

14 (その1) . 胎児の子宮内位置と生後の発育・分化との関連に関する研究

研究者 長尾 哲二、和田 和義
(財) 食品薬品安全センター秦野研究所
室長

研究要旨：マウスあるいはラットなどの実験動物における胎児の子宮内での位置が、生後の発育および分化に影響を及ぼすか否かを明らかにすることを目的とした。低濃度のエストラジオールを妊娠マウスに連続して暴露し、妊娠末期に帝王切開して胎児の子宮内位置により個体識別後、養母哺育して性成熟の時期が胎児期の子宮内位置の違いにより差がみられるか調べた。その結果、観察したいずれの指標にも差はみられなかつ

A. 研究目的

マウスあるいはラットなどの胎児の子宮内での位置（例：子宮内で両側が雄胎児である雄あるいは両側が雌胎児である雌）が、子宮内での両側胎児から分泌される性ホルモンの影響により生後の性成熟の時期、行動・機能などに差が生じるか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ICR 雌マウスの交配前 1 週間、交配期間を通じて交尾確認後妊娠 17 日（臍腺発見日＝妊娠 0 日）まで、コーン油あるいはエストロゲン (E_2) 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与した。飼料として PLD (phytoestrogen low diet, オリエンタル酵母工業株式会社) あるいは CE-2 (日本クレア) を自由に摂取させた。いずれの妊娠雌も妊娠 18 日に帝王切開して胎児を摘出した。その際、生殖突起肛門間距離 (AGD) および体重を各胎児について測定した。生存胎児は、原則として子宮内での着床位置が雄に挟まれた雄 (MMM:2M)、雌に挟まれた雄 (FMF:0M)、雌に挟まれた雌 (FFF:2F)、雄に挟まれた雌 (MFM:0F) の各タイプに該当するもののみを、無処置のマウスに養母哺育させた。着床位置が左右子宮角の両端部の胎児、隣接する着床位置に死亡胚が認められた胎児についても対象から除外した。性成熟の指標として雄では生後 30 日から包皮分離の時期、雌では生後 25 日から臍開口の時期を調べ、雌雄とも完成日に体重を測定した。さらに雌については臍開口日から性周期を観察した。10 週齢に剖検し、生殖器官（精巣、精巣上体、精囊、卵巣）の重量を測定した。測定した器官および前立腺は燐酸緩衝ホルマリンに固定し組織検査をした。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用しないしは頸椎脱臼法など苦痛

の少ない方法を用いるといった、秦野研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応をとった。

C. 研究結果

出生日における体重には雌雄とも群間に有意な差はみられず、 E_2 の影響もなかった。AGD については、PLD 摂取群では差はみられなかったが、CE-2 摂取群では E_2 投与の影響が雄出生児でみられた (Table 1)。雌の臍開口に時期および雄の包皮分離の時期には飼料、子宮内位置および E_2 投与の影響は確認できなかった (Table 2)。さらにさらに雌の性周期にも群間に差はみられなかった。生後 10 週での剖検時に測定した生殖器官の重量には飼料、子宮内位置および E_2 投与の影響はみられなかった (Table 3)。

D. 考察

先に実施した「Sprague-Dawley ラットを用いた子宮内位置による影響の実験」では、ラットの子宮内での着床位置による影響は、AGD、性成熟、性周期、行動および活動量、生殖器官の発達に関しては何ら変化はみられなかった。今回、マウスを用いて低用量の E_2 を投与して子宮内の着床位置による影響の有無を確認したが、ラット実験と同様に AGD、性成熟、性周期、生殖器官の発達に関しては影響は観察されなかった。これらのことから、マウスあるいはラットなどの胎児の子宮内での着床位置が、子宮内での両側胎児から分泌される性ホルモンの影響により生後の性成熟の時期に差が生じることはないかと判断される。したがって、内分泌かく乱化学物質の次世代への影響の有無を評価する際には、子宮内での胚の着床位置を考慮する必要はないと判断される。

E. 結論

ラットを用いた実験および今回のマウ

スにおける E₂ の低用量投与実験から、胎児の子宮内での着床位置が、子宮内での両側胎児から分泌される性ホルモンの影響により生後の性成熟に差違が生じることはない結論する。

F. 研究発表

1. 論文発表 (2000-2002)

Nagao T., Ohta R., Marumo H., Shindo T., Yoshimura S., Ono H. Effects of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod. Toxicol.*, **14**: 513-532 (2000).

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Ono H. Effects of prenatal and postnatal exposure to styrene dimers and trimers on reproductive function in rats. *Reprod. Toxicol.*, **14**: 403-415 (2000).

Nagao T., Fujikawa K. Two-generation approach to evaluate the reproductive effects of the environmental estrogens, butyl benzyl phthalate and nonylphenol. *Cong. Anom.*, **40**: S121-S127 (2000).

長尾哲二 内分泌攪乱物質の次世代の発生・生殖への影響 治療学 **34**: 29-33 (2000).

Nagao T., Saito Y., Usumi K., Nakagomi M., Yoshimura S., Ono H. Disruption of the reproductive system and reproductive function by administration of nonylphenol to newborn rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **19**: 284-296 (2000).

Sato M., Wada K., Marumo H., Nagao T., Imai K., Ono H. Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, **56**: 156-164 (2000).

Nagao T., Saito Y., Yoshimura S. Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C. *Teratology* **61**: 248-261 (2000).

Nagao T., Yoshimura S. Oral administration of clomiphene to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **21**: 213-221 (2001).

Nakagomi M., Suzuki E., Usumi K., Saito Y., Yoshimura S., Nagao T., Ono H. Effects of

endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **21**: 453-462 (2001).

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usumi K., Ono H. Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to *p*-octylphenol. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 683-692 (2001).

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usumi K., Ono H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 399-411 (2001).

Nagao T., Wada K., Marumo H., Yoshimura S., Ono H. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 293-315 (2001).

Kuwagata M., Saito Y., Usumi K., Ono H., Nagao T. Disruption of brain development in male rats exposed prenatally to 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Cong. Anom.*, **41**: 312-320 (2002).

Kuwagata M., Yoshimura S., Nagao T. Reproductive effects of early neonatal exposure to genistein in Wistar rats. *Cong. Anom.*, **41**: 338-339 (2002).

Nagao T., Saito Y., Usumi K., Yoshimura S., Ono H. Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile or embryonic stage. *Reprod. Toxicol.*, in press.

Nagao T., Yoshimura S., Totsuka Y., Wakabayashi K. Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline. *Human Exp. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表 (2000-2002)

桑形麻樹子、松本亜紀、長尾哲二、赤堀文昭、小野 宏：BrdU を胎生期に曝露した雄ラットの行動薬理学的検討 第 27 回日本トキシコロジー学会 (横浜) 2000.

桑形麻樹子、斉藤義明、白見憲司、松本亜紀、長尾哲二：胎生期に BrdU 曝露した雄ラットの行動異常—行動薬理学的検討— 第 40 回日本先天異常学会 (鳥根)

2000.

桑形麻樹子、渡辺千朗、白見憲司、齊藤義明、長尾哲二：胎生期 BrdU 曝露による雄出生児の生殖障害 - 脳の形態変化 - 第 41 回日本先天異常学会（横浜）2001.

Kuwagata M., Muneoka K., Nagao T., Ono H., Takigawa M.: Behavior and neurochemical evidence of the dopaminergic and serotonergic dysregulation in male rats exposed to 5-bromo-2'-deoxyuridine in utero: A possible model of hyperactivity disorder. 2001年国際薬理学会広島会議(広島) 2001.

Kuwagata M., Muneoka K., Takigawa M., Nagao T., Ono H.: Dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in adulthood in prenatal 5-bromo- 2'-deoxyuridine. 14th Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Sydney, 2002.

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

Table 1 Anogenital distance of pups on postnatal day 0

Diet	PLD						CE-2					
	Corn oil			E2			Corn oil			E2		
	OM/OF	2M/2F	No. of pups	OM/OF	2M/2F	No. of pups	OM/OF	2M/2F	No. of pups	OM/OF	2M/2F	No. of pups
Type of position in uterus												
Male												
No. of pups	11	1	1	2	10	10	10	5	9	3	3	3
No. of litters	5	1	1	2	6	7	7	4	6	2	2	2
Body weight on PND 0 (g)	1.41 ± 0.08 ^a	1.31	1.31	1.47	1.41 ± 0.13	1.44 ± 0.07	1.44 ± 0.07	1.39 ± 0.16	1.36 ± 0.06	1.33	1.33	1.33
AGD (mm)	1.92 ± 0.07	1.77	1.77	1.90	1.99 ± 0.14	1.89 ± 0.15	1.89 ± 0.15	1.95 ± 0.19	2.03 ± 0.09	2.07	2.07	2.07
AGD / body weight	1.36 ± 0.09	1.35	1.35	1.29	1.42 ± 0.15	1.32 ± 0.11	1.32 ± 0.11	1.41 ± 0.20	1.50 ± 0.12 *	1.57	1.57	1.57
AGD / $\sqrt[3]{\text{Body weight}}$	1.71 ± 0.07	1.62	1.62	1.67	1.78 ± 0.12	1.68 ± 0.13	1.68 ± 0.13	1.75 ± 0.17	1.83 ± 0.10 *	1.89	1.89	1.89
Female												
No. of pups	7	1	1	8	17	12	12	4	8	8	8	8
No. of litters	4	1	1	5	6	5	5	3	5	3	3	3
Body weight on PND 0 (g)	1.33 ± 0.05	1.31	1.31	1.31 ± 0.18	1.37 ± 0.07	1.37 ± 0.04	1.37 ± 0.04	1.38 ± 0.07	1.36 ± 0.11	1.28 ± 0.03	1.28 ± 0.03	1.28 ± 0.03
AGD (mm)	0.95 ± 0.02	0.99	0.99	0.95 ± 0.14	1.01 ± 0.07	1.02 ± 0.11	1.02 ± 0.11	1.08 ± 0.11	1.02 ± 0.10	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.04
AGD / body weight	0.71 ± 0.04	0.76	0.76	0.73 ± 0.10	0.74 ± 0.09	0.74 ± 0.07	0.74 ± 0.07	0.78 ± 0.12	0.75 ± 0.07	0.76 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.76 ± 0.04
AGD / $\sqrt[3]{\text{Body weight}}$	0.86 ± 0.03	0.91	0.91	0.87 ± 0.11	0.92 ± 0.09	0.92 ± 0.09	0.92 ± 0.09	0.97 ± 0.11	0.92 ± 0.08	0.90 ± 0.04	0.90 ± 0.04	0.90 ± 0.04

a. Mean ± S.D.

*: significant difference from CE-2+corn oil OM type, p<0.05 (t-test)

Table 2 Sexual maturation of offspring

Diet	PLD				CE-2			
	Corn oil		E2		Corn oil		E2	
Group	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F
Type of position in uterus								
Male								
No. of pups	11	1	2	10	10	5	9	3
No. of litters	5	1	2	6	7	4	6	2
PND of preputial separation	27.7 ± 1.5 ^a	26.0	27.0	27.5 ± 1.0	26.6 ± 0.7	26.8 ± 1.0	27.1 ± 0.8	28.0
Body weight (g)	30.3 ± 1.9	27.6	32.1	29.9 ± 1.0	26.4 ± 2.3	26.7 ± 2.6	28.1 ± 2.7	26.7
Female								
No. of pups	7	1	8	17	12	4	8	8
No. of litters	4	1	5	6	5	3	5	3
PND of vaginal opening	25.4 ± 2.6	23.7	23.3 ± 1.0	24.3 ± 1.1	26.1 ± 1.2	25.7 ± 1.2	24.9 ± 1.6	23.3 ± 1.1
Body weight (g)	21.5 ± 0.9	21.6	21.5 ± 1.6	21.6 ± 2.4	21.7 ± 1.2	20.9 ± 1.9	20.8 ± 1.1	19.2 ± 1.9

a, Mean ± S.D.

*: significant difference from CE-2+corn oil 2F type, p<0.05 (t-test)

Table 3 Organ weight of offspring at 10 weeks of age

Diet	PLD						CE-2					
	Corn oil			E2			Corn oil			E2		
	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F	0M/0F	2M/2F
Male												
No. of pups	11	1	2	10	10	5	9	3				
No. of litters	5	1	2	6	7	4	6	2				
Terminal body weight (g)	51.5 ± 4.2 ^a	57.1	61.2	53.3 ± 5.2	46.4 ± 5.7	44.2 ± 7.4	44.3 ± 5.3	40.1				
Testes (mg)	257.9 ± 28.4 ^b	276.5	259.7	260.2 ± 25.0	230.7 ± 41.5	243.3 ± 42.8	256.5 ± 24.4	281.8				
	506.3 ± 76.3 ^c	484.2	424.6	496.0 ± 91.6	497.5 ± 72.2	551.6 ± 65.2	588.4 ± 109.4	703.0				
Epididymides (mg)	89.5 ± 8.7	92.2	98.6	97.0 ± 7.1	89.9 ± 10.5	89.7 ± 4.4	95.8 ± 11.9	96.7				
	175.1 ± 21.4	161.5	161.2	182.9 ± 9.0	195.7 ± 29.8	206.2 ± 29.1	218.0 ± 31.5	242.7				
Seminal vesicle (mg)	413.9 ± 66.0	296.7	489.5	454.8 ± 51.1	372.0 ± 47.4	49.7	439.4 ± 62.0 *	411.2				
	812.8 ± 136.9	519.6	800.3	855.4 ± 82.0	807.3 ± 107.8	866.8 ± 182.4	994.9 ± 124.9 *	1025.8				
Female												
No. of pups	7	1	8	17	12	4	8	8				
No. of litters	4	1	5	6	5	3	5	3				
Terminal body weight (g)	36.5 ± 2.7	45.5	40.9 ± 2.7	41.3 ± 5.3	34.9 ± 1.0	33.2 ± 2.6	33.0 ± 3.1 ^{##}	38.4 ± 3.7				
Ovary (mg)	12.5 ± 3.3	17.4	15.8 ± 3.6	13.6 ± 3.6	16.7 ± 4.1	14.5 ± 4.1	13.4 ± 3.9	13.9 ± 1.5				
	34.4 ± 7.7	38.7	38.5 ± 8.6	33.1 ± 7.5	48.1 ± 10.6	44.5 ± 15.2	39.9 ± 8.3	36.1 ± 3.1				

a. Mean ± S.D.

b. Absolute weight

c. Relative weight (mg per 100g body weight)

*:significant difference from CE-2+corn oil 0M type, p<0.05 (t-test)

##:significant difference from PLD+corn oil 0F type, p<0.01 (t-test)

14 (その2) . 内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究

長尾 哲二 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所
室長

研究要旨：胎生期あるいは新生児期の内分泌かく乱化学物質暴露後のラット視床下部に位置する性的二型核 SDN-POA や前腹側脳室周囲核 AVPVN-POA をはじめとする神経核の形成に及ぼす影響を早期に検索する目的で、視床下部におけるアポトーシスならびにその誘発に関連する遺伝子の発現、エストロゲン受容体発現ならびに熱ショック蛋白質 HSP レベルなどを指標として検討し、視床下部神経核の形態学的観察による影響評価法に替わる方法の可能性を探る。本年度は新生児期暴露後の視床下部における HSP 90 レベルを western blotting により、さらにアポトーシス関連遺伝子の発現を予備的に検討した。

A. 研究目的

胎生期あるいは新生児期の内分泌かく乱化学物質暴露後のラット視床下部に位置する性的二型核 SDN-POA や前腹側脳室周囲核 AVPVN-POA をはじめとする神経核の形成に及ぼす影響を細胞生物学的に検索し、その変化が後の生殖影響と如何に関連しているかを考察することを目的とする。

B. 研究方法

Sprague-Dawley 系ラットの雌雄を終夜同居して交尾した雌ラットを自然分娩させ、新生児を得た。新生児は生後1日(出生日の翌日)から連続して5日間、ジエチルスチルベストロール(DES)の0、1、10、50あるいは100 µg/kg 体重を背部皮下に投与した。最終投与24時間後に、各腹の雄出生児の半数を屠殺して脳を摘出し、視床を含む部位を0.1M 磷酸緩衝10%ホルマリン液にて固定した。これらの固定標本について、bcl2 あるいは Fas の免疫染色をおこなった。残りの雄出生児も同様に屠殺し脳の視床を含む部位を液体窒素にて凍結してウエスタンブロッティングによる検討まで-80°C で保存した。まず未変性条件下でマイクロ2次元電気泳動(M2D-PAGE)分析した。次いで免疫化学的染色法によるHSP 90の同定を行った。PVDF膜へのタンパク質の転写は、ブロッティング装置(ホライズプロット:アトー社製)を用いた。転写用の緩衝液は0.025 M トリス-0.19 M グリシンを用い、80mA で60分間行い転写膜を1%スキムミルク・1%BSA-PBSで1時間室温にてブロッキングした。ブロッキング後の免疫化学的染色は、転写膜に1次抗血清(monoclonal anti-HSP 90)で37°C、

体(抗マウスイムノグロブリンウサギポリクローナル抗体)37°C、30分間で感作させ、0.05% Tween 20-PBSで5分間3回の洗浄後、DAB 基質キットで発色させた。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、秦野研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応をとった。

C. 研究結果

DES 投与群(10 µg/kg)と対照群の新生児について免疫化学的染色法によるHSP 90の同定を行った結果、HSP 90は等電点5.2付近ならびに分子量20万前後にHSP 90のタンパク質として同定された。肉眼的観察からDES投与群に明らかなHSP 90を認めたことから、対照群よりDES投与群において多く産生されることが示唆された。アポトーシス関連遺伝子の発現に関しては現在観察中である。

D. 考察

ラット新生児へのDES投与により視床下部にHSP 90レベルの上昇がみられた。ラットの視床下部には性行動の統御に関連する神経核SDN-POAおよびAVPVN-POAが位置することから、HSP 90レベルの上昇はこれら神経核構築過程におけるニューロンの伸長障害あるいは細胞死と何らかの関連があるものと思われる。

E. 結論

視床下部における HSP 90 レベルの上昇が神経核 SDN-POA および AVPVN-POA の構造変化と何らかの関連があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 (2000-2002)

Nagao T., Ohta R., Marumo H., Shindo T., Yoshimura S., Ono H. Effects of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod. Toxicol.*, **14**: 513-532 (2000).

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Ono H. Effects of prenatal and postnatal exposure to styrene dimers and trimers on reproductive function in rats. *Reprod. Toxicol.*, **14**: 403-415 (2000).

Nagao T., Fujikawa K. Two-generation approach to evaluate the reproductive effects of the environmental estrogens, butyl benzyl phthalate and nonylphenol. *Cong. Anom.*, **40**: S121-S127 (2000).

長尾哲二 内分泌攪乱物質の次世代の発生・生殖への影響 治療学 **34**: 29-33 (2000).

Nagao T., Saito Y., Usumi K., Nakagomi M., Yoshimura S., Ono H. Disruption of the reproductive system and reproductive function by administration of nonylphenol to newborn rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **19**: 284-296 (2000).

Sato M., Wada K., Marumo H., Nagao T., Imai K., Ono H. Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, **56**: 156-164 (2000).

Nagao T., Saito Y., Yoshimura S. Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C. *Teratology* **61**: 248-261 (2000).

Nagao T., Yoshimura S. Oral administration of clomiphene to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **21**: 213-221 (2001).

Nakagomi M., Suzuki E., Usumi K., Saito Y., Yoshimura S., Nagao T., Ono H. Effects of endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **21**: 453-462 (2001).

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usumi K., Ono H. Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to *p*-octylphenol. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 683-692 (2001).

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usumi K., Ono H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 399-411 (2001).

Nagao T., Wada K., Marumo H., Yoshimura S., Ono H. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod. Toxicol.*, **15**: 293-315 (2001).

Kuwagata M., Saito Y., Usumi K., Ono H., Nagao T. Disruption of brain development in male rats exposed prenatally to 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Cong. Anom.*, **41**: 312-320 (2002).

Kuwagata M., Yoshimura S., Nagao T. Reproductive effects of early neonatal exposure to genistein in Wistar rats. *Cong. Anom.*, **41**: 338-339 (2002).

Nagao T., Saito Y., Usumi K., Yoshimura S., Ono H. Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile or embryonic stage. *Reprod. Toxicol.*, in press.

Nagao T., Yoshimura S., Totsuka Y., Wakabayashi K. Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline. *Human Exp. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表 (2000-2002)

桑形麻樹子、松本亜紀、長尾哲二、赤堀文昭、小野 宏：BrdU を胎生期に曝露した雄ラットの行動薬理学的検討 第 27 回日本トキシコロジー学会 (横浜) 2000.

桑形麻樹子、斎藤義明、臼見憲司、松本亜紀、長尾哲二：胎生期に BrdU 曝露し

た雄ラットの行動異常—行動薬理学的検討— 第 40 回日本先天異常学会 (島根) 2000.

小野 宏、長尾哲二、小島幸一：繁殖影響、体内動態等に関する調査研究 平成 10 年度厚生科学研究生活安全総合研究成果報告会 (東京) 2000.

長尾哲二、齊藤義明、吉村慎介：マイトマイシン C の着床前投与による奇形の発現機序に関する一考察 第 40 回日本先天異常学会 (島根) 2000.

長尾哲二：性腺障害を介さない生殖毒性の発現機構 第 27 回日本トキシコロジー学会ワークショップ (横浜) 2000

Nagao T.: Reproductive and Developmental Effects of Dioxins and Endocrine Disrupters. Two-generation Study to Evaluate the Effects of Butyl Benzyl Phthalate or Nonylphenol on Reproduction in Rats. 6th Scientific Meeting of the International Federation of Teratology Society. Satellite Symposium in Hiroshima. (Hiroshima) 2000.

中込まどか、鈴木恵真子、齊藤義明、臼見憲司、吉村慎介、長尾哲二：内分泌攪乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響 第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学会 (横浜) 2000.

Shibuya T., Kashima T., Saito Y., Nagao T., Imai K., Ono H.: Induction of mutation and apoptosis in mouse primordial germ cells by ENU. 39th Annual meeting, Society of Toxicology, U.S.A. 2000. Toxicologist 54 (1): 117.

Nagao T.: Post-implantation embryo malformations. 2nd International Meeting on Male Mediated Developmental Toxicity. Montreal, Canada, 2001.

桑形麻樹子、渡辺千朗、臼見憲司、齊藤義明、長尾哲二：胎生期 BrdU 曝露による雄出生児の生殖障害—脳の形態変化— 第 41 回日本先天異常学会 (横浜) 2001.

Kuwagata M., Muneoka K., Nagao T., Ono H., Takigawa M.: Behavior and neurochemical evidence of the dopaminergic and serotonergic dysregulation in male rats exposed to 5-bromo-2'-deoxyuridine in utero: A possible model of hyperactivity disorder. 2001 年国際薬理学会広島会議 (広島) 2001.

Kuwagata M., Muneoka K., Takigawa M., Nagao T., Ono H.: Dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in adulthood in prenatal 5-bromo- 2'-deoxyuridine. 14th Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Sydney, 2002.

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

15. 内分泌かく乱化学物質の発がんプロモーション作用の検討

研究者 白井 智之

名古屋市立大学医学部 第一病理学教室 教授

研究要旨

ラット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 bisphenol A 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、bisphenol A 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

環境中に存在するホルモン様活性を有する各種物質の中には、発がん性や発がん促進作用があること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。また nonylphenol にも本試験系で肝発がん性が陰性である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 bisphenol A 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、bisphenol A (BPA) 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 BPA 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、BPA 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（絶対重量）として肝、腎臓の重量測定のほか、前立腺、精巣、精巣上体、肛門拳筋の重量を測定し、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- BPA(2000 ppm)の群および BPA(2000 ppm)の両群でそれぞれの対照群に比して体重の増加抑制が見られた(図 2)。摂餌量では同様に BPA(2000 ppm)の投与群で高値を示す時期があった。BPA の摂取量は投与濃度に比例していた。臓器重量では BPA(2000 ppm)投与群、すなわち DEN-BPA(2000 ppm)群および Saline-BPA(2000 ppm)群で肝、腎、前立腺、精巣上体、精囊および肛門拳筋に統計学的に有意な低値が見られた。DEN-BPA25ppm でも一部の臓器に有意な低値あるいは低値傾向がみられた(表 1- 1, 2, 3)。血中の testosterone 値を表 2 に示が、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 3 と 4 に示すが、いずれにも有意な変化は観察されなかった。また、表 5 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- XIV 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、BPA 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 処置群間で比較したが、数および面積で群間の差は認めなかった。BPA 単独投与群では、GST-P 陽性細胞巣（直径 0.2mm 以上）は発生しなかった。

D. 考察

ラット肝中期発がん性試験法を用いて、BPA 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 陽性細胞巣の数と面積いずれも群間に差はなく、従って、BPA は肝発がんに対してプロモーション作用は無いものと考えられた。また、BPA の内分泌攪乱作用に関しては最高用量の 2000 ppm 群で肛門拳筋および前立腺重量の減少がみられたが、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。従って肛門拳筋および前立腺重量の減少は内分泌かく乱作用によるものではなく、単なる毒性によるものとかんがえるのが妥当であろう。

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 Bisphenol A 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、高用量でも bisphenol A にはそのプロモーション作用が無いことを、また雄性生殖器にもあきらかな変化を示さないことを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

Ito, N., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats., *Mutation Res.*, 462: 209-217, 2000.

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.

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.

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

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.

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.

Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Takahashi, S., Ikeda, Y., Imaida, K., Shirai, T.: Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent. *Cancer Res.*, 61: 4693-4700, 2001.

Mori, T., Imaida, K., Tamano, S., Sano, M., Takahashi, S., Asamoto, M., Takeshita, M., Ueda, H., Shirai, T.: Beef tallow, but not perilla or corn oil, promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Jpn. J. Cancer Res.*: 1026-1033, 2001.

白井智之: 内分泌攪乱化学物質.
Cancer Frontier, 2: 69-72, 2000.

白井智之 内分泌かく乱物質研究の最前線. In: (社)日本化学会 (ed.) 季刊 化学総説, Vol. 50, pp. 15-31. 東京: 学会出版センター2001.

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

8 週

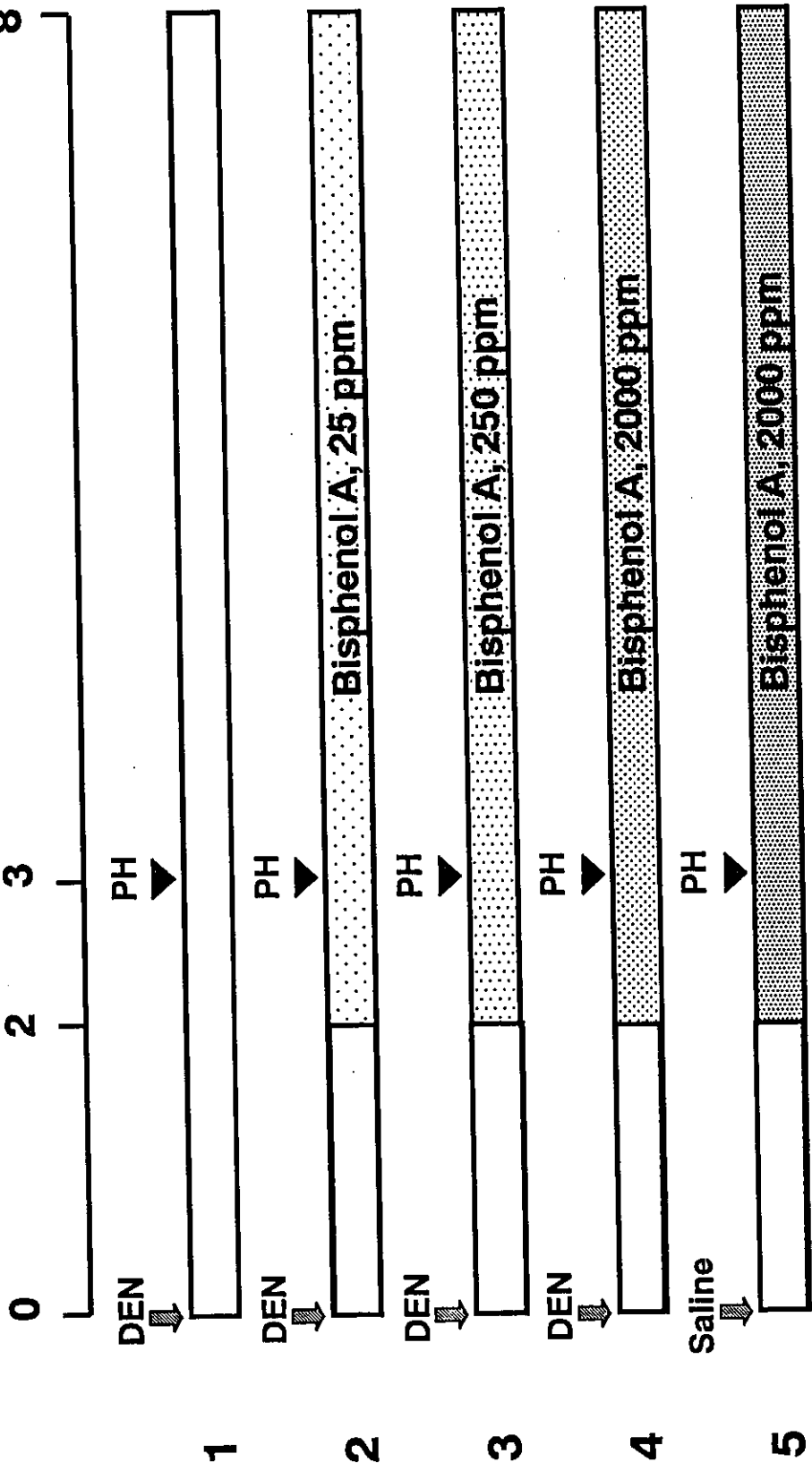


図1

Animals: F344 male rats, 6-week-old
DEN: Diethylnitrosamine, 200 mg/kg b.w., i.p.
PH: 2/3 Partial hepatectomy
Bisphenol A : 0, 25, 250, 2000 ppm in diet

Experimental Protocol

図2
体重曲線

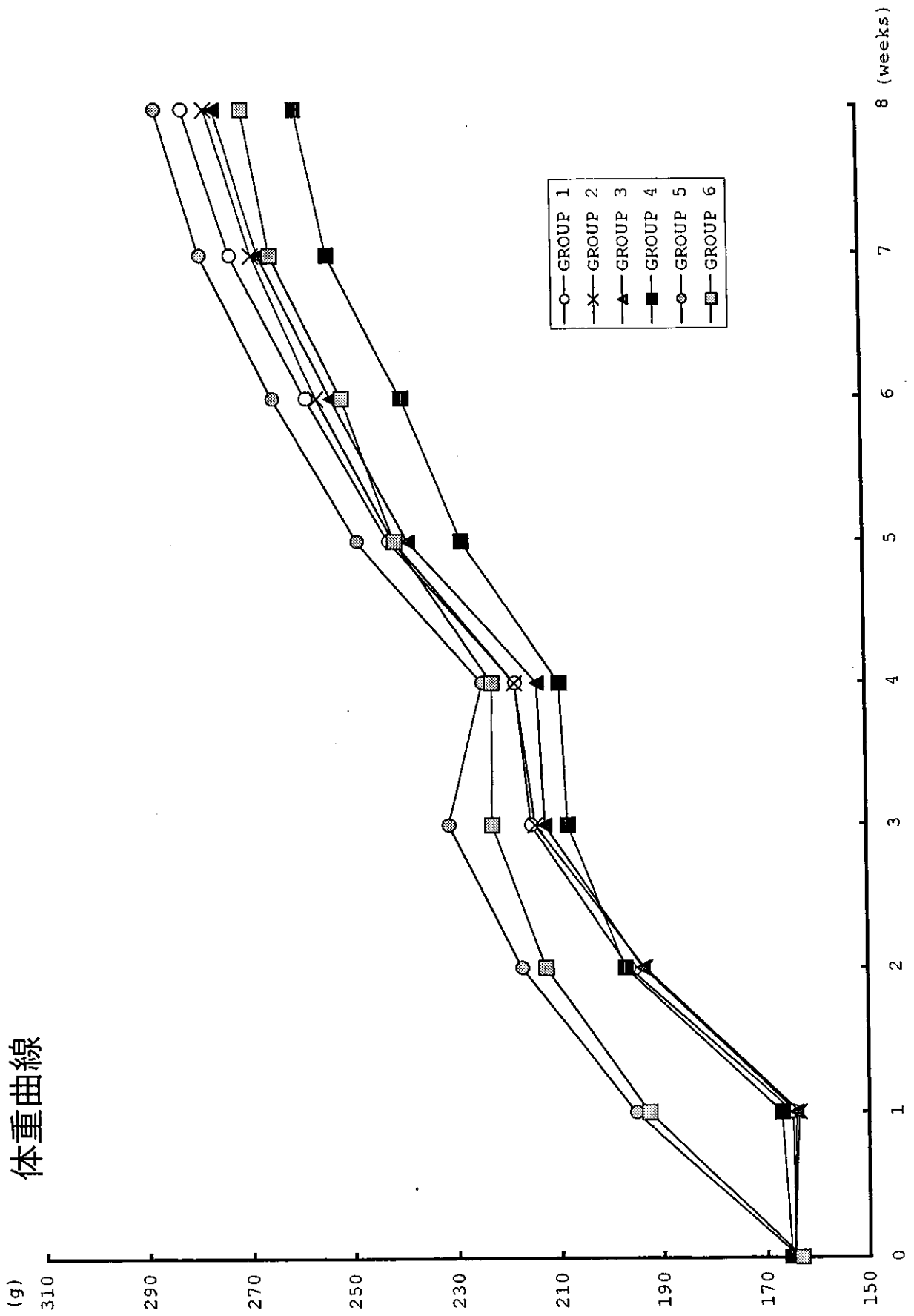


表1-1 最終体重および平均臓器重量

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (ppm)	NO. OF EXAMINED	FINAL B.W.	Liver	Kidneys	Testes
	DEN	TEST CHEMICAL						
1	+	CONTROL	0	14	270.9 ± 8.3	6.43 ± 0.4078	1.80 ± 0.0815	2.82 ± 0.1170
2	+	BISPHENOLA	25	15	266.0 ± 8.9	6.13 ± 0.3964	1.77 ± 0.0769	2.84 ± 0.0791
3	+	BISPHENOLA	250	15	263.9 ± 11.2	6.23 ± 0.4419	1.81 ± 0.0732	2.80 ± 0.0993
4	+	BISPHENOLA	2000	15	245.9 ± 7.2 **	5.72 ± 0.3992 **	1.73 ± 0.0839 *	2.75 ± 0.1592
5	-	CONTROL	0	8	275.6 ± 6.9	6.36 ± 0.3339	1.84 ± 0.0886	2.88 ± 0.0894
6	-	BISPHENOLA	2000	9	258.8 ± 7.3 ##	6.13 ± 0.2554	1.78 ± 0.0531	2.91 ± 0.0918

* **, ## : Significantly different from control group (group 1 vs 2-4) at P<0.05, 0.01, respectively.

: Significantly different from control group (group 5 vs 6) at P<0.01.

(MEAN ± S.D.)

表1-2 最終体重および平均臓器重量

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (ppm)	NO. OF EXAMINED	Prostate		
	DEN	TEST CHEMICAL			(Ventral)	(Dorsolateral)	(Anterior)
1	+	CONTROL	0	14	0.398 ± 0.0439	0.273 ± 0.0251	0.140 ± 0.0188
2	+	BISPHENOLA	25	15	0.369 ± 0.0818	0.250 ± 0.0222 *	0.144 ± 0.0207
3	+	BISPHENOLA	250	15	0.364 ± 0.0685	0.262 ± 0.0271	0.144 ± 0.0383
4	+	BISPHENOLA	2000	15	0.302 ± 0.0394 **	0.224 ± 0.0173 **	0.112 ± 0.0121 **
5	-	CONTROL	0	8	0.398 ± 0.0444	0.304 ± 0.0306	0.155 ± 0.0186
6	-	BISPHENOLA	2000	9	0.322 ± 0.0556 ##	0.2577 ± 0.0291 ##	0.134 ± 0.0246 #

*, **: Significantly different from control group(group 1 vs 2-4) at P<0.05, 0.01, respectively.

#, ##: Significantly different from control group(group 5 vs 6) at P<0.05, 0.01, respectively.

表1-3 最終体重および平均臓器重量

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (ppm)	NO. OF EXAMINED	Epididymides	Seminal vesicles	LA-BC muscle
	DEN	TEST CHEMICAL					
1	+	CONTROL	0	14	0.819 ± 0.0537	0.595 ± 0.0681	0.7848 ± 0.0551
2	+	BISPHENOL A	25	15	0.802 ± 0.0312	0.575 ± 0.0744	0.7500 ± 0.0421 *
3	+	BISPHENOL A	250	15	0.800 ± 0.0360	0.566 ± 0.0753	0.7606 ± 0.0429
4	+	BISPHENOL A	2000	15	0.777 ± 0.0460 *	0.467 ± 0.0808 **	0.6310 ± 0.0359 **
5	-	CONTROL	0	8	0.820 ± 0.0307	0.594 ± 0.0893	0.8275 ± 0.0292
6	-	BISPHENOL A	2000	9	0.808 ± 0.0246	0.541 ± 0.0767	0.7032 ± 0.0560 ##

* , ** : Significantly different from control group(group 1 vs 2-4) at P<0.05, 0.01, respectively.

: Significantly different from control group(group 5 vs 6) at P<0.01.

表2 血清中のテストステロン濃度

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (ppm)	NO. OF EXAMINED	SERUM TESTOSTELON (ng/ml)
	DEN	TEST CHEMICAL			
1	+	CONTROL	0	5	2.26 ± 2.19
2	+	BISPHENOLA	25	5	3.36 ± 3.69
3	+	BISPHENOLA	250	5	2.62 ± 1.34
4	+	BISPHENOLA	2000	5	2.24 ± 1.19
5	-	CONTROL	0	5	1.54 ± 1.80
6	-	BISPHENOLA	2000	5	1.26 ± 1.55

(MEAN ± S.D.)

表3 精巢および精巢上体内の精子数

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (ppm)	NO. OF EXAMINED	NUMBER ($\times 10^7$ /ml)	
	DEN	TEST CHEMICAL			TESTIS	EPIDIDYMISS
1	+	CONTROL	0	5	1.396 \pm	0.254 \pm 2.054 \pm 0.489
2	+	BISPHENOL A	25	5	1.706 \pm	0.202 \pm 2.042 \pm 0.286
3	+	BISPHENOL A	250	5	1.752 \pm	0.445 \pm 1.958 \pm 0.396
4	+	BISPHENOL A	2000	5	1.420 \pm	0.234 \pm 2.134 \pm 0.371
5	-	CONTROL	0	5	1.632 \pm	0.354 \pm 1.946 \pm 0.823
6	-	BISPHENOL A	2000	5	1.374 \pm	0.394 \pm 2.270 \pm 0.613

(MEAN \pm S.D.)