

法について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 幼若ラットに対する誘起排卵モデルの構築

排卵誘起のための eCG 投与日齢を検討するために、(財)食品薬品安全センターにおいて、哺育下にある Sprague-Dawley (SD)系 [Crj:CD (SD) IGS、SPF]雌ラット (日本チャールスリバー、厚木飼育センター生産) 30 匹 (3 腹) を購入した。21 日齢に離乳して体重別無作為層化法により 10 匹ずつ 3 群に分け、5 匹ずつ金網床金属ケージに収容して固形飼料 (CE-2、日本クレア) および水道水を自由摂取させた。これらの動物は、24、25 あるいは 26 日齢に eCG 5 IU を 1 回皮下投与して毎日体重を測定し、eCG 投与 3 日後に剖検した。剖検では、排卵数および黄体数を数え、卵巣および子宮重量を測定した。また、2) で測定する肝臓および胸腺の重量も測定した。

得られた成績は、5%を有意水準として分散分析を用いて解析した。

### 2) 既報の追試

国立医薬品食品衛生研究所において、1) と同系統の幼若雌ラット 50 匹 (5 腹) を 1) と同様の日齢で購入し、離乳日に 6 匹ずつ 8 群に分けて群毎に飼育した。その後毎日体重を測定し、既報より 1 日遅い、24 日齢に TCDD を経口投与した。TCDD の用量は、既報において、排卵数が 50% 以下に抑制された量を上回る 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を高用量に設定し、以下公比 4 で除して、4 あるいは 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の 3 用量を設定した。

8 群に分けた動物のうち、1~3 群には TCDD の媒体であるコーン油を、4 あるいは 5 群には 1 あるいは 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を、6~8 群には 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  をそれぞれ投与した。これらのうち 1 および 6 群は TCDD 投与後 6 時間に剖検した。残りの動物は全て TCDD 投与後 24 時間の 25 日齢に eCG5IU を 1) と同様に投与し、2 および 7 群は eCG 投与後 48 時間に、その他の群は eCG 投与後 72 時間に剖検した。

剖検では、卵巣および子宮重量を測定するとともに、ダイオキシン類の標的器官である肝臓および胸腺重量も測定した。また、ダイオキシン関連遺伝子および卵胞発育関連遺伝子の定量に用いるために、肝臓、卵巣および子宮を採取した。さらに、TCDD 含量を測定するために、血漿、肝臓および胸腺を採取した。eCG 投与後 72 時間における剖検では、卵管を採取し、実体顕微鏡下で、黄体数、および排卵数を数えた。得られた成績は、5%を有意水準として分散分析を用いて解析した。分散分析で有意差が認められた項目については、Dunnet の多重比較検定あるいは Student's t-test を用いてコーン油投与群との有意差を検定した。また、回帰分析を行って用量反応性の有無について解析した。

### 3) ダイオキシン関連遺伝子および卵胞発育関連遺伝子の定量方法の確立

麻布大学の協力を得て、Real-Time RT-PCR 装置を用いた mRNA 定量システムの確立を計った。ダイオキシン類関連遺伝子としては、ダイオキシン類の受容体である aryl hydrocarbon receptor (AhR)、AhR

の共役分子である aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT)、AhR の代表的な標的遺伝子であるチトクローム p450 (CYP)1A1 について、また、卵胞発育関連遺伝子としては、健康な卵胞の顆粒膜細胞で産生される inhibin の  $\alpha$ 、 $\beta$ A、 $\beta$ B の各サブユニット、ならびに *in vitro* において TCDD によって顆粒膜細胞における合成が抑制されると報告されている luteinizing hormone receptor (LHR) および follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) について、市販ソフトウェア Primer Express v. 1.5 (Applied Biosystems) を用いて、プライマーおよび TaqMan 標識プローブの塩基配列を選定し、入手した。さらに、ダイオキシン類関連遺伝子については、ハウスキーピング遺伝子 glycer aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する相対発現量を定量する系を立ち上げるために、無処置ラットあるいは CYP1A1 誘導ラットの肝臓から、TriZol (GIBCO BRL) を用いて総 RNA を抽出した。得られた総 RNA を DNase I で処理し、それを鋳型として oligo-dT (GIBCO BRL) をプライマーにして逆転写酵素 (SuperScript II RT、GIBCO BRL) を用いて cDNA を合成した。GAPDH mRNA の定量には Rodent GAPDH mRNA Assay Kit (Applied Biosystems) を用いた。

#### 4) 主なダイオキシン類の ELISA 法の確立

生体試料の前処理方法について検討した。すなわち、既知の量のダイオキシン類を生体試料に添加し、試料を水酸化カリウムで処理した後、n-ヘキサンでダイ

オキシン類を抽出し、ヘキサン相を濃硫酸で洗浄した。ヘキサン相は直接希釈するか、あるいはさらに固相抽出 (Wako gel) により精製した。これを用いて、TEF の大きいダイオキシン同族体 (TCDD、PeCDD、PeCDF) に親和性の高いモノクローナル抗体を用いる ELISA により TCDD 濃度を測定した。

#### (倫理面への配慮)

使用した各飼育施設の規定に従って動物実験を行った。また、ダイオキシン類の取り扱いに関しては EPA Method 8280 に準拠して実施した。

### C. 研究結果

#### 1) 幼若ラットに対する誘起排卵モデルの構築

体重推移を表 1 に、剖検における器官重量ならびに排卵検査結果を図 1 ~ 3 に示した。

離乳時における体重範囲は 41.4 ~ 56.7 g、平均 49.7 g ( $\pm 4.0$ ) とやや大きかった。その後、いずれの動物も順調に体重が増加し、3 群間で有意差は認められなかった。

剖検は eCG 投与 3 日後、すなわち 27、28 あるいは 29 日齢に行ったが、いずれの日齢においても全例に 8 ~ 13 個の排卵が誘起され、日齢間で排卵数に差は認められなかったが、子宮、肝臓および胸腺重量は日齢に伴って増加した。

#### 2) 既報の追試

入荷時から剖検までの体重推移は図 4 に、各時期における器官重量は図 5 ~ 8

に、排卵数は図9に示した。

離乳時における体重範囲は44.1~64.2 g、平均 53.1 g (±4.8)であった。TCDD 投与3日後から 16 µg/kg 投与群の体重がやや低値の傾向を示したが、有意差はいずれの時期にも認められなかった。

器官重量は、TCDD 投与後6時間の剖検では両群間に有意差は認められなかった。しかし、TCDD 投与後72時間 (eCG 投与後48時間)、すなわち誘起排卵予定日前日には、TCDD 投与群において肝臓重量が増加し、胸腺重量が低下した。また、子宮重量が増加したが、卵巣重量に有意差は認められなかった。

誘起排卵予定日における剖検においても TCDD 投与群において肝臓重量の増加および胸腺重量の低下が4 µg/kg 以上の投与群で認められ、その変化には用量相関性が認められた (肝臓:  $R=0.743$ 、胸腺:  $R=0.721$ )。

誘起排卵については、コーン油投与群ならびに1および4 µg/kg 投与群の各6例中3例、16 µg/kg 投与群の6例中1例に排卵が認められなかった。これらの例では、子宮内に水様液が大量に貯留し、卵巣には大型の卵胞が観察された一方で、黄体は認められなかった。排卵が認められた例について排卵数を比較したところ、16 µg/kg 投与群において、同一ロットの eCG を使用した1)の実験より少ない数の排卵が認められる例があり、回帰分析において有意 ( $p<0.05$ 、 $R=0.545$ )な相関性が認められた。しかし、群間に有意差は認められなかった。卵巣および子宮重量は、排卵の有無により著しく異なるので、これらの器官については排卵の有

無に分けて集計した。その結果、排卵例において1 µg/kg 投与群の子宮重量がコーン油投与群と比較して有意に低下した他に、排卵の有無に関わらず、有意差は認められなかった。また、用量相関性はいずれの器官にも認められなかった。

### 3) ダイオキシン類関連遺伝子および卵胞発育関連遺伝子の定量方法の確立

肝臓から合成した cDNA を約3万倍まで段階希釈して、Real Time RT-PCR 装置を用いて AhR、ARNT、CYP1A1 および GAPDH をコードする cDNA を定量した。最低濃度の cDNA において増幅が認められる点における蛍光強度 ( $\delta Rn$ ) と最高濃度の cDNA が指数関数的増幅を終える点における  $\delta Rn$  の中間点を算出し、その  $\delta Rn$  に到達する増幅回数 ( $Ct$  値) を各濃度について求めた。これを縦軸にとり、対数変換した希釈濃度を横軸にとると、図10に示したように、良好な直線性が得られた。

### 4) 主なダイオキシン類の ELISA 法の確立

検量線 (図11) は、TCDD 1~100 pg/well の範囲で測定可能となり、TCDD を 10 pg/g 以上含むの生体試料を測定可能となった。

## D. 考察

### 1) 幼若ラットに対する誘起排卵モデルの構築

今回の検討では、24~26日齢の動物を用い、いずれの日齢に eCG を投与しても、同等の排卵反応が認められた。使用した系統のラットにおける膈開口 (初回排卵日とほぼ一致する) の日齢は、最も早い

例では 29 日齢であることから、自然排卵と誘起排卵の重複を避けるためには、eCG の投与時期は 25 日齢以前が望ましいと考えられる。

器官重量は卵巣を除き、日齢に伴って増加した。本研究では血漿および組織を採取してダイオキシン類の含量を測定することから、より多くの測定材料を得るためには日齢が高い方が望ましいと考えられる。

## 2) 既報の追試

今回設定した TCDD の用量では、明瞭な体重増加抑制は認められなかったが、ダイオキシン類の標的組織である肝臓および胸腺重量は用量に依存して変化した。それぞれの用量相関直線の傾きはほぼ同じであり、生体は TCDD の用量に応じて反応したものと考えられる。一方、追試した誘起排卵はコーン油投与群を含む多数の例に排卵が誘起されず、コーン油投与群と TCDD 投与群との間で排卵数に有意差も認められなかった。しかし、Gao らの報告のように 50%以下に抑制されることはなかったが、16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では同一ロットの eCG を用いた 1) の実験では認められていない少ない数の排卵を示す例があり、用量相関性が認められた。これらのことから、誘起排卵抑制の原因を排除することにより、追試が可能になるものと期待された。

排卵抑制の原因については、TCDD 投与によるものでないことは、16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群における排卵率がコーン油投与群より高いことから明らかである。また、使用した eCG は、1) の実験において全例に

排卵を誘起しているため、排卵誘起能力のあることは確認されている。排卵の認められなかった例の子宮は、発情前期の子宮と類似した所見を示し、重量は前日に測定した値よりさらに増加していたことから、下垂体からの性腺刺激ホルモンサーージが生じなかったために排卵しなかったものと考えられる。下垂体からの性腺刺激ホルモンサーージは視床下部の興奮により下垂体門脈に放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモンによって促されることから、今回認められた誘起排卵抑制は中枢の抑制に起因した変化であると推測される。従って、ケミカルハザード対応飼育における飼育環境などについて検討を行う必要がある。

今回の実験において雌性生殖に対する明瞭な影響は、誘起排卵予定日前日における子宮重量に認められた。すなわち、16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群において重量が有意に増加した。中間の用量について測定を実施しなかったため用量相関性は不明であるが、TCDD 投与による変化であると考えられる。ダイオキシン類は一般的に抗エストロジェン作用を示すとされているが、AhR/ダイオキシン類複合体とエストロジェン受容体との相互作用を伺わせる反応として、そのメカニズムとともに、TEF との関連性の有無を検討する必要があるものと考えられる。

## 3) ダイオキシン関連遺伝子および卵巣発育関連遺伝子の定量方法の確立

AhR、ARNT および CYP1A1 に関しては、定量性が認められた。同一試料について GAPDH 発現量を定量し、それに対する各遺

伝子の発現量を測定することにより、TEFの比較的小さいダイオキシン類についても用量反応性を検証できるものと期待される。

#### 4) 主なダイオキシン類の ELISA 法の確立

確立した ELISA の測定感度は 1 pg であったことから、TCDD 投与ラットの血漿、肝臓および胸腺中の TCDD 濃度の測定が可能であると考えられる。

#### E. 結論

eCG の投与日齢は、25 日齢とする。

TCDD の 4~16 µg/kg は、明瞭な体重増加抑制は示さずに標的器官である肝臓および胸腺の重量を変化させる。

TCDD の前投与によって eCG による誘起排卵数を用量依存的に抑制する可能性が示唆されたが、中枢性に作用していると推測される誘起抑制の原因を明らかにし、実験系から排除する必要がある。

誘起排卵前日の子宮重量も TEF 検証におけるエンドポイントとして有用であることが示唆された。

ダイオキシン関連遺伝子のハウスキーピング遺伝子に対する相対発現量を定量することが可能となった。

TEF の大きなダイオキシン同族体の ELISA 法を確立し、生体試料中の TCDD を測定した。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 主要な業績

1) Anjo T, Okuyama M, Satoh M, Kambegawa A, Matsuki Y.

Synthesis of new dioxin haptens and development of enzyme immunoassay for dioxins using polyclonal antibodies.

ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2000; 45: 224-227.

2) Shiota M, Kitazawa I, Inoue K, Doyama A, Mukai M, Haishima A, Yamamoto K, Katoh C, Soda S, Kawabata A, Akahori F, Shiota K.

Adverse effects of *in utero* and lactational exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the first ovulation in rats.

ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2000 49: 356-358.

3) Okuyama M, Endo W, Anjo T, Kambegawa A, Kobayashi N, Goto J, Matsuki Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for dioxins based on monoclonal antibodies.

ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2001; 54: 77.

#### その他の業績

1) Nakazawa H, Sugawara Y, Saito K, Ogawa M, Kobayashi S, Matsuki, Y. Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part I: Basic strategy for methodology construction).

- ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2000; 45:  
176-179.
- 2) Saito K, Ogawa M, Takekuma M,  
Kobayashi S, Sugawara Y, Nakazawa H,  
Matsuki Y.  
Development of dioxin toxicity  
evaluation method in human milk by  
enzyme-linked immunosorbent assay  
(Part II: Examination of  
preprocessing technique to make  
ELISA compatible with GC/MS method):  
ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2000 45:  
168-171.
- 3) Sugawara Y, Saito K, Ogawa M,  
Kobayashi S, Shan G, Hammock BD,  
Nakazawa H, Matsuki Y.  
Development of dioxin toxicity  
evaluation method in human milk by  
enzyme-linked immunosorbent assay  
(Part III: Assay validation for  
human milk). ORGANOHALOGEN  
COMPOUNDS. 2000; 45: 172-175.
- 4) Hori S, Akutsu K, Kitagawa M, Oda H,  
Nakazawa H, Matsuki Y.  
Development of analysis for  
polybrominated diphenyl ether in  
seafood and actual contamination of  
seafood.  
ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2000; 47:  
214-217.
- 5) Ohta R, Matsumoto A, Sato M, Shirota  
M, Nagao T, Tohei A, Taya K.  
Postnatal behavior in hatano high-  
and low-avoidance rats following  
prenatal exposure to low-dose  
methylazoxymethanol.  
Neurotoxicol Teratol. 2000; 22:  
405-413.
- 6) Akutsu K, Obana H, Okihashi M,  
Kitagawa M, Nakazawa H, Matsuki Y,  
Makino T, Oda H, Hori S.  
GC/MS analysis of polybrominated  
diphenyl ethers in fish collected  
from the Inland Sea of Seto, Japan.  
Chemosphere. 2001; 44:1325-33.
- 7) Okuyama M, Matsuki Y, Nakazawa H.  
The role of enzyme-immunoassay in  
analysis of dioxins.  
J Food Hyg Soc Japan. 2001; 42
- 8) Saito K, Takekuma M, Ogawa M,  
Kobayashi S, Sugawara Y, Ishizuka M,  
Nakazawa H, Matsuki Y.  
Study of extraction and cleanup  
methods of dioxins in house dust.  
ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2001; 50,  
134-137.
- 9) Yamamoto K, Shirota M, Inoue K,  
Doyama A, Mukai M, Haishima A, Katoh  
C, Soda S, Kawabata A, Shirakura K,  
Sakurada Y, Akahori F, Shirota K.  
*In utero* exposure to 3,3',4,4',5-  
pentachlorobiphenyl (PCB 126)  
induces hypospadias in female rats.  
ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2001; 53:

303-305.

- 10) Nakazawa H, Saito K, Takekuma M, Ogawa M, Kobayashi S, Sugawara Y, Ishizuka M, Matsuki Y.  
Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part IV: A study on simplification of pretreatment).  
ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2001; 54: 55-58.
- 11) Ishizuka M, Sugawara Y, Saito K, Takekuma M., Ogawa M, Kobayashi S, Shan G, Hammock BD, Nakazawa H. Matsuki Y.  
Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay (Part V: A study on improvement of stability).  
ORGANOHALOGEN COMPOUNDS. 2001; 54: 59-61.
- 12) Shiota M, Ohta R, Sato M, Kojima K, Asai S, Watanabe G, Taya K.  
Endocrinological background underlying bipolar distribution of the onset of female puberty in high- and low-avoidance rats (HAAs and LAAs).  
Biol Reprod. 2001; 64: 189.

## 2. 学会発表

- 1) Sato, M., Ohta, R., Shiota, M., Kojima, K.: Differences in puberty

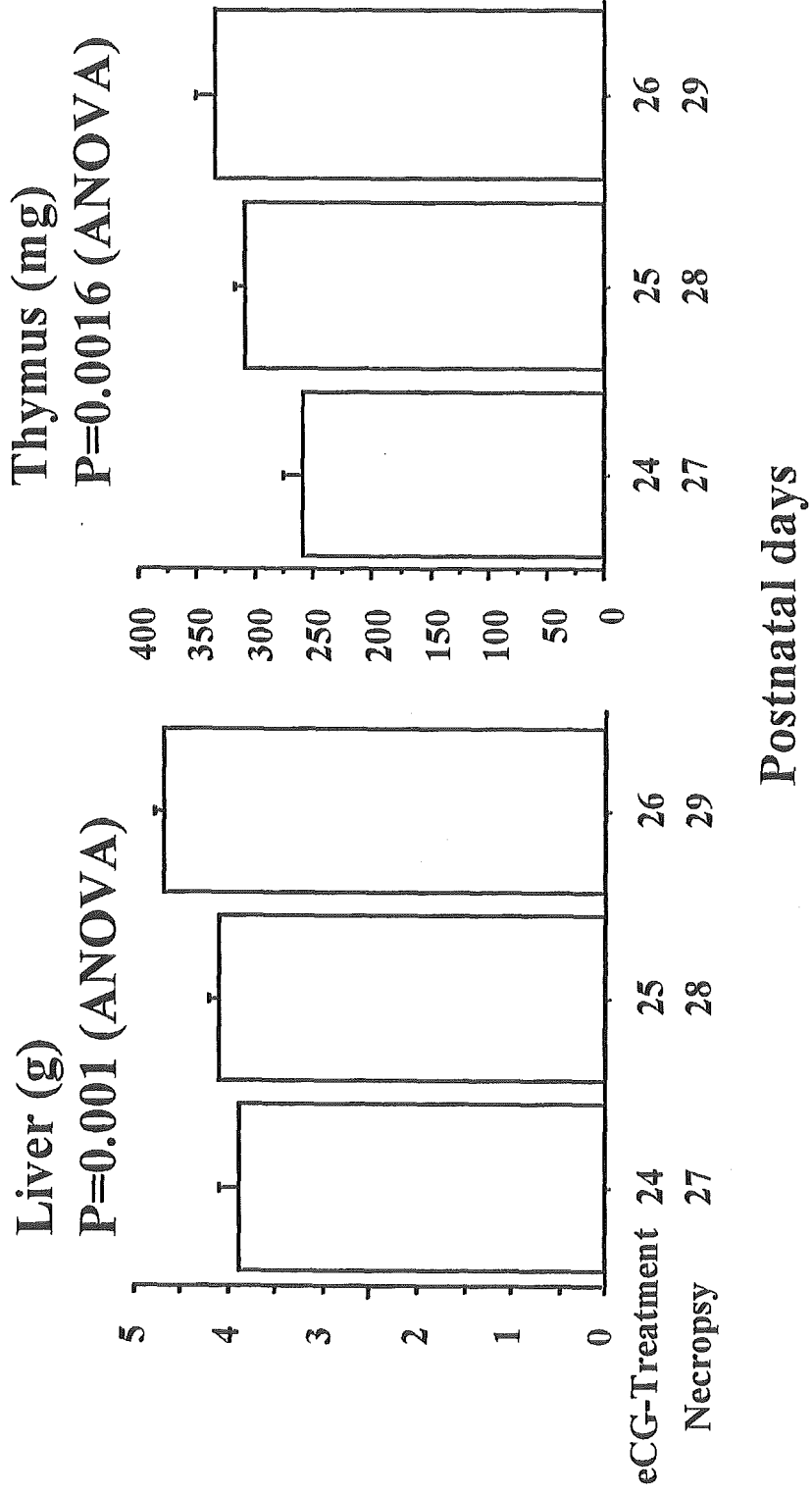
and sperm motility in two inbred strains from Sprague-Dawley rats.  
XVth Testis Work-Shop, 1999, 4.

- 2) 佐藤昌子, 太田亮, 代田真理子, 小島幸一: 近交系 Hatano 高および低回避ラットにおける精子運動性の系統差.  
第 92 回日本繁殖生物学会, 1999, 9.
- 3) 代田真理子, 太田亮, 佐藤昌子, 小島幸一: 近交系 Hatano 高および低回避ラットにおける春機発動時期の系統差.  
第 92 回日本繁殖生物学会, 1999, 9.
- 4) 代田真理子, 佐藤昌子, 太田亮, 渡辺元, 田谷一善, 代田欣二: Busulfan により子宮内曝露を受けた幼若雌ラットにおける血中インヒビンおよび卵胞刺激ホルモン濃度と春機発動. 第 4 回日本内分泌学会生殖内分泌分科会, 1999, 9.
- 5) 太田亮, 金澤由基子, 新藤智子, 古屋真美, 佐藤昌子, 関剛幸, 代田真理子, 小島幸一: 近交系 Hatano 高および低回避ラットにおける免疫学的指標の比較. 第 47 回日本実験動物学会総会, 2000, 5.
- 6) Shiota K, Yamamoto K, Inoue K, Doyama A, Mukai M, Haishima A, Ktoh C, Soda S, Kawabata A, Akahori F, Shiota M: External urogenital malformations in female rats induced by *in utero* and lactational exposure to 3, 3', 4, 4', 5-

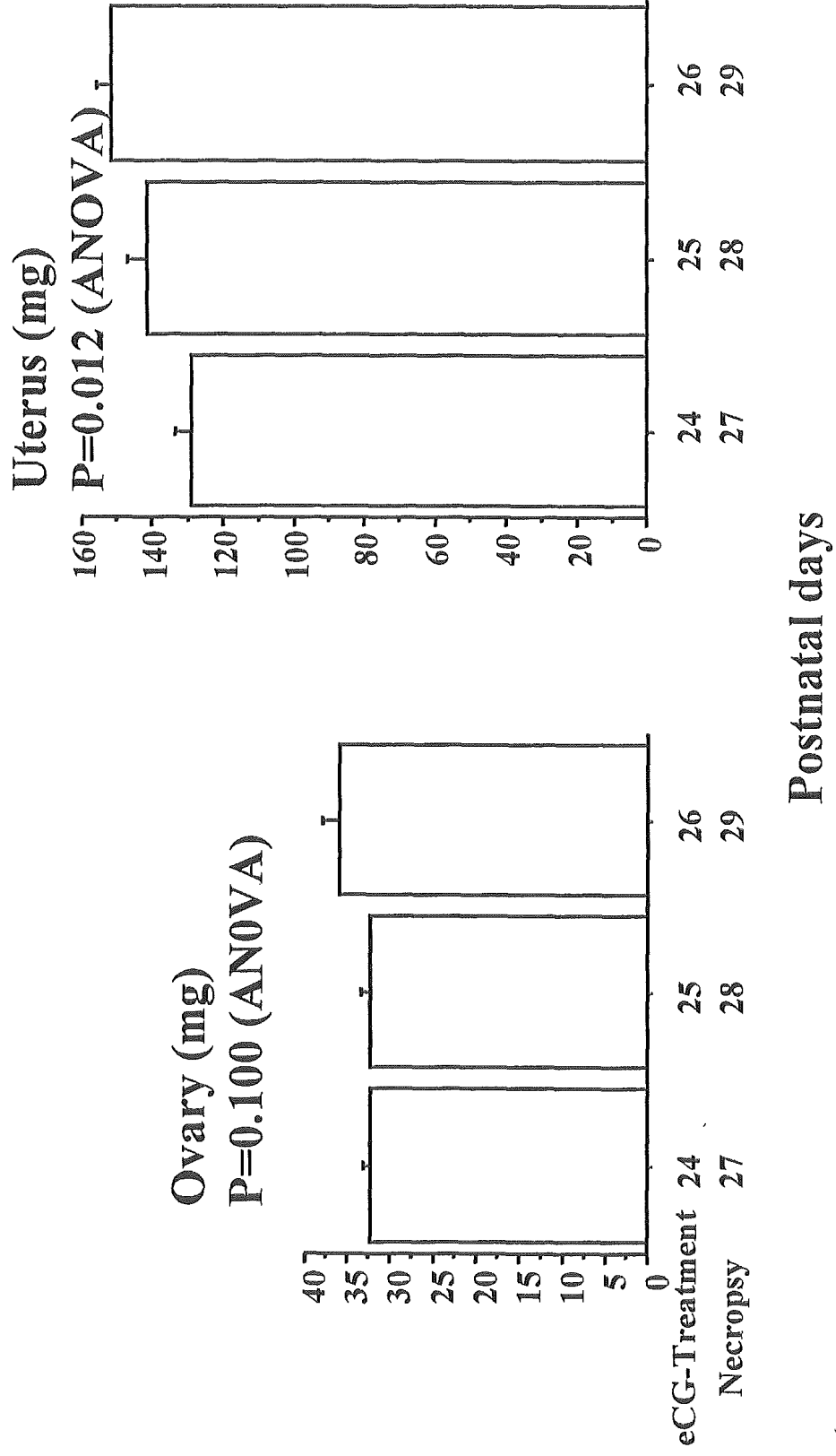
- pentachlorobiphenyl. 18<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, 2000, 9.
- 7) 代田真理子, 北澤郁恵, 井上薫, 堂山有理, 迎素子, 配島淳子, 山本健二, 加藤千恵, 曾田祥恵, 川端敦, 赤堀文昭, 代田欣二: 3, 3', 4, 4', 5-Pentachlorobiphenyl (PCB126) の子宮内および経乳汁曝露が雌ラットの春機発動に及ぼす影響. 第 93 回日本繁殖生物学会, 2000, 10.
  - 8) 配島淳子, 迎素子, 堂山有理, 井上薫, 北澤郁恵, 代田真理子, 赤堀文昭, 代田欣二: コプラナーPCB 曝露ラットの出生子における Thy-1 腎炎. 第 130 回日本獣医学会学術集会, 2000, 10.
  - 9) 堂山有理, 井上薫, 北澤郁恵, 迎素子, 配島淳子, 山本健二, 加藤千恵, 川端敦, 曾田祥恵, 赤堀文昭, 代田真理子, 代田欣二: コプラナーPCB の次世代への生体影響: 出生子の腎臓における CYP1A1 誘導. 第 130 回日本獣医学会学術集会, 2000, 10.
  - 10) 迎素子, 井上薫, 北澤郁恵, 堂山有理, 配島淳子, 山本健二, 加藤千恵, 川端敦, 曾田祥恵, 池田輝雄, 赤堀文昭, 代田真理子, 代田欣二: コプラナーPCB の次世代への生体影響: 出生子の肝臓における CYP1A1 誘導. 第 130 回日本獣医学会学術集会, 2000, 10.
  - 11) 山本健二, 代田真理子, 井上薫, 迎素子, 堂山有理, 配島淳子, 加藤千恵, 川端敦, 曾田祥恵, 赤堀文昭, 代田欣二: コプラナーPCB 曝露ラットの雌出生子に認められた外部泌尿生殖器の形態異常. 第 130 回日本獣医学会学術集会, 2000, 10.
  - 12) 曾田祥恵, 加藤千恵, 代田欣二, 太田亮, 佐藤昌子, 代田真理子: 幼若ラットの卵巣における卵胞数評価方法に関する検討. 94回日本繁殖生物学会, 2001, 9.
- G. 知的所有権の取得状況
2. 特許取得  
ダイオキシンに対するモノクローナル抗体 (特願 2000-315948号)
  2. 実用新案登録  
該当なし



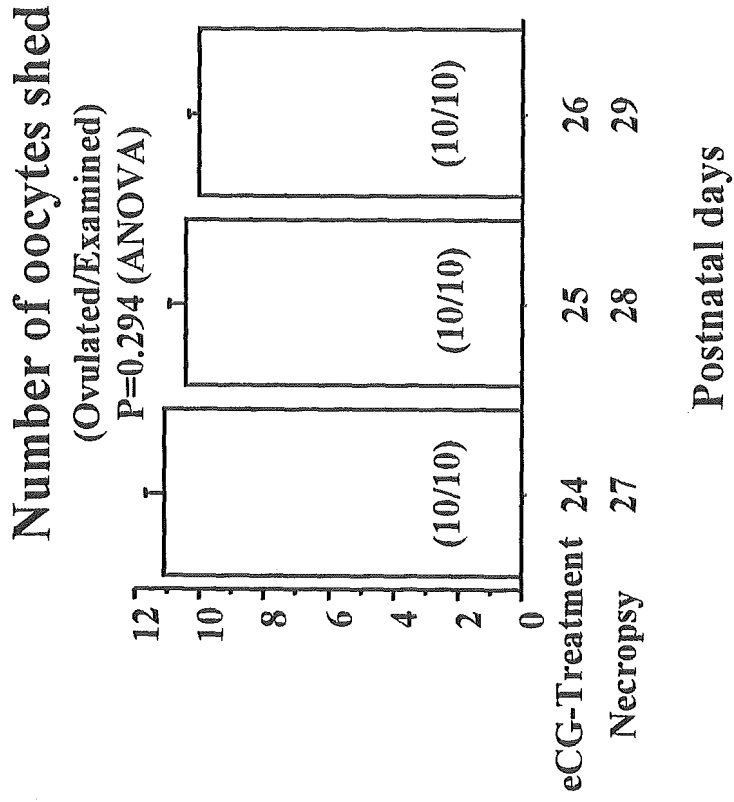
## Liver and Thymus Weights at Induced Ovulation (3 Days after eCG-Treatment)



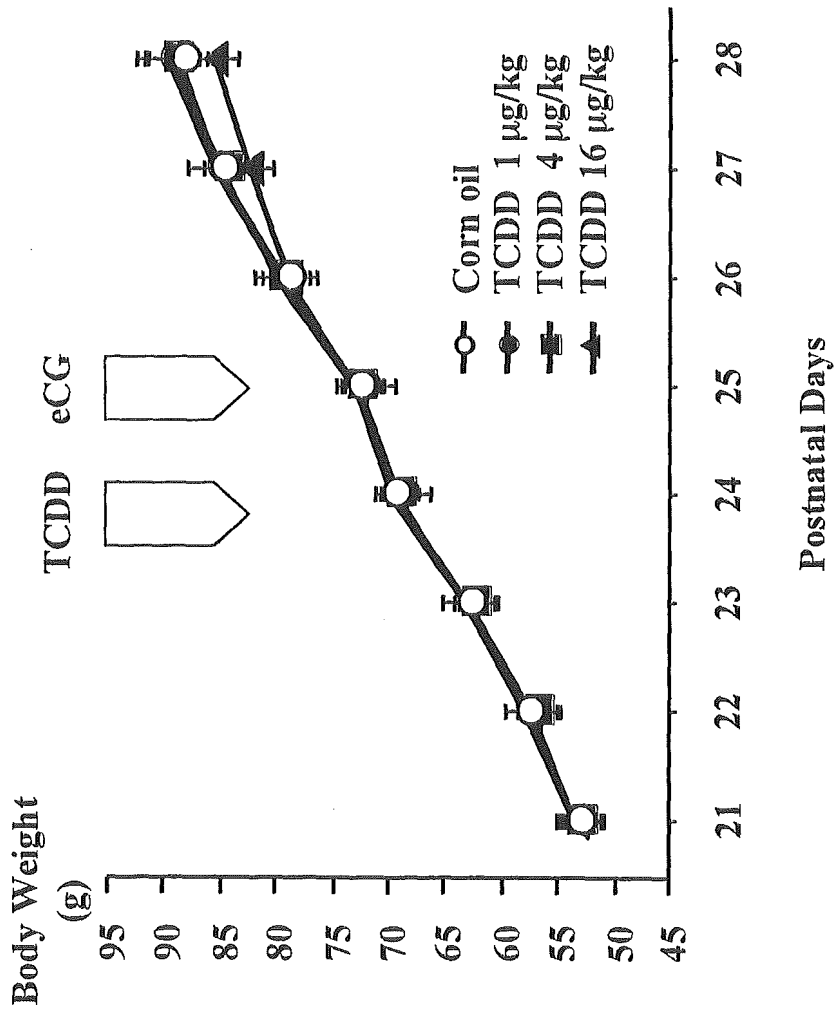
## Ovarian and Uterine Weights at Induced Ovulation (3 Days after eCG-Treatment)



# Induced Ovulation on 3 Days after eCG-Treatment

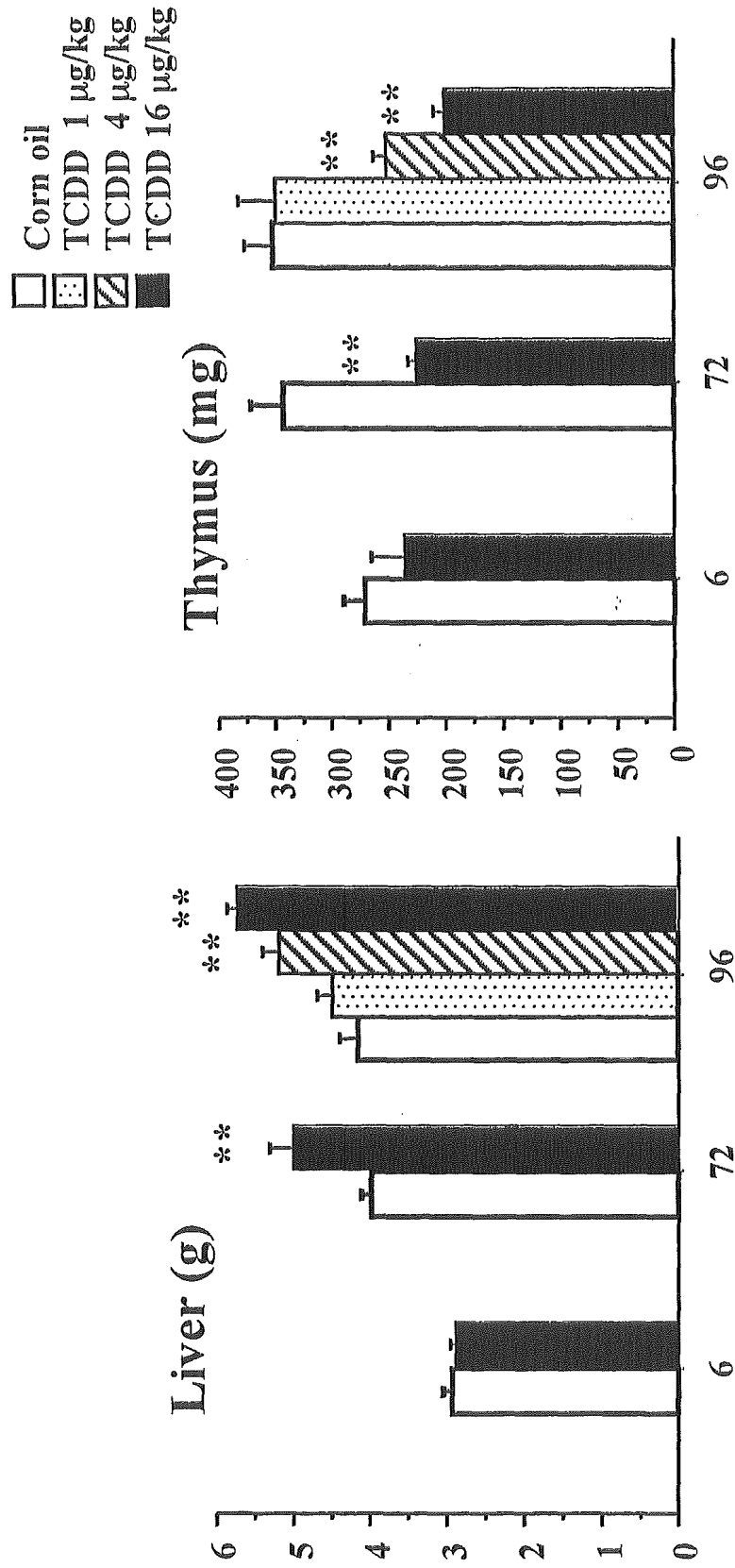


# Body Weight Changes of Immature Female Rats



5

## Changes in Liver and Thymus Weights After TCDD-Administration to Immature Rats

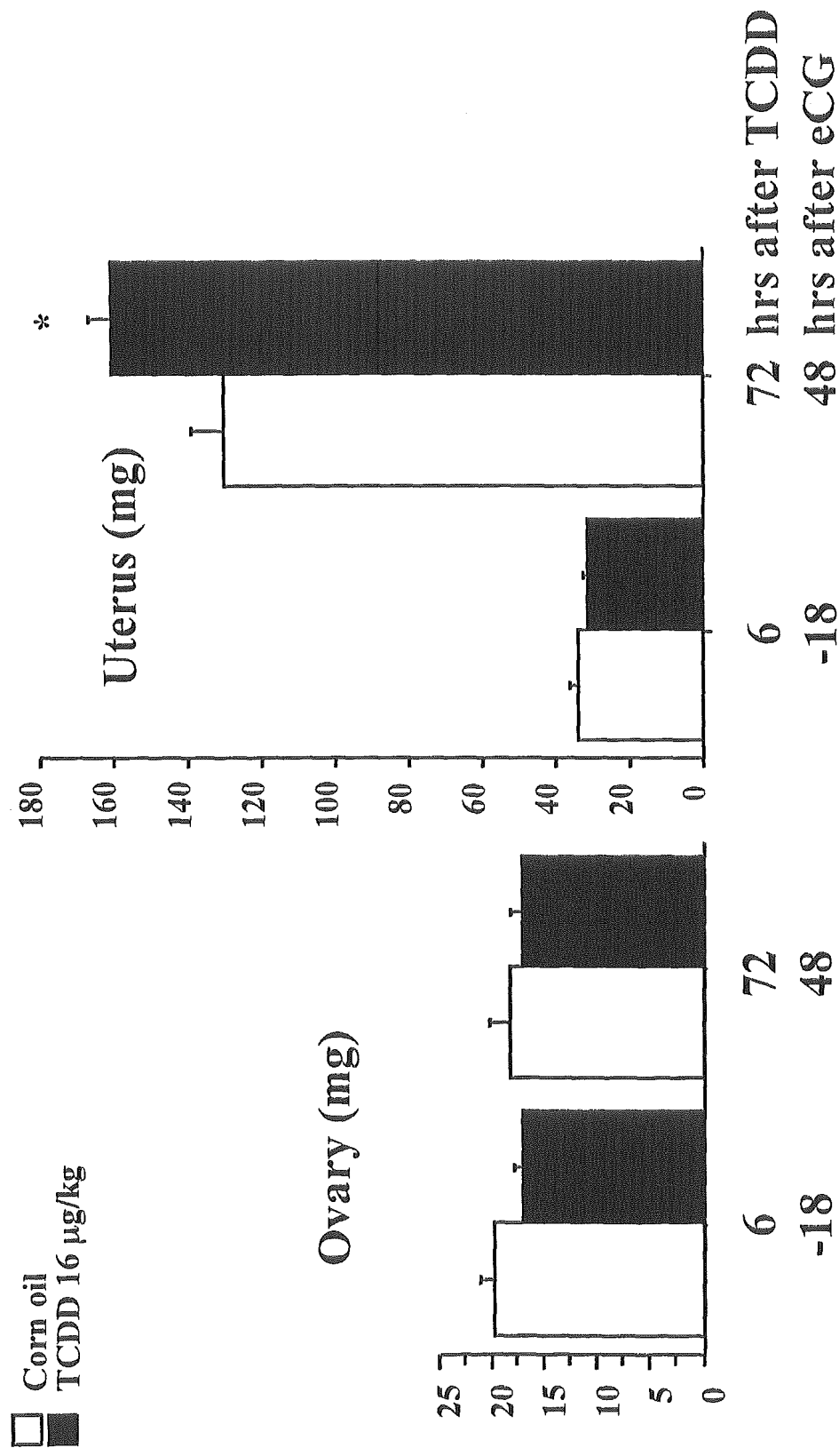


Hrs after TCDD-administration

\*\* , significantly different from the corn oil-treated group at  $p < 0.01$

Figure 6

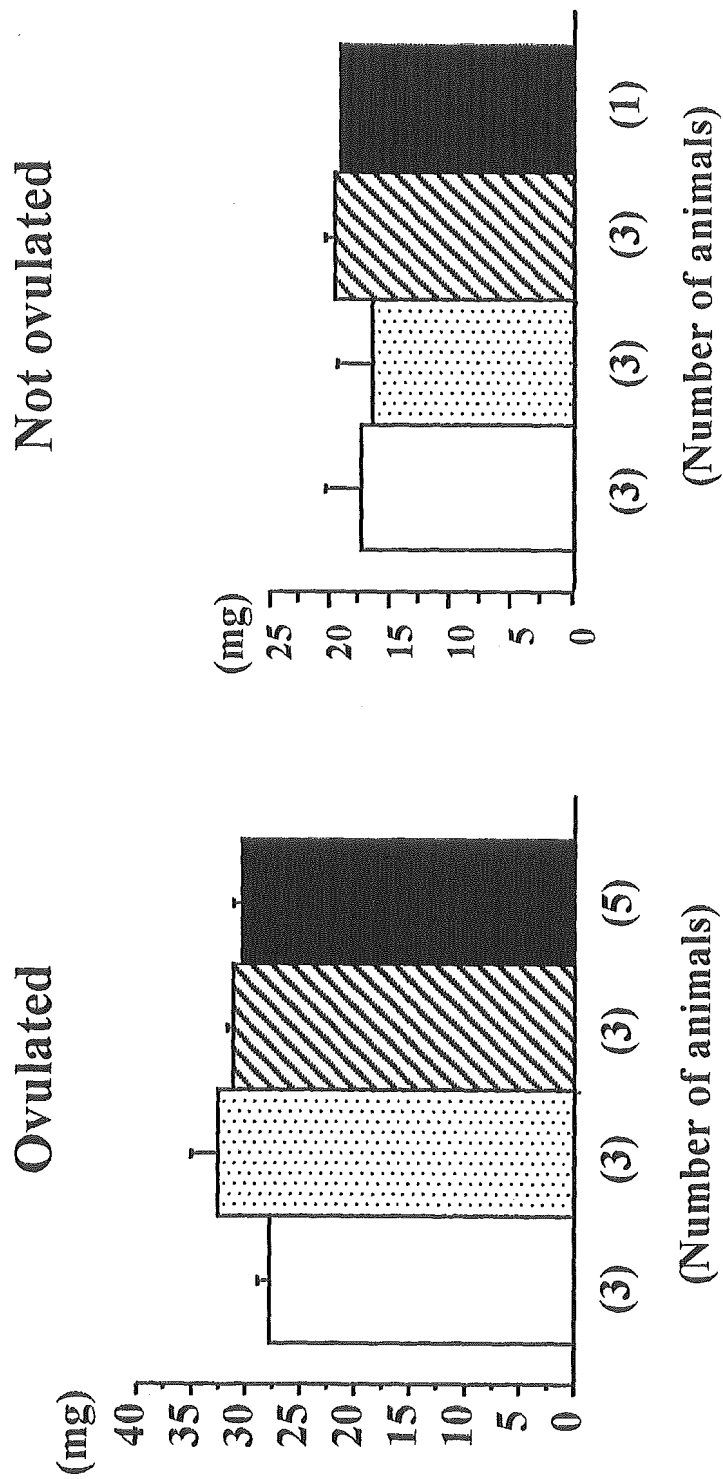
## Changes in Ovarian and Uterine Weights after TCDD-Administration



\* , significantly different from the corn oil-treated group at p < 0.05

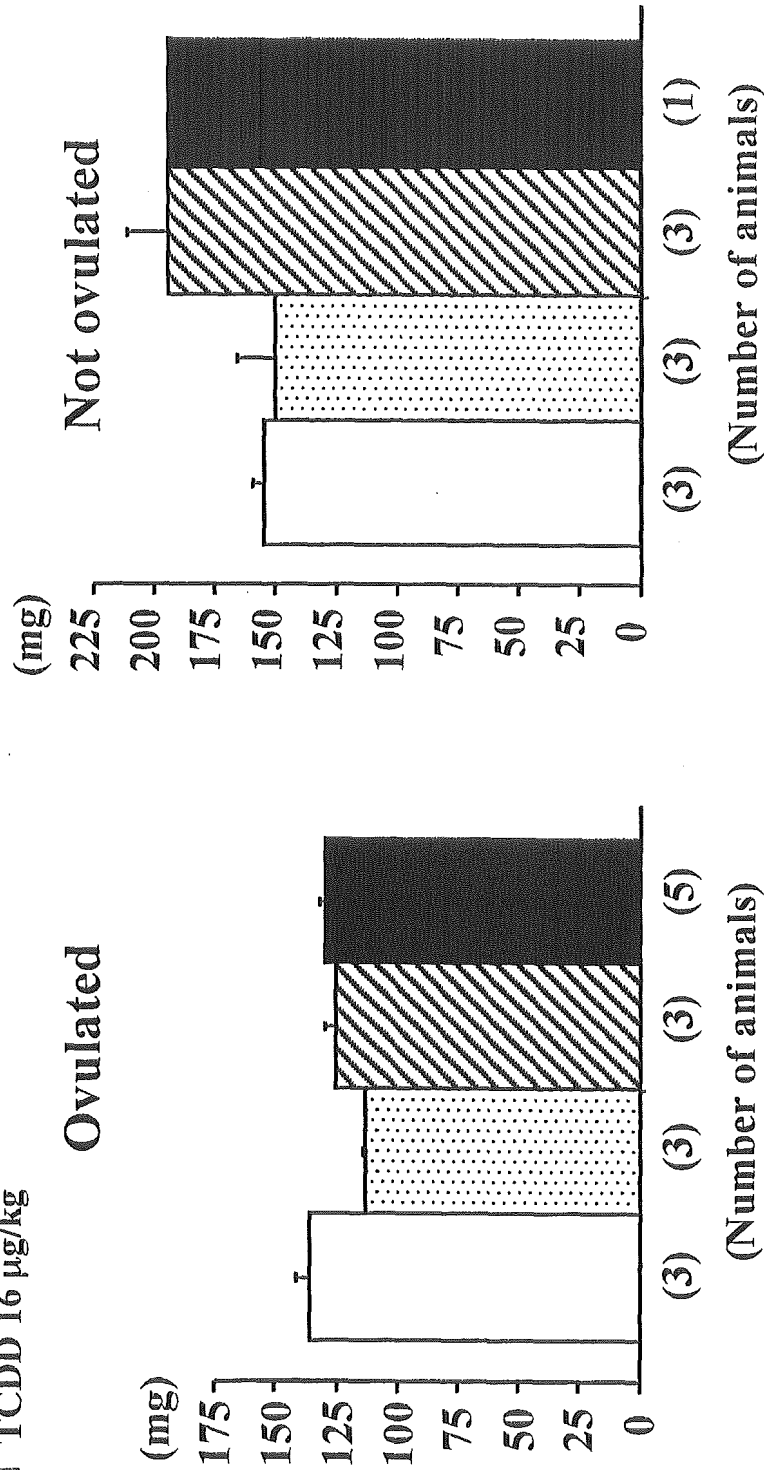
## Ovarian Weight on the Expected Day of the Induced Ovulation

- Corn oil
- ▤ TCDD 1 μg/kg
- ▥ TCDD 4 μg/kg
- TCDD 16 μg/kg



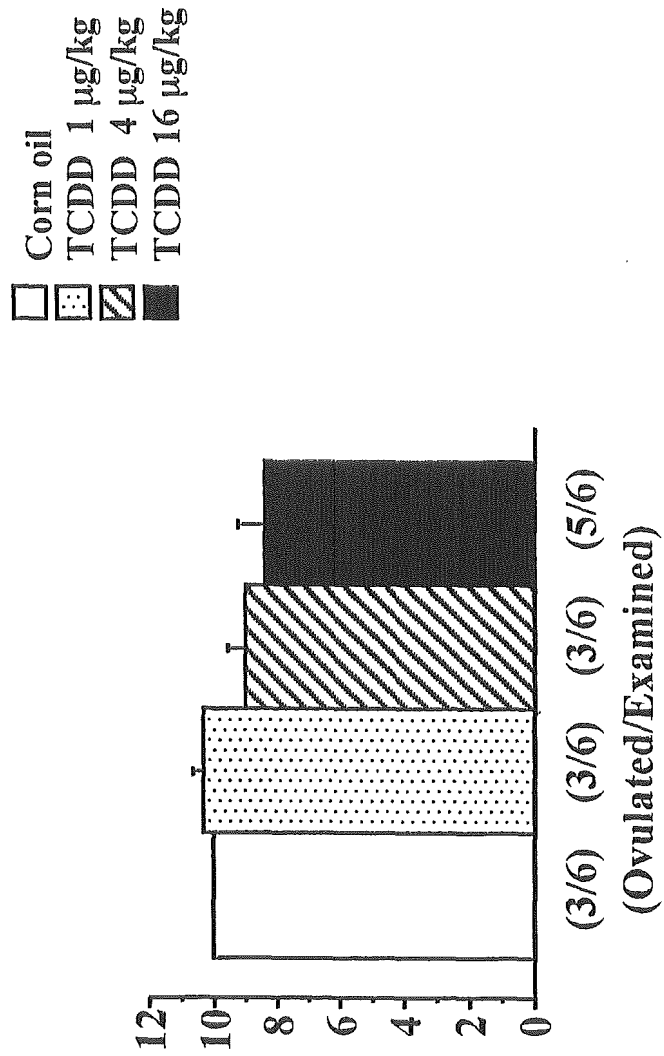
# Uterine Weight on the Expected Day of the Induced Ovulation

- Corn oil
- ▨ TCDD 1 µg/kg
- ▩ TCDD 4 µg/kg
- TCDD 16 µg/kg

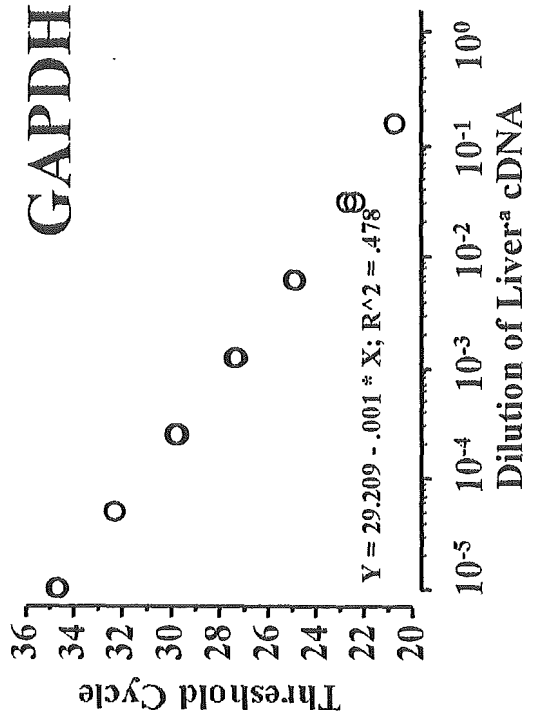
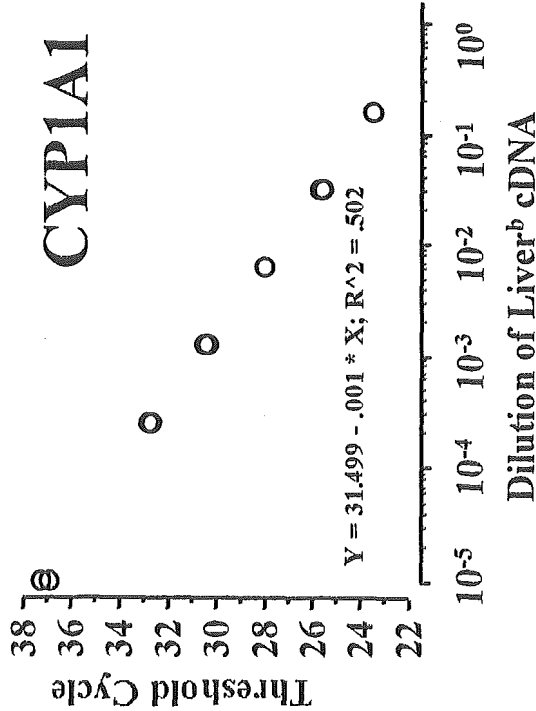
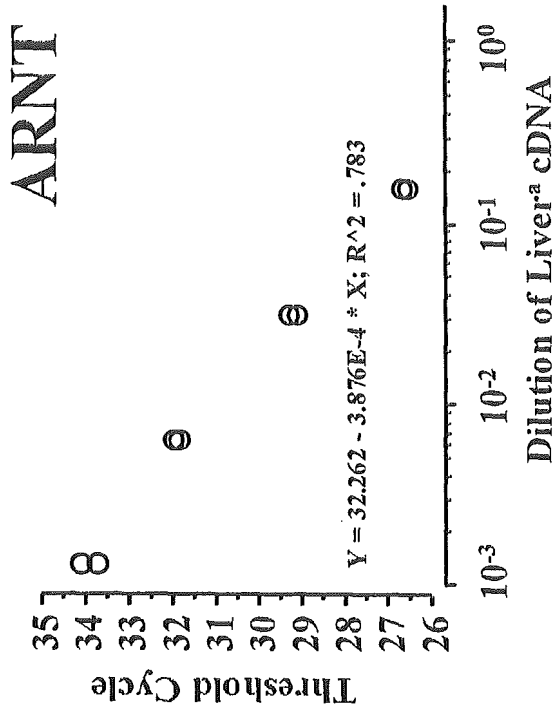
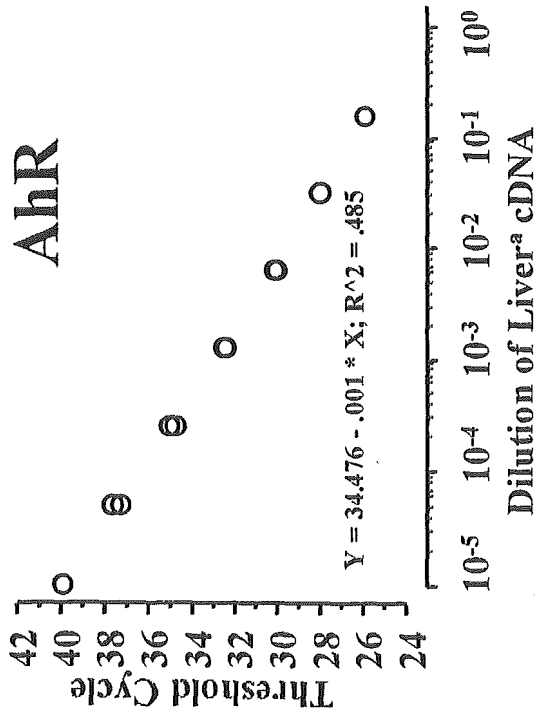




# Number of Oocytes Shed at the Induced Ovulation



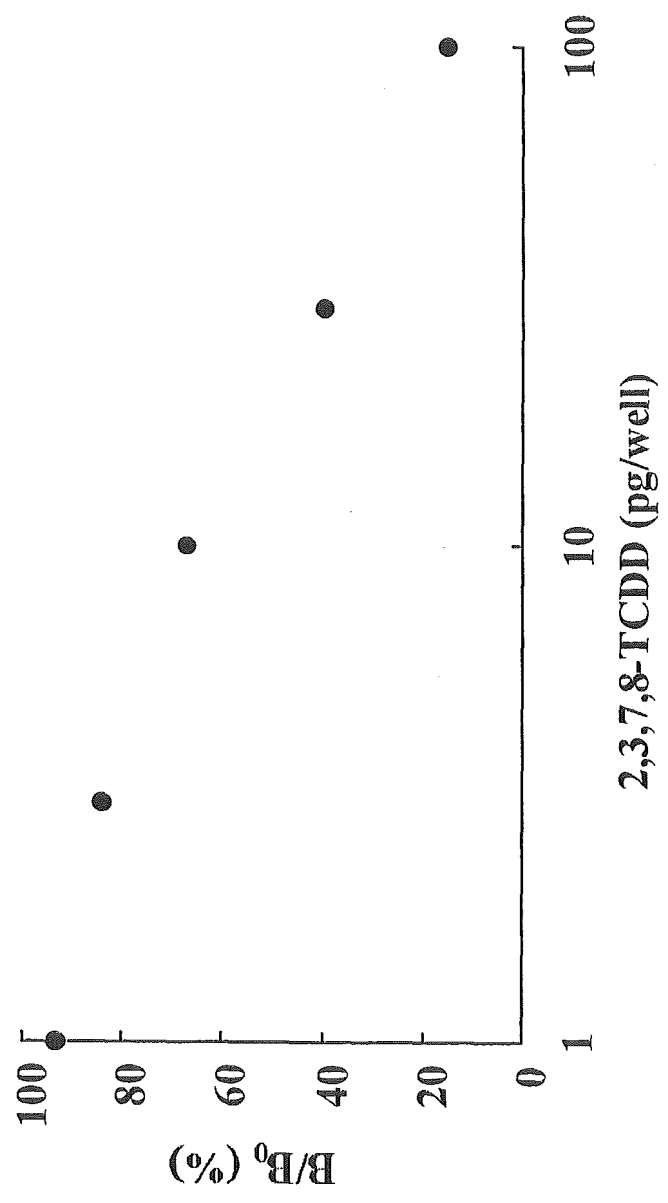
# Dilution Curves in Real-Time RT-PCR



<sup>a</sup>, obtained from intact female rat

<sup>b</sup>, obtained from PCB 126-treated female rat

### Standard Curve for 2,3,7,8-TCDD



分担研究報告書

ダイオキシン類の短期間雌雄ラットへの暴露が生殖器に及ぼす影響

鈴木 勝士日本獣医畜産大学 獣医畜産学部

研究要旨

ダイオキシン類(ダイベンゾフラン、PCB を含む)の TEF については、主として AhR への親和性と *in vitro*、*in vivo* での生物学的影響および毒性学的影響に基づいて、その作用が相加的であるとの見解により、定められている。しかし、*in vivo* の反応には種差、系統差、エンドポイントによる差などが存在している。多様な影響のなかで内分泌的攪乱についても多数の報告がある。これらの多様な反応について、逐一相対力価を求める必要がある。第一次ダイオキシン金子班での実験では、TCDD の WI ラット妊娠期の 15 日 1 回投与による次世代の雄の生殖器形成異常と交尾行動の異常、妊娠初期投与による高濃度での不妊は見られたが F2 世代まで追跡した結果、これらの動物には何らの異常も観察されなかったという結果を得ている。後者の実験では、変異原作用をもった化学物質などの場合に見られるボディプランに関わるような重篤な奇形は発生していなかったため、TCDD は初期胚に対し変異原として作用しないと解釈された。また、今井班での CD ラットの UT 試験では、DES と TCDD の皮下投与で何らの相互作用も見られなかったとの成績を得ている。様々な炎とポイントに対する相対力価を求めるために世代試験を実施するのは、限られた時間と施設の関係から困難であるので、今回はより短期的な生物反応に着目した。TCDD のいわゆる抗エストロゲン作用に鑑みると、前回の UT 試験の結果は解釈が難しい。おそらく皮下投与によったために、何らかの代謝的な影響があって、その子宮への作用がマスクされたのではないかと考えられる。

A. 研究目的

今年度は、ダイオキシンのうち 2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD (TEF=1)、1,2,3,4,7,8-HxCDD (TEF=0.1、他のヘキサクロロ化合物のうちいずれか 1 種)、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (TEF=0.01) の中から TCDD に加えてそれ以外の 2 種のダイオキシン(経口投与)を用いて、E2(皮下投与)による

子宮肥大に対する抑制反応を調べ、TEF を求める。

B. 研究方法

用いるラットの系統はWIとし、6週齢で卵巣摘出し、7週齢から投与を開始する。E2 単独群(0, 0.5, 1.0, 2.0および4.0 μg/kgを予定しているが、予備実験を実施する: SC x3 日)とTCDD併投群(5 μg/kgを経口 1 回投与、