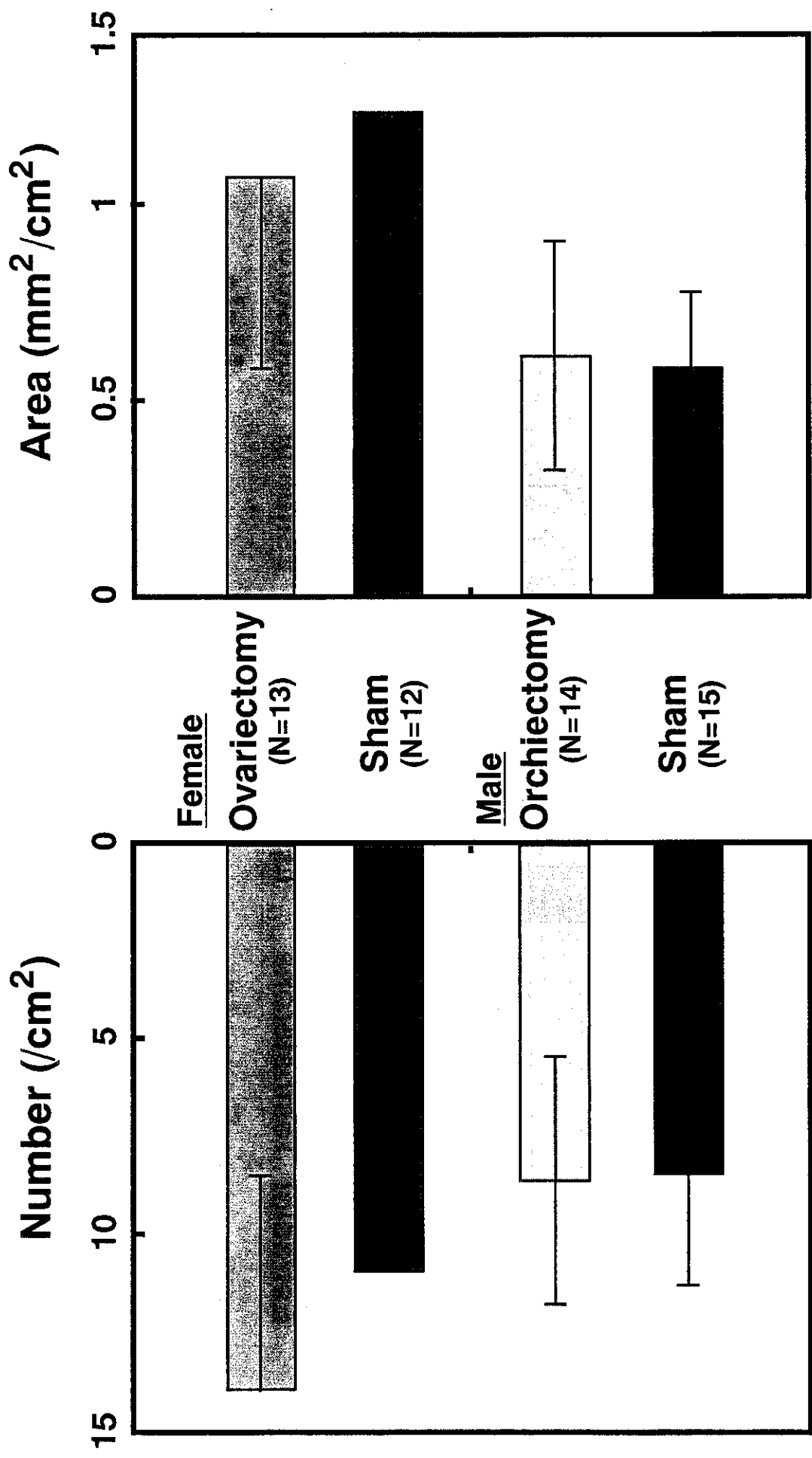


Serum sex hormonal levels in ovariectomized or orchietomized rats



Quantitative analysis of liver GST-P⁺foci

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告要旨

甲状腺腫瘍に対する内分泌攪乱物質の影響に関する研究
分担研究者 広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

研究要旨： 雌 F344 ラットを卵巣摘出し、一週後に diisopropanolnitrosamine (DHPN)によりイニシエーション処置し、1 週後からサルファジメトキシシン(SDM)を8週間混餌投与した。その後、0.5 ないし 0mg のエストラジオール・ベンゾエート(EB)を皮下に4週間毎に埋植し、25 週後に殺処分した。両群で過形成、腺腫、癌が認められ、DHPN/SDM/EB 群での腺腫の発生頻度・発生個数と癌の PCNA 陽性率は DHPN/SDM 群に比し有意に増加した。雌 F344 ラットを卵巣摘出(OVOX)し、3 週間ヨード欠乏食 (ID) を投与した後、50 ないし 0mg/kg のメチルニトロソ尿素 (MNU) を一回静脈内投与した。その後、0.5 ないし 0mg のエストラジオール・ベンゾエート(EB)を4週間に1回の頻度で皮下埋植し、26 週後に殺処分した。病理組織学的には、ID/MNU/EB 群に甲状腺の濾胞上皮のう胞状過形成、腺腫と癌が、MNU/EB 群で過形成と腺腫が誘発されたが、ID/MNU/EB 群の過形成が有意に増加した。その他の群ではこれらの病変は誘発されなかった。

A. 研究目的

甲状腺腫瘍誘発には、ネガティブ・フィードバック機構を介した下垂体からの甲状腺刺激ホルモン(TSH)の分泌促進が大きく関与している。しかし、内分泌攪乱物質のひとつである合成のエストラジオール・ベンゾエート(EB)は、N-methyl-N-nitrosourea(MNU)をイニシエーターとして用いたラット二段階発癌モデルにおいて、甲状腺腫瘍の誘発を増強することが既に報告されており、そのメカニズムとしては誘発された甲状腺腫瘍の estrogen receptor に EB が直接作用して甲状腺腫瘍誘発を増強する可能性が示唆されている (Ito, A.ら J. Toxicol. Pathol. 8: 285-289. 1995)。しかし、その作用発現メカニズムについては必ずしも未だ明確にされていない。また、他の内分泌攪乱物質にこのような作用があるか否かはほとんど調べられていない。

昨年度は、DHPN によりイニシエーション処置を行い、甲状腺発がんプロモーターであるサルファジメトキシシン(SDM)でプロモーション処置し増殖性病変を誘発させたラット甲状腺二段階発がんモデルを用いて、強いエストロゲン作用を有するエチニールエストラジオール(EE)や内分泌攪乱物質のアトラジン、メトキシクロール、ビスフェノールAを投与し、それらの甲状腺発がん促進作用を検討したところ、い

ずれの物質にも促進作用は認められなかった。特に EE 投与群では文献と異なる陰性結果が得られたため、今年度は、EE を EB に変更し、投与方法も混餌投与から皮下埋植に変更し、陽性対照群で明らかな甲状腺腫瘍誘発の増強が引き起こされるか否かについての実験を行った。

B. 研究方法

実験1：雌 F344 ラットを卵巣摘出(OVOX)し、一週後に DHPN を一回皮下投与してイニシエーション処置とした。DHPN 処置1 週後から 1000 ppm の SDM を8週間混餌投与した後、第1群には 0.5mg のエストラジオール・ベンゾエート(EB)を4週間に1回の頻度で皮下埋植し、第2群には基礎飼料を25 週間混餌投与した。投与終了後に全動物を殺処分し、血液中の甲状腺関連ホルモンを測定すると共に、甲状腺を組織学的に観察し、EB の甲状腺腫瘍誘発促進作用の有無を比較検討した。

実験2：60 匹の雌 F344 ラットを卵巣摘出(OVOX)し、第1から3群(各群15 匹)には3 週間ヨード欠乏食(ID)を投与し、第4群には基礎食を3 週間投与した。その後、第1、2および4群には 50mg/kg のメチルニトロソ尿素(MNU)を一回静脈内投与してイニシエーション処置とした後、第1、3および4群には 0.5mg のエストラジオール・ベンゾエート(EB)を4週

間に1回の頻度で皮下埋植し、第2群には基礎飼料を26週間混餌投与した。投与終了後に全動物を殺処分し、甲状腺を組織学的に観察し、EBの甲状腺腫瘍誘発促進作用の有無を比較検討した。

C. 研究結果

実験1：第1群(OVOX/DHPN/SDM/EB群)での体重増加抑制は、EBの投与後から著しく顕著となった。血中甲状腺刺激ホルモン(TSH)は第1群と第2群の間に明らかな差異はみられなかった。臓器重量では、第1群の甲状腺の絶対および相対重量の平均値は第2群(OVOX/DHPN/SDM/BD群)に比し、著しく高値を示したが、標準偏差値が大きいと統計学的には有意でなかった。組織学的には、両群に濾胞上皮の過形成、腺腫、癌が発現したが、第1群の腺腫の発生頻度と発生個数は第2群に比し有意に増加した(図1)。また、第1群の癌のPCNA陽性率も第2群に比し有意に増加した(図1)。剖検において、第1群の下垂体は、全例腫瘍化し、その絶対・相対重量は著しく増加した。また、第1群の子宮および肝の絶対・相対重量も第2群に比し、有意に増加した。

実験2：第1群(OVOX/ID/MNU/EB群)、第3群(OVOX/ID/EB群)と第4群(OVOX/MNU/EB群)での体重増加抑制は第2群(OVOX/MNU/EB群)に比しEB投与後から顕著となった。血中TSHは群間に有意な差はみられなかった。第1、3と4群の甲状腺重量の相対重量は第2群に比し有意に増加した。病理組織学的には、第1群に甲状腺の濾胞上皮のう胞状過形成、腺腫と癌が誘発されたが、第2から4群においては甲状腺増殖性病変は認められなかった(図2)。第1群のその過形成の発生頻度と発生個数は第2群に比し有意に増加した(図2)。第4群には過形成と腺腫が発現したが、有意な増加ではなかった。第1、3と4群の下垂体は腫瘍化し、その絶対・相対重量は第2群に比し有意に増加した。第1、3と4群の肝の絶対・相対重量も有意に増加した。

D. 考察

以上の成績より、今回の実験条件下では、EBは甲状腺濾胞上皮の増殖性病変の誘発を増強す

ることが明確となった。その増強メカニズムとしては、血中TSHが第1群で有意に増加しなかったことから、EBが甲状腺濾胞細胞を直接刺激している可能性が考えられ、その直接刺激により甲状腺増殖性病変の発生が増強したものと推察された。従って、前年度に同じプロトコルで実施したメトキシクロール、アトラジンおよびビスフェノールAの実験に関しては、これらの物質にEBのような甲状腺に対する発癌促進作用はないものと結論される。

一方、イニシエーターとしてMNUを使用し、イニシエーション前に甲状腺増殖刺激としてヨード欠乏食を投与していた実験2においては、EB投与により甲状腺増殖性病変が誘発され、EBによる増強作用が認められた。この成績は伊藤らの報告(J. Toxicol. Pathol. 8: 285-289, 1995)を支持するものであるが、血中TSHの増加はみられなかったことから、その甲状腺増殖性病変の誘発促進の原因が何であるかを今後探求しなければならない。

F. 研究発表：

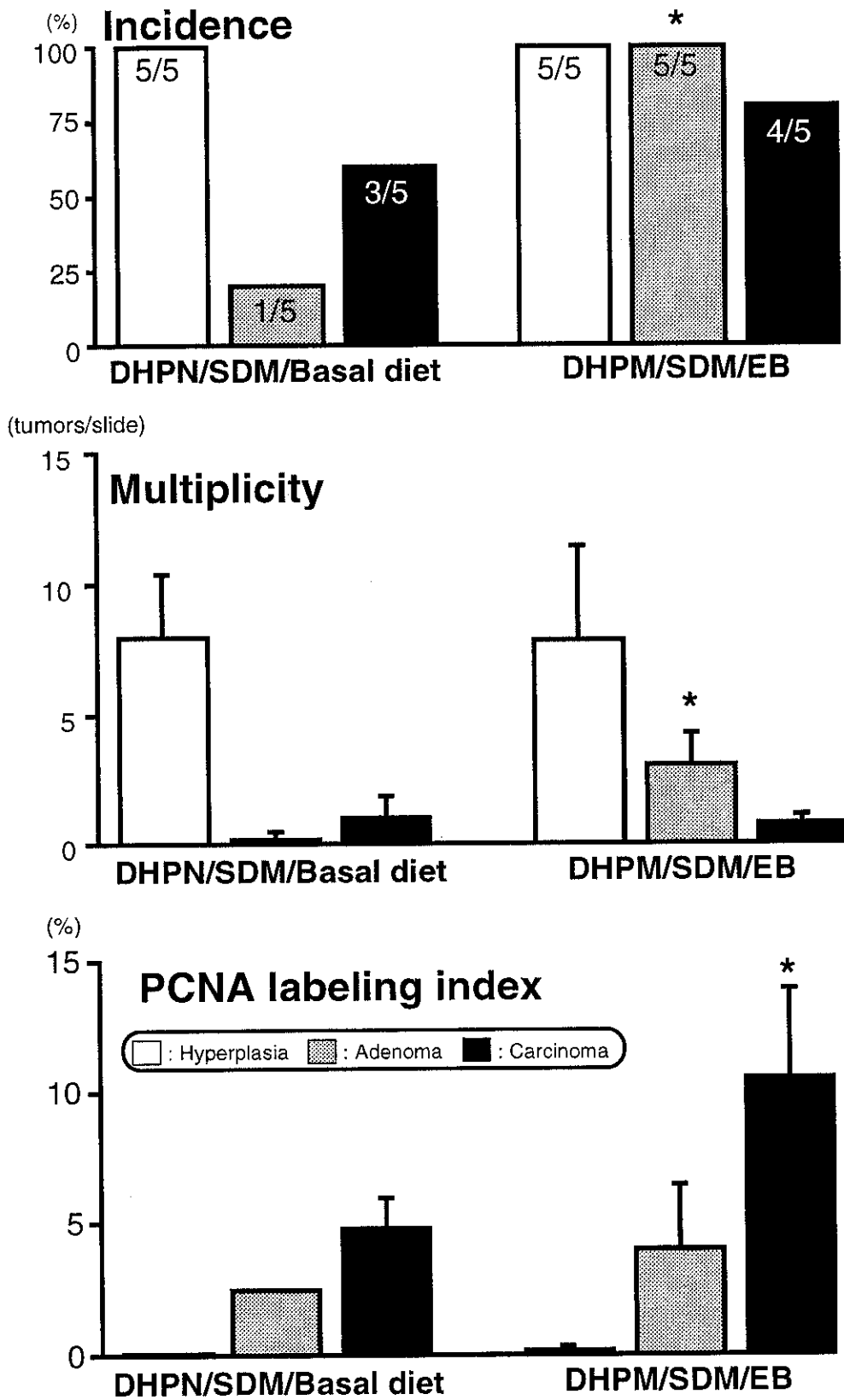
1. 論文発表

Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Funakoshi, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H. and Hirose, M.: Time course observation of serum thyroid-related hormone levels and thyroid proliferative lesions in rats treated with kojic acid after DHPN initiation. J. Toxicol. Sci. 24: 145-155. 1999.

2. 学会発表

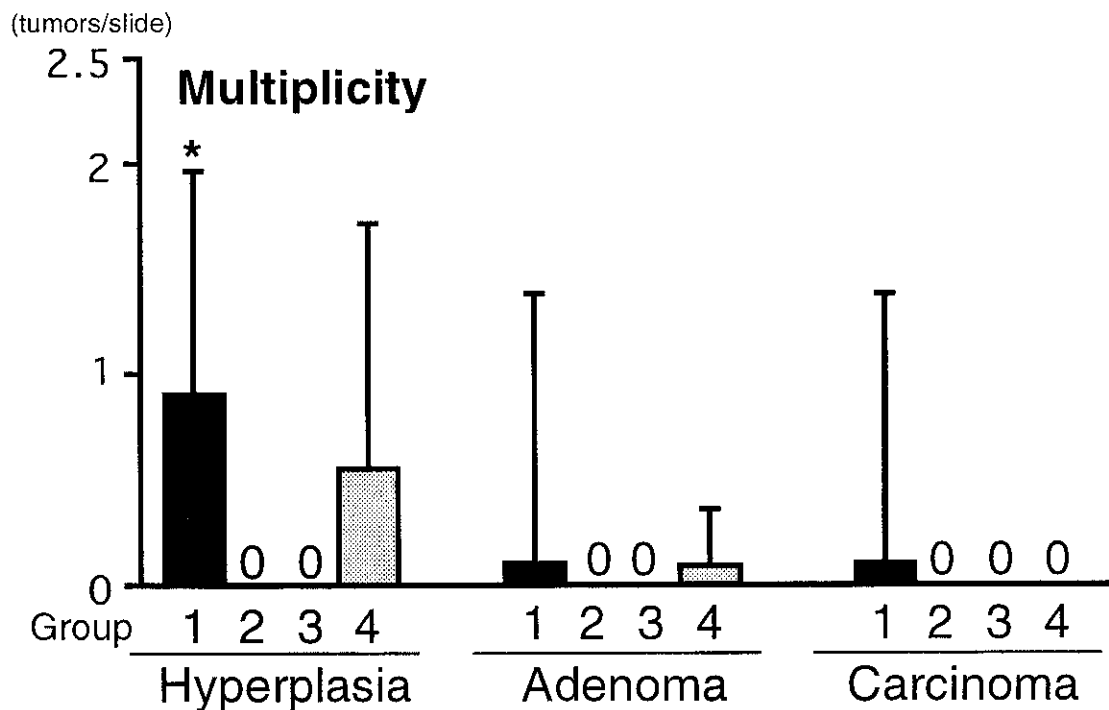
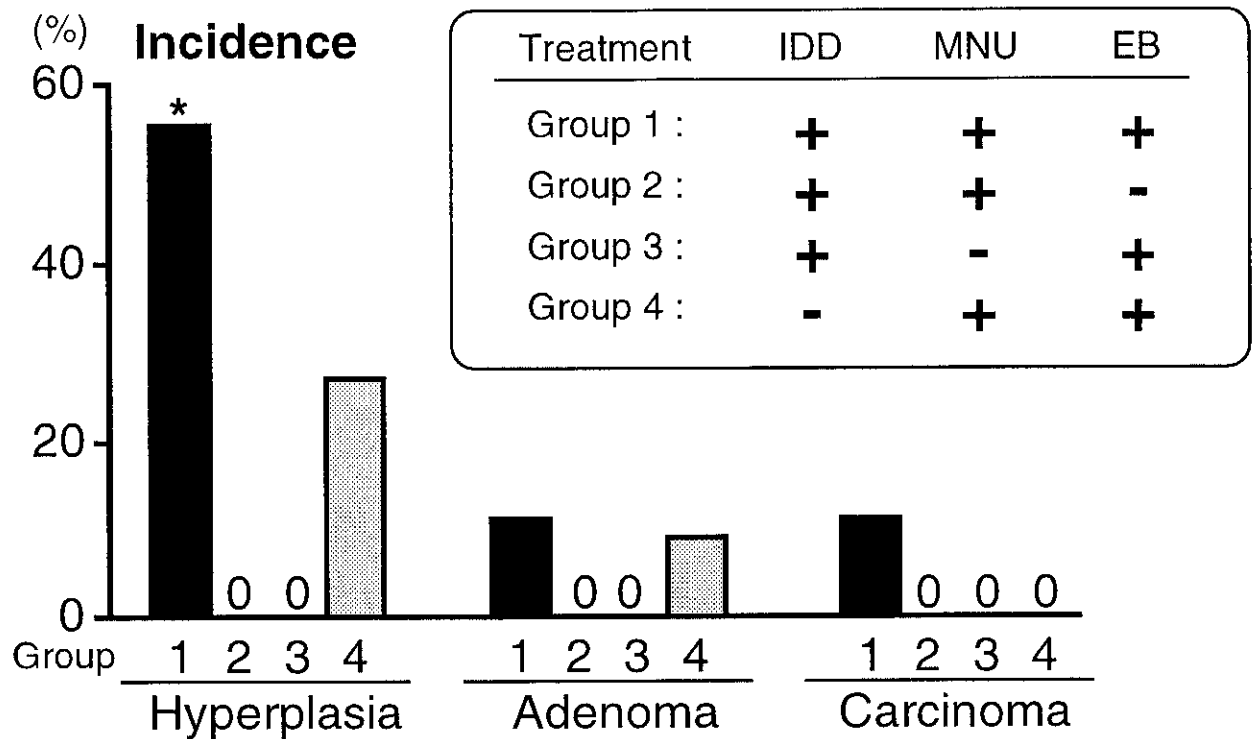
高木久宜、三森国敏、小野寺博志、安原加壽雄、糺谷高敏、広瀬雅雄：卵巣摘出ラットにおける内分泌攪乱化学物質の甲状腺増殖性病変に対する修飾作用。第26回日本トキシコロジー学会学術年会。1999年7月。

広瀬雅雄：内分泌臓器の毒性変化と内分泌かく乱化学物質：甲状腺。第16回日本毒性病理学会学術年会シンポジウム。2000年1月。



* : Significantly different from DHPN/SDM/Basal diet group at $p < 0.05$.

Fig.1 Histological findings of thyroid proliferative lesions in ovariectomized rats given estradiol benzoate (EB) after DHPN and SDM treatment



* : Significantly different from group 2 at $p < 0.05$.

Fig.2 Incidence and multiplicity of thyroid proliferative lesions in ovariectomized rats given estradiol benzoate (EB) after iodine-deficient diet (IDD) and MNU treatment

ジエチルスチルベステロールとダイオキシンの相乗的子宮肥大作用と
ゲニスタインのハーシュバーガーアッセイに対する影響ならびに
胎児の子宮内位置による内分泌生殖器系に対する影響に関する研究

分担研究者 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学教授

研究要旨 前年度予備試験的に実施した広瀬班の経費で実施した実験（いずれも子宮肥大試験による相乗効果の有無の確認：エストラジオール(E2)、ジエチルスチルベステロール(DES)、およびゲニスタイン(G)とTCDDの相乗作用について1群6匹、7群構成)に基づき、より高用量のGとTCDDによる子宮肥大試験での相乗作用、G+テストステロン(T)のハーシュバーガー試験におけるU字型用量作用関係の検証、胎児期の子宮内位置の生後発育に及ぼす影響が企画された。試験が現在実施中であり、前年の予備試験について略記する。E2+TCDDでは投与量は(以下カッコ内の表記は、E2、Tの順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である)：1群(対照群、0、0)、第2群(0.15、0)、第3群(0.3、0)、第4群(0.075、2.5)、第5群(0.15、5)、第6群(0、5)および第7群(0、10)。DES+TCDDでは投与量は(以下、DES、Tの順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$)：1群(対照群、0、0)、第2群(0.1、0)、第3群(0.2、0)、第4群(0.05、2.5)、第5群(0.1、5)、第6群(0、5)および第7群(0、10)。G+TCDDでは投与量は(以下、DES、Tの順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$)：1群(対照群、0、0)、第2群(12.5、0)、第3群(25、0)、第4群(6.25、2.5)、第5群(12.5、5)、第6群(0、5)および第7群(0、10)。TCDDは試験開始日1回、他の剤は14日間いずれも皮下投与された。予備試験の全てにおいて、TCDDの単独または併投群で、肝臓の比重量または実重量が増加しており、皮下の経路から吸収されたTCDDは少なくとも肝臓に対しては作用しているように見える。E2、DES、またはDESとの併用によって子宮と膈に明らかな相乗効果は見られなかった。また、今回のエストロゲン類では子宮重量に明確な用量反応相関が認められたのはGのみであった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化合物に関するOECDのテストガイドライン策定との関連で、T2Tにおける、エストロゲン作用検出のためのin vivo短期試験として、子宮肥大試験とハーシュバーガー試験が採用される見込みである。これらは、1960年代にエストロゲンの生物検定法として多用されていたが、ラジオイムノアッセイ等により直接定量できるようになって、その生物検定としての意味が薄れていた。内分泌かく乱化学物質のエストロゲン作用が注目され、再びエストロゲニシティの検定法として浮上してきた。近年の分子生物学の進歩が著しいことに鑑みて、子宮肥大の分子機構に迫る目的と、複数の内分泌かく乱化学物質による相乗作用が生じるのか否かを確かめる目的で、今回の実験が実施された。天然の最も強力なエストロゲン活性を持つエストラジオール(E2)、合成エストロゲンで子宮内暴露により腫瘍を起こすことが知られているジエチルスチルベステロール(DES)、および植物性エストロゲンのゲニスタイン(G)と、Ahレセプター(AhR)を介して生物活性を示す2,3,7,

8-テトラクロロ-p-ダイオキシン(TCDD)との間に子宮肥大に関して相乗作用があるか否かについて昨年度実施した7群構成の低用量実験では、いずれの組み合わせでも複合的な作用は認められなかった。そこで、今回はDESとTCDDについてより高用量の組み合わせで複合作用が認められるか否かについて検討する。

Gに関しては、去勢雄ラットハーシュバーガーアッセイにおいてテストステロン(T)との間にU字型の反応曲線が見られるか否かを確認する。

内分泌かく乱化学物質問題の標的が、胎児、新生児(性未熟期)、成人(性成熟期)、および老年期に亘り、そのおのおのに対して、作用点、作用機序、影響が異なることが示唆されている。性成熟期の影響は、従来の毒性試験プロトコルにより有る程度カバーされていることが考えられる。また、胎児期に関する検討は、催奇形学、発生学の立場から若干の検討が加えられつつある。これに対して、性未熟期(ヒトにおける新生児期、小児期)の検討が立ち後れている事が指摘さ

れる。

そこで、ラットの生後 0~30 日までの間の内分泌機能を、その関係諸臓器の形態変化との関連性で把握することを目的とする。特に、ヒトと違い、多胎であるラットの、胎内雌雄配置の影響の有無を考慮することを、今回の検討に加える。

B. 研究方法

1. DES+TCDD の子宮肥大作用における複合効果

6 週齢の Crj:CD ラットを日本チャールスリバー社より入手し、卵巣摘出後、7 週齢で試験を開始する。実験は 1 群 6 匹の 7 群で実施する。TCDD は試験開始日と 7 日後に、DES は 14 日間皮下投与する。投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、DES、TCDD の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0）、第 2 群（0.5、0）、第 3 群（1.0、0）、第 4 群（0.25、2.5）、第 5 群（0.5、5）、第 6 群（0、5）および第 7 群（0、10）。DES 最終投与翌日に、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、肝臓、子宮および膈重量を測定する。子宮および膈については病理組織学的検査を実施する。

2. G+T のハーシュバーガー試験における U 字型反応曲線

6 週齢の Crj:CD ラットを日本チャールスリバー社より入手し、精巣摘出後、7 週齢で試験を開始する。実験は 1 群 6 匹の 7 群で実施する。G および T ともに試験開始日より毎日 1 回 14 日間皮下投与する。投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、G、T の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0.5）、第 2 群（6.25、0.5）、第 3 群（9、0.5）、第 4 群（12.5、0.5）、第 5 群（18、0.5）、第 6 群（25、0.5）および第 7 群（36、0.5）。G 最終投与翌日に、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、肝臓、精巣上体、精囊、凝固腺および前立腺を測定する。副生殖器については病理組織学的検査を実施する。以上、1 と 2 の実験は（財）動物繁殖研究所にて実施する。

3. 新生児期の内分泌機能を中心とした発達生理に対するラット胎児の子宮内位置の影響

分娩直前の妊娠ラットより、胎内配置を記録しつつ帝王切開し、仮親に育てさせ、生後 0~30 日の間、経時的に血中ホルモン値および諸臓器（内分泌臓器を中心に）の重量および形態学的検討を行う（免疫染色を含む）。動物の飼育ならびに解剖については、食葉センターで実施し、血中ホルモンの測定について動物繁殖研究所にて実施する。

（倫理面への配慮）

TCDD の取り扱いに関し、環境汚染を防止するためにヘパフィルター付きの陰圧チェンバー内で実験し、動物を含む TCDD 汚染物については安全な焼却法が開発されるまで、凍結保存する。

C. 研究結果

上記の 3 研究課題については、OECD との対応が決まらず、実施を一時見合わせていたため、現在実施しているところであり、まだ結果が出ていない。前年度広瀬班の経費で実施していた実験が上記 3 実験の予備実験に相当するため、その内容について、略記する。いずれも子宮肥大試験による相乗効果の有無の確認のために実施されたものであり、E2、DES、および G と TCDD の相乗作用について 1 群 6 匹、7 群構成で実施された。TCDD は試験開始日 1 回、他の剤は 14 日間いずれも皮下投与された。

1. E2+TCDD

投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、E2、T の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0）、第 2 群（0.15、0）、第 3 群（0.3、0）、第 4 群（0.075、2.5）、第 5 群（0.15、5）、第 6 群（0、5）および第 7 群（0、10）。いずれの群でも一般症状の変化および死亡はなく、体重にも群間差はなかった。肝比重量の増加が 4、5、6、7 群で肝実重量の増加が 7 群で認められた。子宮と膈の相対重量が 2 および 3 群で、同実重量の増加が 3 群で認められた。子宮内膜と膈上皮の関連した組織学的変化が 3 群で認められた。

2. DES+TCDD

投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、DES、Tの順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1群（対照群、0、0）、第2群（0.1、0）、第3群（0.2、0）、第4群（0.05、2.5）、第5群（0.1、5）、第6群（0、5）および第7群（0、10）。いずれの群でも一般症状の変化および死亡はなく、体重にも群間差はなかった。肝比重量の増加が5、6、7群で肝実重量の増加が7群で認められた。子宮と膣については、重量、組織学的所見に影響は見られなかった。

3. G+TCDD

投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、DES、Tの順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1群（対照群、0、0）、第2群（12.5、0）、第3群（25、0）、第4群（6.25、2.5）、第5群（12.5、5）、第6群（0、5）および第7群（0、10）。3群で被験物質に起因するとは考えられない死亡が1例生じたが、他いずれの群でも一般症状の変化および死亡はなく、体重にも群間差はなかった。肝実重量と比重量の増加が4、5、6、7群で認められた。子宮の実重量と相対重量の増加が1、2、3、4、5群で認められ、Gの用量との間に用量相関関係を示すとともに、組織学的に子宮内膜の肥厚が認められた。

D. 考察

予備試験の全てにおいて、TCDDの単独または併投群で、肝臓の比重量または実重量が増加しており、皮下の経路から吸収されたTCDDは少なくとも肝臓に対しては作用しているように見える。E2、DES、またはDESとの併用によって子宮と膣に明らかな相乗効果は見られなかった。TCDDの子宮に対する作用が明確に見られなかった理由の一つに投与経路が関与している可能性があると考えられた。子宮のAhレセプターに関して、卵巣摘出後の消長を調べる必要があるかもしれない。

今回のエストロゲン類では子宮重量に明確な用量反応相関が認められたのはGのみであった。E2及びDESに関しては、単独で他段階の用量を用いてSD系ラットでの反応性を確認する必要があると考えられた。

E. 結論

予備試験の全てにおいて、TCDDの単独または併投群で、肝臓の比重量または実重量が増加しており、皮下の経路から吸収されたTCDDは少なくとも肝臓に対しては作用しているように見える。E2、DES、またはDESとの併用によって子宮と膣に明らかな相乗効果は見られなかった。また、今回のエストロゲン類では子宮重量に明確な用量反応相関が認められたのはGのみであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Fukaya S, Saito K, and Suzuki K (2000) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia(ocd). *Mammalian Genome* (in submission)
2. Akimoto T, Suzuki H, Arai Y, Nakama K and Suzuki K (2000) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. *Experimental Animal* (accepted)
3. 鈴木勝士(1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌かく乱化学物質学会ニュースレター、4: 2-3.
4. Suzuki H, Kokado M, Saito K, Kunieda T and Suzuki K (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) *Mammalian Genome* 10(11):1106-1107.
5. 板垣昌志、阿部省吾、阿部栄、酒井淳一、鈴木勝士(1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、*日本獣医師会雑誌* 52(9) 561-564.
6. 鈴木勝士(1999)環境ホルモンと獣医師の役割、*アニマリタリアン*、vol.9:1.

2. 学会発表

1. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位(第2報)、子情報通信学会、ME とバイオサイバネティクス研究会
2. 斉藤賢一、雑賀寿和、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)マイクロ波照射がウサギおよびサル之眼におよぼす影響、電気学会計測研究会 IM99-66 p39-42
3. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)EI および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、電気学会計測研究会 IM99-65 p.33-37
4. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之(1999)先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)の睡眠時脳波における加齢に伴う変化、第 31 回成長談話会大会(抄録 p22)
5. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)EI および ddY マウスの脳硬膜上からの短潜時聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第 127 回日本獣医学会
6. 深谷幸代、鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、井出雅子、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)骨軟骨形成不全症(ocd/ocd)ラットの原因遺伝子は第 11 染色体上に存在し D11Mgb3 と連鎖している、第 127 回日本獣医学会
7. 醍醐久美、鈴木浩悦、中宮英次郎、八木未央、岡田美香、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索:hgn 遺伝子の雌表現型におよぼす影響の評価、第 127 回日本獣医学会
8. 太田千春、徳力剛、高須正規、平林美紀、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)腎低形成症の腎不全状態の基礎的評価、第 127 回日本獣医学会
9. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、新井豊、八木未央、竹中基郎(1999)鶏胚でのエストロンによる発生かく乱とエストロゲンレセプター mRNA の発現、第 127 回日本獣医学会
10. 鈴木浩悦、中宮英次郎、醍醐久美、岡田美香、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索:連鎖するマーカーの整列化とマウス 11 番染色体上での位置の推定、第 127 回日本獣医学会
11. 尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、小川実幸、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程におけるテネインと NCAM の発現分布、第 127 回日本獣医学会
12. Saito, K., H. Suzuki and K. Suzuki (1999) Adverse developmental effects of low intensity radio frequency radiation at 428MHz on chick embryo. 2nd joint international symposium of Congenital Anomalies in Korea. (10/ 1~10/ 2: chunchon)
13. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索、日本アンドロロジー学会
14. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(1999)鶏胚でのエストロゲンレセプター mRNA の発現とエストロンによる発生かく乱、第 39 回日本先天異常学会
15. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)直流磁場照射のマウス胎子におよぼす影響、第 39 回日本先天異常学会
16. 小川実幸、尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程にみられる上皮細胞の増殖とアポトーシス、第 2 回日本組織工学会
17. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラットの第 10 染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索:高度に連鎖するマーカーの検索とマウス第 11 染色体上での位置の推定、第 46 回日本実験動物学会

18. 中宮英次郎、鈴木浩悦、醍醐久美、八木美央、平林美紀、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット 10 番染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：病因遺伝子周辺のマップ作成、第 126 回日本獣医学会
19. 松倉克仁、鷺巣 誠、倉繁裕美、尼崎 肇、中條真二郎、清水一政、浦川紀元、鈴木勝士(1999)犬糸状虫感染犬の肺動脈病変形成に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン・受容体拮抗薬の効果、第 126 回日本獣医学会
20. 岩間良子、小川実幸、日比佐知子、尼崎 肇、鷹栖雅峰、福島正則、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程における上皮プラコード領域での上皮細胞の増殖と移動、第 126 回日本獣医学会
21. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウスの脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位、ME とバイオサイバネティクス研究会、信学技報 Technical Report of IEICE, MEB98-126

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. 実用新案登録
なし



Fig. 1 Liver Weights in Ovariectomized Rats Treated with E2 and TCDD

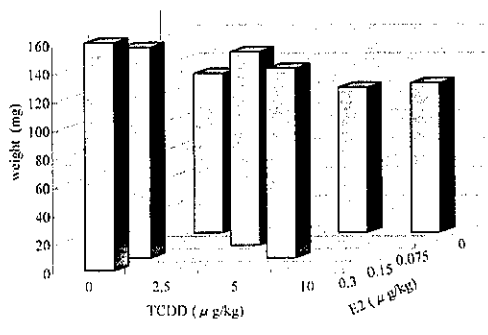


Fig. 2 Uterine Weights in Ovariectomized Rats Treated with E2 and TCDD

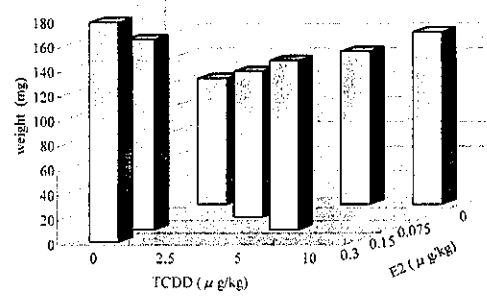


Fig. 3 Vagina Weights in Ovariectomized Rats Treated with E2 and TCDD

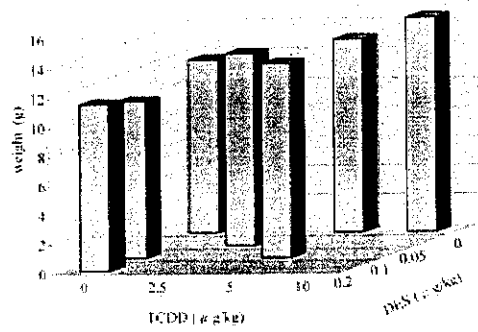


Fig. 1 Liver Weights in Ovariectomized Rats Treated with DES and TCDD

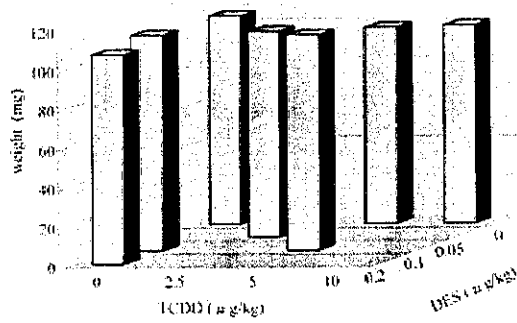


Fig. 2 Uterine Weights in Ovariectomized Rats Treated with DES and TCDD

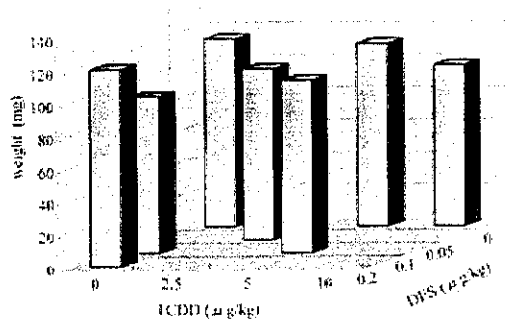


Fig. 3 Vagina Weights in Ovariectomized Rats Treated with DES and TCDD

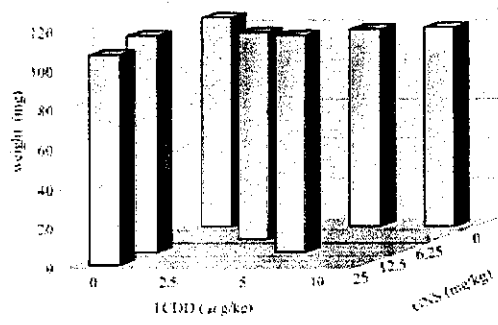


Fig. 2 Uterine Weights in Ovariectomized Rats Treated with GNS and TCDD

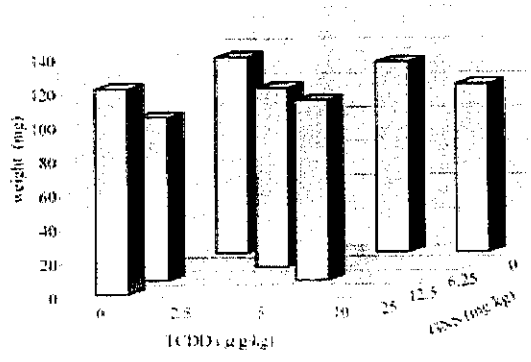


Fig. 3 Vagina Weights in Ovariectomized Rats Treated with GNS and TCDD

③ 研究報告書

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

子宮肥大試験法および Hershberger の試験法の適用に関する研究
ならびに胎児の子宮内位置による内分泌生殖器系に対する影響に関する研究

分担研究者 吉村 慎介、太田 亮、長尾哲二、丸茂秀樹、大原直樹、今井 清

研究要旨

OECD バリデーションプロトコールに従い、0.01 から 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の 17-Ethinyl estradiol (EE) を幼若ラットあるいは卵巣摘出ラットに投与した。その結果、EE による子宮肥大作用の用量依存性が認められ、経口投与した幼若ラットでは 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上、皮下投与した幼若および卵巣摘出ラットでは 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の EE 投与群で有意な重量増加が示され、さらに、ZM 189.154 (ZM) の抗エストロゲン作用についても確認された。更に、ビスフェノール A + testosterone propionate のハーシュバーガー試験に対する作用の検討、胎児期の子宮内位置の生後発育に及ぼす影響の検討を行う。

A. 研究目的

1. 化学物質のエストロゲン様作用を *in vivo* で鋭敏に検出する試験系の確立を目的として、幼若雌あるいは卵巣摘出ラットを用いて、エストロゲンのアゴニストまたはアンタゴニストを投与し、子宮増殖の反応性について検討する。
2. ハーシュバーガー試験法による 2 つの内分泌かく乱候補物質の複合作用を検討した際に示唆されたビスフェノール A による U 字型の反応曲線がみられるか否かを検討する。
3. 内分泌かく乱化学物質の標的が、胎児、新生児（未成熟期）、成人（性成熟期）および老年期に亘りその各々に対して、作用点、作用機序、影響が異なることが示唆されているが、中でも性未熟期の検討が立ち遅れている。そこで、ラットの生後 0～30 日までの間の内分泌機能を、その関係諸臓器の形態変化との関連性で把握することを目的とする。特に、ヒトと違い、多胎であるラットの、胎内雌雄配置の影響の有無を考慮することを、今回の検討に加える。

B. 研究方法

1. 試験は、A. 幼若ラット 3 日間経口 (Immature PO)、B. 幼若ラット 3 日間皮下投与 (Immature SC)、C. 卵巣摘出ラット皮下投与の 3 種で構成され、さらに C の試験については 3 日 (OVX 3-day) および 7 日間投与 (OVX 7-day) の 2 種を実施した。

動物は SD 系雌ラット (Crj:CD(SD) IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社) を購入して使用した。幼若ラットは、生後 14 日齢で購入し、検疫と馴化を兼ねて 5 日間にわたり予備飼育した後、20 日齢から投与を開始した。卵巣摘出ラットは、生後 5 週齢で購入し、検疫と馴化を兼ねて 12 日間にわたり予備飼育した後、卵巣を摘出し、摘出後 8 日目から投与を開始した。

全飼育期間を通じて、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50～65%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間 (7～19 時点灯) に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージ (220W × 270D × 190H mm、日本ケージ) に幼若ラットは 3 匹ずつ、卵巣摘出ラットは 1 匹ずつ収容し、固型飼料 CE-2 および水道水を自由摂取させて飼育した。

各群6匹からなる11群に分け、第1群は、無処置対照群、第2群は溶媒（ゴマ油）対照群とし、第3から9群には、それぞれ0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを投与した。第10群は0.1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ のZM、第11群は1.0 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ のZMを投与した後、試験Aのこれら両群には3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを、試験Bおよび試験Cのこれら両群には0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを投与した。

1日1回、連日投与し、ZMはEEを投与する直前に行った。なお、EEおよびZMは少量の95%エタノールに溶解した後、ゴマ油で希釈して所定の濃度に調製した。ただし、ZMの溶解は、60°C前後に加温して行った。

全例について、飼育期間中毎日一般状態の観察を行ったほか、投与開始日、投与期間中毎日および解剖日に体重を測定した。最終投与24時間後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、卵巣、子宮および膣を摘出した。卵巣および膣を切除して子宮重量(Wet weight)を測定した後、子宮壁の一部を切開して子宮内液を除去し、再度重量(Blotted weight)を測定した。

2. Bisphenol A+Testosterone Propionateのハーシュバーガー試験系に対する作用の検討

6週齢のCrj:CDラットを日本チャールスリバー社より入手し、精巣摘出後、7週齢で試験を開始する。実験は1群6匹の7群で実施する。Bisphenol AおよびTestosterone Propionateともに試験開始日より毎日1回14日間皮下投与する。投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、bisphenol A、Testosterone Propionateの順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1群（対照群、0、0.5）、第2群（12.5、0.5）、第3群（17.5、0.5）、第4群（25、0.5）、第5群（35、0.5）、第6群（50、0.5）、第7群（70、0.5）および第8群（100、0.5）。最終投与翌日に、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、肝臓、精巣上体、精囊、凝固腺および前立腺を測定する。副生殖器については病理組織学的検査を実施する。

3. 新生児期の内分泌機能を中心とした発達生理に対するラット胎児の子宮内位置の影響分娩直前の妊娠ラットより、胎内配置を記録

しつつ帝王切開し、仮親に育てさせ、生後0~30日の間、経時的に血中ホルモン値および諸臓器（内分泌臓器を中心に）の重量および形態学的検討を行う（免疫染色を含む）。動物の飼育ならびに解剖については、食薬センターで実施し、血中ホルモンの測定について動物繁殖研究所にて実施する。

C. 研究結果

上記2、3の研究課題については、OECDとの対応が決まらず、一時見合わせていたため、現在実施しているところであり、まだ結果が出ていない。今回は、研究課題1について報告する。

1. 体重(Fig. 1)

解剖日体重は、幼若ラットでは溶媒対照群との間に差はなかったが、卵巣摘出ラットでは、3日間投与試験ではEE 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群で有意に低下し、7日間投与試験ではEE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で有意に低下した。

子宮重量(Fig. 2)

Blotted weightについては、経口投与した幼若ラットではEE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で、皮下投与した幼若ラットではそれよりも低いEE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で溶媒対照群より有意な増加が認められた。皮下投与した卵巣摘出ラットでも、3日間投与試験では幼若ラット皮下投与試験と同様にEE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で有意な増加が認められ、7日間投与ではさらに低いEE 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群にも有意差がみられた。

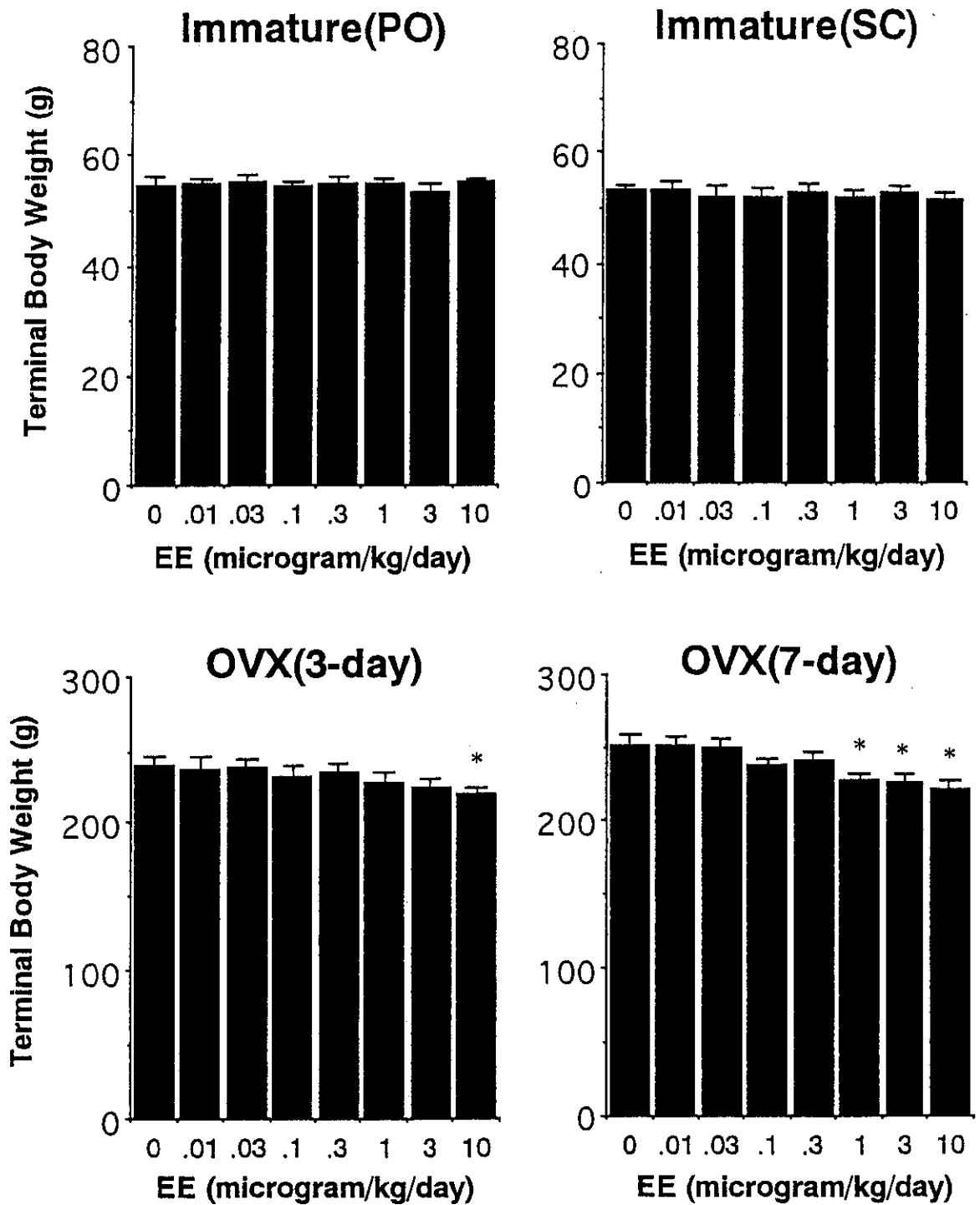
Wet weightでもほぼ同様の結果がみられたが、3日間投与した卵巣摘出ラットでは、Blotted weightよりも高い1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上で有意差を示した。

これらの結果からTable 1に示すED50値が推定された。Blotted weight (Absolute)については、幼若ラット皮下投与の値(0.57 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)は、卵巣摘出皮下3日間投与(0.48 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)あるいは7日間投与(0.31 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)の値とほぼ同様であるが、幼若ラット経口投与の値(1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)はそれの約3倍であった。

Wet weight でのED50 値は、いずれの試験においても Blotted weight より高い値を示した。

ZM の作用(Fig. 3)

ZM で前処置したEE 投与群では、ZM を投与しない同用量のEE 群と比較すると、ZM 0.1 および 1.0 mg/kg/day 投与群では、子宮重量(Blotted weight)は低下し、幼若ラット経口投与試験では ZM 1.0 mg/kg/day 群で、他の試験ではいずれの ZM 投与群にも有意な低下がみられた。また、幼若ラット皮下投与および卵巣摘出ラット皮下投与試験では、ZM 1.0 mg/kg/day 投与群の子宮重量は、溶媒対照群とほぼ同程度の値を示した。



*p<0.05 (Williams test)

Fig. 1 Terminal body weight in uterotrophic screening assay

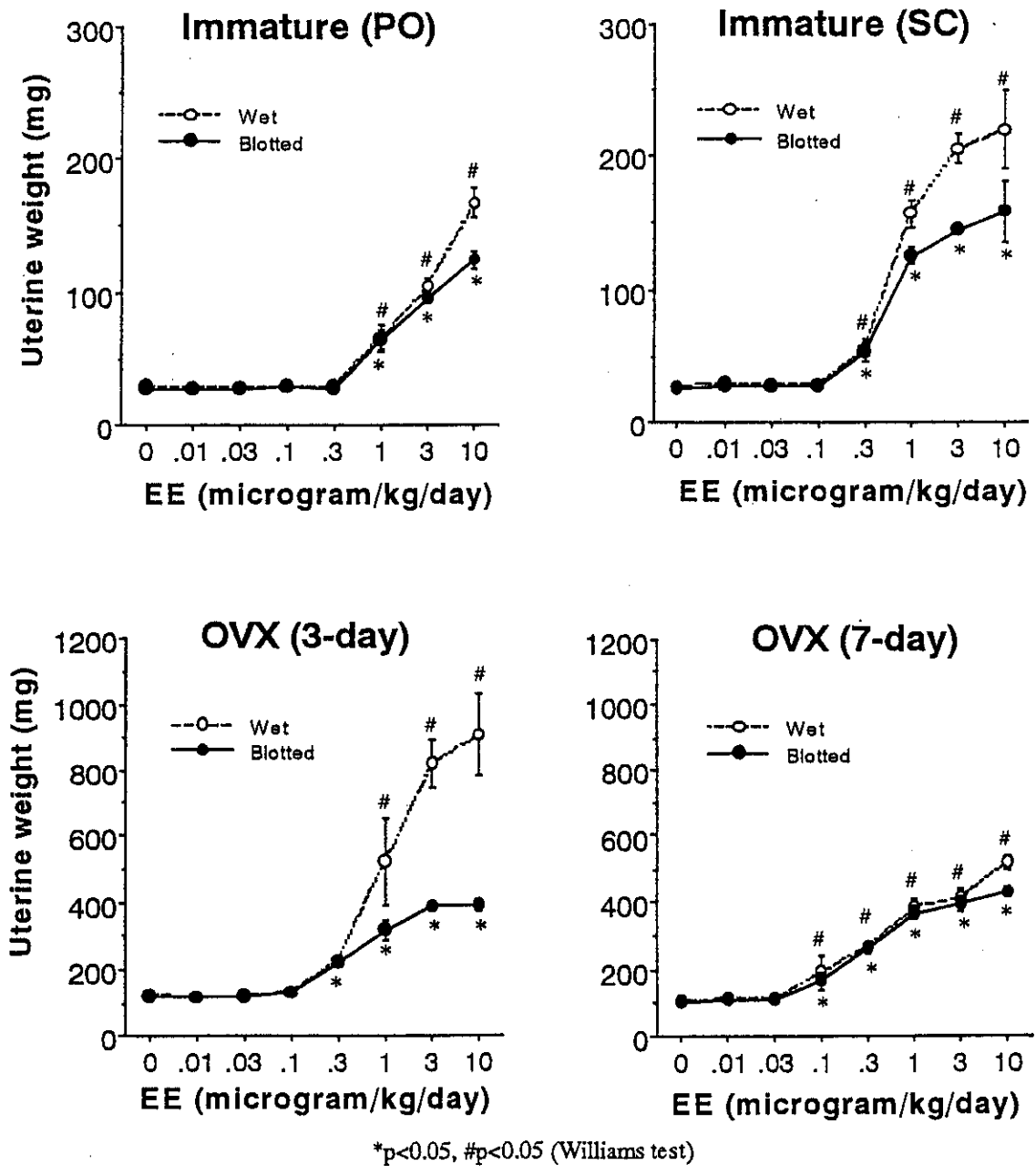


Fig. 2 Uterine weight in uterotrophic screening assay

Table 1 **Summary of ED₅₀ (µg/kg/day)**

	Uterine weight			
	Wet		Blotted	
	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Immature (PO)	3.81	3.24	1.75	1.6
Immature (SC)	0.70	0.69	0.57	0.58
OVX (3-day)	1.00	1.01	0.48	0.52
OVX (7-day)	0.57	0.67	0.31	0.35