

11. 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 白井智之

名古屋市立大学 医学部 第一病理学教室

研究要旨：ラット肝中期発がん性試験法を用いて、内分泌攪乱化学物質の発がんプロモーション作用の有無を検討している。本年度は Nonylphenol によるラットの肝発がんプロモーション作用の有無を用量依存性に検討した結果、nonylphenol はそのプロモーション作用を示さないことが明らかとなった。

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、多くの内分泌攪乱化学物質が含まれていると懸念されている。また、これら内分泌攪乱化学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、これらの発がん性ならびに発がんプロモーション作用のリスクを科学的に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物質のリスク評価のためには、比較的短期間で、信頼性の高い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検索系に適していると考えられる。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討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が可能であり、低用量でも評価が可能であるなど、内分泌攪乱化学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のにこの試験法は適していると考えられる。前年度

までの研究で、内在する性ホルモンによる肝の前がん病変発生におよぼす影響をこの中期発がん性試験法を応用して検討した結果、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ことを明らかにした。本年度は、内分泌攪乱作用が懸念されている Nonylphenol による影響をその用量依存性を含め、本試験法により検討した。

B. 研究方法

実験方法を図 1 に示す。6 週齢の F344 雄ラットを用い、diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg) を腹腔内に単回 *i.p.* 投与し、その 2 週間後より被験物質として、4-Nonylphenol (NP) を 2000, 250, 25 および 0 ppm の濃度で基礎飼料中に混じて経口投与した。投与濃度は NP の毒性データをもとに決定した。実験第 3 週目に肝の 2/3 を部分切除し、肝の増殖、再生を刺激した。なお、DEN の投与は行わず、溶媒である生食を投与し、NP 2000 ppm を投与する群も設けた。実験は 8 週間で終了し、剖検時、肝を摘出、ホルマリン固定し、

発生した肝の前がん病変である glutathione S-transferase (GST-P)陽性細胞巣を指標病変として、画像処理装置を用いて定量的に解析した。そして、その単位面積当りの発生個数および面積を算出し、各群間での比較検討を行った。また、剖検時に、各群5匹ずつ採血し血中のテストステロンを測定した。臓器重量として肝、腎臓の重量測定のほか、前立腺、精巣、精巣上体、肛門挙筋の重量を測定し、さらに精子の数、運動率、形態学的な異常の割合を検討した。

C. 研究結果

実験期間中、DEN-NP(2000 ppm)の群で体重の増加抑制が見られ、実験終了時同群の体重はDEN-Control群より有意に減少していた(表1)。肝重量はNP(2000 ppm)投与群、すなわちDEN-NP(2000 ppm)群およびSaline-NP(2000 ppm)群で統計学的に有意な増加が見られ、同群で逆に前立腺重量、肛門挙筋の重量の有意な減少を認めた(表2)。血中のtestosterone値を表3に示すが、いずれの群も統計学的に有意差は見られなかった。精子の数、運動率、形態学的異常を表4に示す。DEN-NP(25 ppm)群で精子数が減少傾向を示したものの、その他の群では有意差は見られず、用量相関性はなかった。また、表4に精子生成過程のstagingを示した。そのStagingはstage I-VI, stage VII-VIII, stage IX-XI, stage XII-X14の4つの時期に分類してその割合で示した。その結果、各群に差はみられず、NPによる精子形成過程に影響はないものと考えられた。

肝の前がん病変であるGST-P陽性細胞巣の肝の単位面積当りの数及び面積の結果を表6に示す。DEN-NP(25 ppm)群でGST-P陽性細胞巣の数が統計学的に有意に減少を示したが、その他の群では有意差はなかった。また、GST-P陽性細胞巣の面積に群間の差はみられなかった。

D. 考察

ラット肝中期発がん性試験法を用いて、NPの発がん性ならびにそのプロモーション作用の有無を検討した。その結果、GST-P陽性細胞巣の数が、NP低用量群である25 ppm群で対照群と比較して有意な減少が見られたものの、高用量群である250, 2000 ppm群では影響は見られなかった。従って、NPは肝発がんに対して低用量での抑制の可能性はあるものの、プロモーション作用は無いものと考えられた。また、NPの内分泌攪乱作用に関しては最高用量の2000 ppm群で肛門挙筋および前立腺重量の減少がみられたものの血中のtestosteroneに変化はみられず、また、精子形成過程での影響は見られなかった。また、25, 250 ppm群ではこれらの変化はみられず、NPは250 ppm以下ではこれらへの影響を示さないことが明らかとなった。

E. 結論

ラット肝中期発がん性試験法を用いて、内分泌攪乱化学物質の発がんプロモーション作用の有無を検討している。本年度はNonylphenolによるラ

ットの肝発がんプロモーション作用の有無を検討した結果、nonylphenolにはそのプロモーション作用が無いことを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Cui, L., Takahashi, S., Tada, M., Kato, K., Yamada, Y., Kohri, K., Shirai, T. : Immunohistochemical detection of carcinogen-DNA adducts in normal human prostate tissues transplanted into the subcutis of athymic nude mice: Results with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) and relation to cytochrome P450s and N-acetyltransferase activity., *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 52-58, 2000.
2. Yaono, M., Tamano, S., Mori, T., Kato, K., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T. : Lobe specific effects of testosterone and estrogen on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced rat prostate carcinogenesis., *Cancer Lett.*, 150: 33-40, 2000.
3. Ito, N., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T. : Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats., *Mutation Res.*, 462: 209-217, 2000.
4. Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., Imaida, K. : Experimental prostate carcinogenesis rodent models., *Mutation Res.*, 462: 219-226, 2000.
5. Hirose, M., Yamaguchi, T., Cui, L., Kimoto, N., Futakuchi, M., Kono, T., Nishibe, S., Shirai, T. : Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female

Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats., *Cancer Lett.*, 155: 79-88, 2000.

6. Kato, K., Takahashi, S., Cui, L., Toda, T., Suzuki, S., Futakuchi, M., Sugiura, S., Shirai, T. : Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis., *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 786-791, 2000.

7. Takahashi, S., Ikeda, Y., Orita, S.-i., Sakakibara, M., Kimoto, N., Suzuki, S., Imaida, K., Shirai, T. : Enhancing effects of 2-amino-4,5-diphenylthiazole-induced polycystic kidneys on renal carcinogenesis in rats treated with dimethylnitrosamine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 167: 12-17, 2000.

8. Kawabe, M., Cui, L., Kimoto, N., Sano, M., Hirose, M., Shirai, T. : Modifying effects of propolis on MeIQx promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two-stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. *Nutrition and Cancer*, 37: 179-186, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1: Final body, liver and kidney weights of F344 male rats treated with nonylphenol (NP) in a rat medium-term liver carcinogenesis bioassay for carcinogens

Group	Treatment	level(ppm)	No. of Rats	Body (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
1	DEN+NP	0	15	250.3 ± 12.1	5.91 ± 0.39	1.74 ± 0.12
2	DEN+NP	25	15	246.9 ± 16.3	5.81 ± 0.45	1.67 ± 0.10
3	DEN+NP	250	14	230.7 ± 66.9	5.97 ± 0.55	1.74 ± 0.11
4	DEN+NP	2000	14	211.7 ± 59.9*	6.32 ± 0.37**	1.77 ± 0.09
5	Saline+NP	2000	11	211.7 ± 71.0	6.60 ± 0.27**	1.89 ± 0.13**

NP : Nonylphenol

*, **: $P < 0.01$, $P < 0.05$ vs DEN-NP(0 ppm) group

Table 2: Weights of testes, epididymis, muscle of lebatori-ani, prostate and seminal vesicle of F344 male rats treated with nonylphenol (NP) in a rat medium-term liver carcinogenesis bioassay for carcinogens

Group	Treatment	level(ppm)	No. of Rats	Testes (g)	Epididymis (g)	LA muscle (g)	Prostate	S. vesicle
1	DEN+NP	0	15	2.89 ± 0.16	0.82 ± 0.06	0.74 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.58 ± 0.08
2	DEN+NP	25	15	2.84 ± 0.14	0.80 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.58 ± 0.10
3	DEN+NP	250	15	2.93 ± 0.11	0.82 ± 0.04	0.72 ± 0.08	0.33 ± 0.05	0.57 ± 0.07
4	DEN+NP	2000	15	2.85 ± 0.09	0.74 ± 0.04	0.63 ± 0.05**	0.25 ± 0.04**	0.45 ± 0.07**
5	DEN+NP	2000	15	2.85 ± 0.09	0.78 ± 0.05	0.69 ± 0.05	0.29 ± 0.05**	0.49 ± 0.08**

LA muscle: Lebator ani muscle; NP : Nonylphenol

** : $P < 0.01$ vs DEN-NP(0 ppm) group

Table 3: Serum testosterone levels of F344 male rats treated with nonylphenol (NP) in a rat medium-term liver carcinogenesis bioassay for carcinogens

Group	Treatment	level(ppm)	No. of Rats	Testosterone (ng/ml)
1	DEN+NP	0	5	1.36 ± 2.09
2	DEN+NP	25	5	0.84 ± 0.70
3	DEN+NP	250	5	1.46 ± 1.15
4	DEN+NP	2000	5	1.34 ± 1.12

NP : Nonylphenol

Table 4: Sperm number, movement ability and morphological abnormality of rats treated with nonylphenol (NP) in a rat medium-term liver carcinogenesis bioassay for carcinogens

Group	Treatment level(ppm)	No. of Rats	Number	Movement ability(%)	Morphological abnormality(%)
1	DEN+NP 0	15	1.29 ± 0.29	80.2 ± 3.1	0.30 ± 0.67
2	DEN+NP 25	15	0.94 ± 0.15*	82.3 ± 3.3	0.60 ± 0.55
3	DEN+NP 250	14	1.28 ± 0.65	78.1 ± 8.8	0.90 ± 0.22
4	DEN+NP 2000	14	0.90 ± 0.32	85.9 ± 3.7*	0.80 ± 0.45

NP : Nonylphenol

*: $P < 0.05$ vs DEN-NP(0 ppm) group

Table 5: Staging of spermatogenesis of male F344 rat treated with nonylphenol in a rat medium-term liver carcinogenesis bioassay for carcinogens

Group	Treatment	level(ppm)	No. of Rats	Stage(I-VI)	Stage(VII-VIII)	Stage(IX-XI)	Stage(XII-XIV)
1	DEN+NP	0	15	44.6 ± 5.7	27.9 ± 4.2	7.7 ± 2.9	19.8 ± 3.9
2	DEN+NP	25	15	47.1 ± 6.6	25.6 ± 3.6	7.4 ± 4.0	19.8 ± 5.1
3	DEN+NP	250	14	44.5 ± 3.5	28.7 ± 5.2	8.0 ± 2.9	18.9 ± 4.2
4	DEN+NP	2000	14	44.7 ± 4.4	26.6 ± 5.2	8.6 ± 2.5	20.0 ± 4.0

NP : Nonylphenol

Table 6: Quantitative data for GST-P-positive liver cell foci of rats treated with nonylphenol (NP) in a rat medium-term liver carcinogenesis bioassay for carcinogens

Group	Treatment	level(ppm)	No. of Rats	No./cm ²	Area (mm ² /cm ²)
1	DEN+NP	0	15	6.10 ± 2.35	0.44 ± 0.27
2	DEN+NP	25	15	4.75 ± 1.64**	0.31 ± 0.13
3	DEN+NP	250	14	5.76 ± 1.47	0.44 ± 0.13
4	DEN+NP	2000	14	6.09 ± 2.54	0.41 ± 0.16
5	Saline+NP	2000	11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

NP : Nonylphenol

**; $P < 0.01$ vs DEN-NP(0 ppm) group

12. 甲状腺腫瘍に対する内分泌かく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： 内分泌かく乱物質の甲状腺発癌修飾作用を検討するため、卵巢摘出雌F344ラットにdiisopropanolnitrosamine (DHPN)を単回皮下投与し、その後基礎食 (BD)、0.5mg estradiol benzoate (EB) 皮下埋植、1000ppm methoxychlor (MXC) 混餌投与、ないし10000ppm のbisphenol A (BPA)混餌投与を20週間行った。さらに、これらの各群の半数のラットには200ppm sulfadimethoxine (SDM)を20週間併用飲水投与した。その結果、EB+SDM群においてのみ腫瘍が発生し、血清中TSH値も有意に上昇した。従って、強いエストロゲン作用を持つ物質のみ甲状腺発癌促進作用を有する可能性が示唆された。

研究目的

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)の持続的分泌促進が大きく関与している。しかし、強いエストロゲン作用を有する合成 estradiol benzoate (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 (ER)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考察されている (Ito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。

昨年度までに、DHPN で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 sulfadimethoxine

(SDM)でプロモーション処置をして増殖性病変を誘発させたラット甲状腺二段階発癌モデルを用いて、強いエストロゲン作用を有する EB の皮下埋植、弱いエストロゲン作用を有する EDC の methoxychlor (MXC)、bisphenol A (BPA)を混餌投与し、それらの甲状腺発癌作用を検討したところ、EB で弱いながらも増殖性病変の誘発増強が認められたが、他の EDC にはなんら促進作用は認められなかった。

そこで今年度は、SDM を検体投与期間中に併用投与するさらに鋭敏なラット甲状腺二段階発癌モデルを用いて、EB の甲状腺増殖性病変誘発の確認と、MXC および BPA の甲状腺増殖性病変に対する修飾作用をさらに検討した。

B. 研究方法

雌F344ラットの卵巢を摘出(OVX)し、その1週後に2000mg/kg DHPNを一回皮下投与してイニシエーション処置とした。動物を1群24匹からなる4群に分け、DHPN処置1週間から、

対照群に基礎食(BD)を与え、EB群には0.5mg EB含有ペレットを4週毎に皮下埋植した。MXC群には1000ppmのMXCを、BPA群には10000ppmのBPAを20週間混餌投与した。同時に、各群の半数のラットには、200ppm SDMを20週間併用飲水投与した。投与終了後に生存動物全例を殺処分し、甲状腺の組織学的観察と甲状腺関連ホルモン値の測定を行い、EDCの甲状腺増殖性病変に対する修飾作用の有無を比較検討した。

C. 研究結果

SDMの併用投与に関わらず、検体を投与することにより、実験開始時より体重増加抑制傾向が認められ、最終体重も有意な低値を示した(表1)。相対臓器重量では、下垂体および子宮において、SDMの投与に関わらず検体投与全群で有意な増加を示した。甲状腺においては、BPA+SDM群を除く群で有意な増加を示した。肝臓では、BPA単独群を除く群で有意な増加がみられた(表1)。病理組織学的には、EB+SDM群のみに甲状腺濾胞上皮の嚢胞状過形成、腺腫および腺癌が発生し、過形成および腺腫は、BD+SDM群に比し有意に増加した。その他の群では、甲状腺に何ら増殖性病変の発生は認められなかった(表2)。血清エストラジオール値はEBの投与により、SDM投与に関わらず有意に増加した。血中T3値はMXCの投与により、血中T4値はEBおよびMXCの投与により、それぞれSDM投与に関わらず有意に減少した。さらに血中T4値は、SDM投与により非投与に比し有意に減少した(表3)。

D. 考察

以上の成績により、今回の実験条

件下では、強いエストロゲン作用を有するEBを皮下埋植し、さらにSDMを飲水で併用投与することにより甲状腺増殖性病変の誘発が増強されることが明確となった。その増強メカニズムとしては、EBがSDMと共に甲状腺内でのT4合成を阻害し、ネガティブ・フィードバックが作動することにより下垂体前葉からのTSH分泌が増加し、甲状腺を持続的に刺激した結果甲状腺腫瘍が誘発されたものと考えられた。さらにEBがERを介して甲状腺濾胞細胞を直接刺激する可能性も考えられることから、これらのメカニズムが複合的に作用してはじめて甲状腺増殖性病変の誘発が増強されるものと推察された。一方、弱いエストロゲン作用を有するMXCおよびBPAでは増殖性病変の発生は認められなかった。MXCでは、SDMの投与に関わらず血中T3およびT4値が有意に減少した。これは、MXC投与により肝でのiodothyronine 5'-monodeiodinaseが阻害されるという報告(Arch Biochem Biophys 322: 390-394, 1995)があることから、この酵素阻害が血中T3およびT4値の減少に関与する可能性が考えられるが、今回の実験条件下では下垂体前葉からのTSH分泌は増強しなかった。BPAにおいても、特記する変動は認められなかった。

以上の結果から、強いエストロゲン作用を有するEBには甲状腺増殖性病変の誘発を増強する作用が認められるが、弱いエストロゲン作用を有するMXCやBPAでは増殖性病変を誘発する可能性はないことが強く示唆された。

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高木久宜、三森国敏、小野寺博志、
森安眞津子、那須昌弘、安原加壽雄、
田村啓、広瀬雅雄：ラット甲状腺腫
瘍に対するEstradiol benzoateないし内
分泌攪乱物質とSulfadimethoxineの併
用投与による修飾作用。第17回日本
毒性病理学会総会。2001年1月

Table 1 Final body and relative organ weights in rats treated with EDCs after DHPN initiation and SDM amplification

SDM	Final body weights (g)	Thyroid weights (mg/100g)	Pituitary weights (mg/100g)	Liver weights (g/100g)	Uterus weights (g/100g)
BD					
(-)	228.9 ± 14.6 ^{a)}	5.3 ± 0.8	5.4 ± 1.1	2.09 ± 0.15	0.03 ± 0.008
(+)	228.9 ± 11.7	10.1 ± 1.4	7.2 ± 1.0	2.05 ± 0.12	0.04 ± 0.019
EB					
(-)	162.6 ± 5.68 ^{***}	10.1 ± 1.7 ^{***}	130.5 ± 40.8 ^{***}	3.68 ± 0.19 ^{***}	0.76 ± 0.232 ^{***}
(+)	155.9 ± 9.5 ^{***}	41.2 ± 11.4 ^{***}	74.9 ± 21.0 ^{***}	3.58 ± 0.17 ^{***}	0.71 ± 0.240 ^{***}
MXC					
(-)	167.6 ± 4.9 ^{***}	7.7 ± 0.9 ^{***}	7.7 ± 0.9 ^{***}	2.37 ± 0.05 ^{***}	0.11 ± 0.021 ^{***}
(+)	165.7 ± 8.9 ^{***}	12.6 ± 1.7 ^{***}	8.0 ± 0.9 ^{***}	2.23 ± 0.10 ^{***}	0.12 ± 0.029 ^{***}
BPA					
(-)	176.1 ± 8.1 ^{***}	10.9 ± 2.5	6.7 ± 0.7 ^{***}	2.24 ± 0.12 ^{***}	0.05 ± 0.013 [*]
(+)	174.0 ± 11.7 ^{***}	6.3 ± 1.1 [*]	6.3 ± 0.5 [*]	2.16 ± 0.09	0.07 ± 0.042 ^{**}

a) : Mean ± S.D.

^{*}, ^{**}, ^{***}: Significantly different from the corresponding DHPN+BD groups at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Table 2 Incidence and multiplicity of thyroid proliferative lesions in rats treated with EDCs after DHPN initiation and SDM amplification

SDM	Hyperplasia		Adenoma		Carcinoma	
	Incidence	Multiplicity	Incidence	Multiplicity	Incidence	Multiplicity
BD						
(-)	0/12	0	0/12	0	0/12	0
(+)	0/12	0	0/12	0	0/12	0
EB						
(-)	0/12	0	0/12	0	0/12	0
(+)	11/11 [*]	14.09 ± 5.22 ^{a)***}	9/11 [*]	2.45 ± 2.07 ^{***}	2/11	0.18 ± 0.40
MXC						
(-)	0/12	0	0/12	0	0/12	0
(+)	0/12	0	0/12	0	0/12	0
BPA						
(-)	0/12	0	0/12	0	0/12	0
(+)	0/12	0	0/12	0	0/12	0

a) : Mean ± S.D.

^{*}, ^{**}, ^{***}: Significantly different from the corresponding DHPN+BD groups at $p < 0.05$.

Table 3 Changes of serum levels of estradiol, T3, T4 and TSH in rats treated with EDCs after DHPN initiation and SDM amplification

	SDM	Estradiol (pg/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (mg/dL)	TSH (ng/dL)
BD	(-)	6.13 ± 3.84 ^{a)}	99.77 ± 20.12	2.50 ± 0.32	6.65 ± 1.56
	(+)	2.52 ± 0.06 ^{##}	103.08 ± 13.21	2.32 ± 0.42	6.32 ± 0.77
EB	(-)	146.98 ± 57.88 ^{***}	126.89 ± 11.39 ^{***}	1.58 ± 0.12 ^{***}	7.02 ± 1.39
	(+)	97.41 ± 30.35 ^{***}	93.16 ± 20.33	1.00 ± 0 ^{***,##}	14.19 ± 3.63 ^{***,##}
MXC	(-)	2.60 ± 0.17 ^{**}	83.46 ± 13.33 [*]	2.16 ± 0.23 ^{**}	6.84 ± 1.71
	(+)	2.50 ± 0	77.17 ± 13.25 ^{***}	1.45 ± 0.16 ^{***,##}	6.93 ± 1.03
BPA	(-)	9.10 ± 19.91	100.59 ± 14.73	3.36 ± 0.29 ^{***}	6.58 ± 1.71
	(+)	4.23 ± 5.91	94.26 ± 12.13	2.35 ± 0.36 ^{###}	6.93 ± 0.73

a) : Mean ± S.D.

*, **, ***, Significantly different from the corresponding DHPN+BD groups at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

##, ###. Significantly different from the corresponding SDM (-) groups at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

(2) 〈OECD 対応等試験法開発部門〉

13. 子宮肥大試験法および Hershberger 試験法の適用に関する研究
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
(財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨： OECD バリデーションプロトコールに従い、ノニルフェノール(NP)を幼若あるいは卵巣摘出ラットに投与した。その結果、NPによる子宮肥大作用が用量依存性に認められ、3日間経口投与幼若ラットでは 75 mg/kg/day 以上、3日間皮下投与した幼若あるいは卵巣摘出ラットでは 80 mg/kg/day 以上の投与群で子宮重量の有意な増加が見られ、7日間皮下投与卵巣摘出ラットでは 35 mg/kg/day 投与群でも比体重値が有意な高値を示した。また、精巣摘出ラットにテストステロンプロピオネイト(TP)を皮下投与し、ハーシュバーガー試験法の有効性を検討し、ビスフェノール A (BPA)のハーシュバーガー試験を実施した。

1. 子宮肥大試験

A. 研究目的

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、弱いエストロゲン作用を示すと考えられている NP を投与し、子宮増殖の反応性について検討する。

B. 研究方法

試験は、A. 幼若ラット 3日間経口投与 (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 C. 3日(OVX 3-day)および C'. 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 13 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、19 日齢から投与を開始した。卵巣摘出ラットは、6 週齢で摘出後 2

～3 日で購入し、検疫と馴化を兼ねて 7 日間にわたり予備飼育した後、8 週齢から投与を開始した。

全飼育期間を通じて、温度 22～25℃、湿度 50～65%、換気回数約 15 回/時間、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) 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 匹よりなる 8 群に分け、第 1 群は溶媒 (コーン油) 対照群とし、第 2 から 6 群には、経口投与試験はそれぞれ 15, 75, 125, 250, 350 mg/kg/day、皮下投与試験はそれぞれ 5, 15, 35, 80, 100 mg/kg/day の NP を投与した。また、第 7 および 8 群は陽性対照群としてエチニルエストラジオール(EE)を試験 A はそれぞれ 1, 3 μ g/kg/day、試験 B, C および C' は 0.3, 1 μ g/kg/day を投与した。1 日 1 回、試験 A, B, C は 3 日間、試験 C' は 7 日間連日投与した。

全例について、毎日一般状態の観察および体重測定を実施した。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、子宮および腔を摘出した。卵巣および腔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。

C. 研究結果

体重

解剖日体重は、NP については経口投与した幼若ラット (試験 A) では溶媒対照群と比較して 350 mg/kg/day 投与群に有意な低下がみられたが、他の試験では有意な変化はなかった。一方、EE の 7 日間皮下投与 (試験 C') では 0.3 および 1 g/kg/day の両群で体重が有意に低下した。

子宮重量 (Fig. 1)

経口投与した幼若ラット (試験 A) では、wet weight および blotted weight とともに 75 mg/kg/day 以上の投与群で実重量および比体重値が有意に増加し、皮下投与した幼若ラット (試験 B) では、wet weight および blotted weight とともに 80 mg/kg/day 以上の投与群で実重量および比体重値が有意に増加した。皮下投与した卵巣摘出ラットについては、3 日間投与 (試験 C) では、wet weight および blotted weight とともに 80 mg/kg/day 以上の投与群で実重量および比体重値が有意に増加し、7 日間投与 (試験 C') では、wet weight および blotted weight とともに 80 mg/kg/day 以上の投与群で実重量が、35 mg/kg/day 以上の投与群で比体重値がいずれも有意に増加した。

EE については、試験 B の 0.3 g/kg/day 投与群の wet weight の比体重値、試験 C' の

7 日間 0.3 g/kg/day 投与群の wet weight の実重量および比体重値に有意差はみられなかったが、これらの群を含みいずれも重量は増加した。

2. テストステロンプロピオネートのハーシュバーガー試験

A. 研究目的

化学物質のアンドロゲン様作用を *in vivo* で短期に検出する試験系の確立を目的として、精巣摘出ラットに TP を皮下投与し、副生殖器の重量を測定して、ハーシュバーガー試験法の有効性について検討する。

B. 研究方法

動物は SD 系 5 週齢雄ラット (Crl:CD(SD) IGS, SPF、日本チャールス・リバー株式会社) を購入した。検疫と馴化を兼ねて 6 日間にわたり予備飼育した後、6 週齢で精巣を摘出し、7 日後の 7 週齢から投与を開始した。

全飼育期間を通じて、温度 22~25°C、湿度 50~65%、換気回数約 15 回/時間、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) に 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 匹よりなる 6 群に分け、第 1 群は溶媒 (コーン油) 対照群とし、第 2 から 6 群には、それぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/kg/day の TP を背部皮下に 10 日間投与した。

全例について、毎日一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行った。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、肉眼的観察後、前立腺腹葉、精囊および凝固腺、肛門挙筋

および球海綿体筋、亀頭、尿道球腺、腎臓、肝臓の重量を測定した。

C. 研究結果

体重および摂餌量

体重は 0.8 mg/kg/day 以上の投与群では投与第 6 日から、0.4 mg/kg/day 投与群では投与第 8 日から有意な高値がみられた。摂餌量は、いずれの TP 投与群でも有意な高値を示す日が認められた。

器官重量 (Fig. 2)

前立腺腹葉、肛門挙筋および球海綿体筋、亀頭では全ての TP 投与群で、精囊および凝固腺、尿道球腺は 0.2 mg/kg/day 以上の投与群で、いずれも実重量および比体重値が有意な増加を示した。腎臓、肝臓に有意な差はなかった。

3. ビスフェノール A のハーシュバーガー試験

A. 研究目的

ハーシュバーガー試験法による 2 種の内分泌かく乱作用の疑われる物質の複合作用を検討した際に示唆された、BPA による U 字型用量作用関係の有無を検証する。

B. 研究方法

動物は SD 系 5 週齢雄ラット (Crlj:CD(SD) IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社) を購入した。検疫と馴化を兼ねて 7 日間にわたり予備飼育した後、6 週齢で精巢を摘出し、7 日後の 7 週齢から投与を開始した。

全飼育期間を通じて、温度 22~25°C、湿

度 50~65%、換気回数約 15 回/時間、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) に 1 匹ずつ收容し、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 匹よりなる 7 群に分け、第 1 群は溶媒 (コーン油) 対照群として 0.5 mg/kg/day の TP のみを投与し、第 2 から 6 群には、同量の TP を投与後 15 分以内に、それぞれ 12.5, 17.5, 25, 35, 50, 70 mg/kg/day の BPA を背部皮下に 14 日間投与した。

全例について、毎日一般状態の観察および体重の測定を行った。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、肉眼的観察後、前立腺腹葉、精囊および凝固腺、肛門挙筋および球海綿体筋、亀頭、腎臓の重量を測定した。

C. 研究結果

体重

BPA 投与群では、対照群に比較して用量依存的に低下する傾向がみられたが、対照群との間に有意な差は認められなかった。

器官重量 (Fig. 3)

前立腺腹葉、精囊および凝固腺、肛門挙筋および球海綿体筋、亀頭の実重量および比体重値には、対照群と BPA 各投与群との間に有意差は認められなかった。腎臓については、BPA 70 mg/kg/day 投与群で比体重値が対照群より有意に増加した。

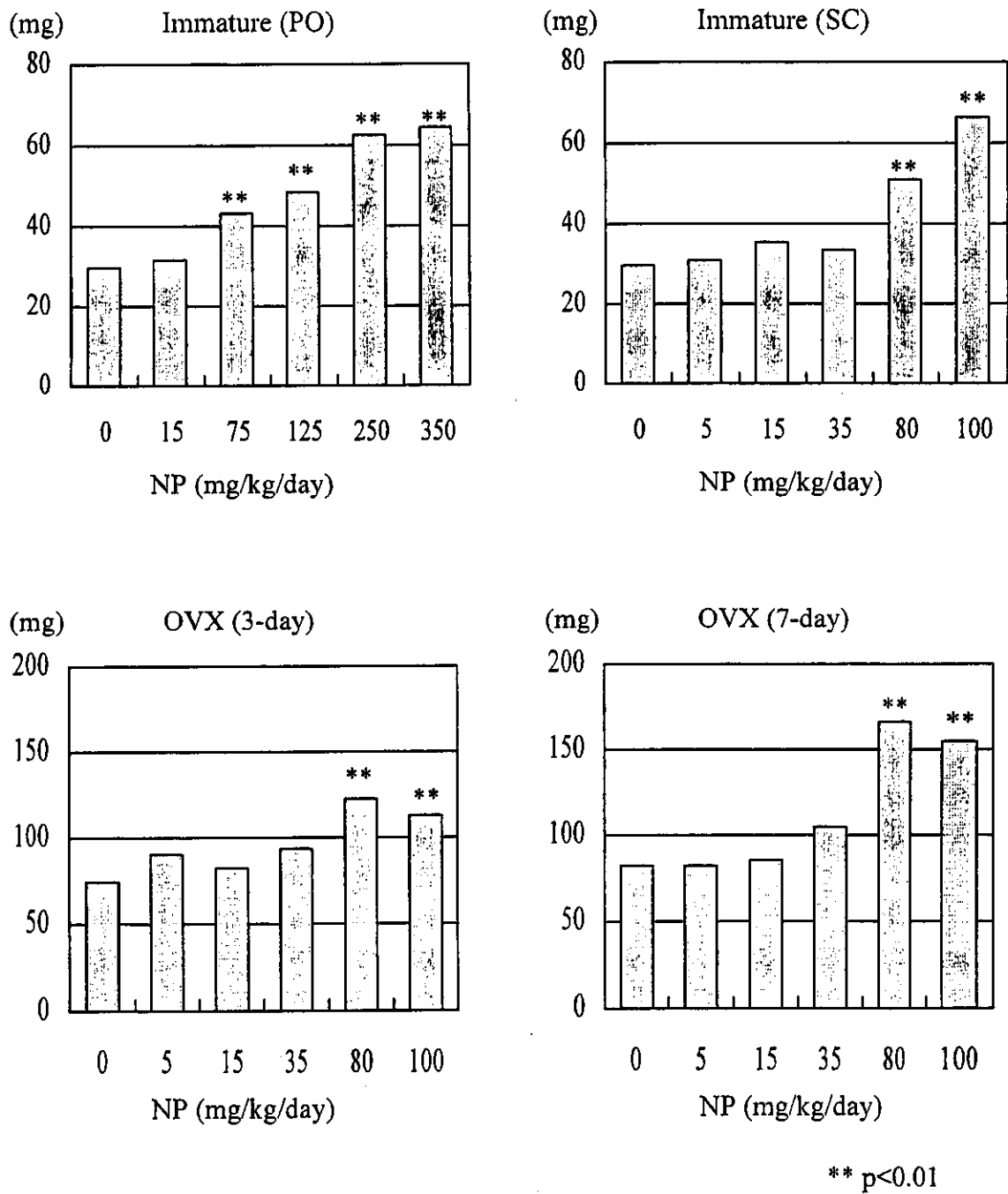


Fig. 1 Blotted uterine weight (mg) in uterotrophic assay of nonylphenol