

## 14. OECD/WHO 関連総括

研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長

### 研究要旨

分担研究は、所属の研究所の安全性生物試験研究センター長の立場から、毒性試験、薬理学試験、病理学試験、変異原性および遺伝毒性に関する試験等の統括責任者として、国内外の会議および学会等への参加等による専門家との意見交換および情報収集をおこない、その成果を本研究班に反映する事に努めている。その背景としては、ごく近い将来、国際協調下、国内諸機関の協力の基でこの課題に即した、各種試験が行われる際に、速やかに適切な体制をとって応じることができるような、国内の技術的な基盤を整える立場から、経済協力機構(OECD)、世界保健機構(WHO)、米国環境防護庁関係機関(EPA・ED-STAC)の提案にあげられている諸試験法に関する基礎的実験の試行的実施とそれに応じた改良ならびに新規試験の開発等を総合的に推進することを念頭に置く必要がある為である。更に、OECD が中心となって国際的に実施している内分泌かく乱化学物質の試験法の改良・ガイドラインの作成をおこなっており、これまでに引き続き、OECD を中心として推進するバリデーション試験への協力もを行い、今後の OECD、WHO、EPA、NIEHS などの協調研究の受け皿となるような国内体制を整えることも重要である。

#### A. 研究目的

安全性生物試験等の統括責任者としての立場から、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、経済協力機構(OECD)、世界保健機構(WHO)、米国環境防護庁関係機関(EPA・EDSTAC)の提案にあげられている諸試験法に関する基礎的実験の試行的実施とそれに応じた改良ならびに新規試験の開発等を総合的に推進する

ことを目的とする。

#### B. 研究方法

所属の研究所の安全生成物試験研究センター長として、所轄の業務関連物質の毒性試験、薬理学試験、病理学試験、変異原性および遺伝毒性に関する試験等の試験結果の総合評価に関する統轄業務に携わっている。当研究所の安全性試験の統括責任者として、それらの専門家との意見交

換および情報収集のため国内外の会議および学会等への参加、得られた成果の研究発表、雑誌等を通じて得られた最新の情報を紹介している。本年度は、毒性学報面における基盤と応用にかかる幅広い研究を集積する学会である米国トキシコロジー学会へ参加し、内分泌かく乱性試験に関する情報収集と専門家との意見交換を行い、研究課題の今後の進展および職務の反映への参考とする。

#### C、D. 研究結果および考察

第42回米国トキシコロジー学会は、2003年3月9日(日)～13日(木)まで米国 Salt Lake City で開催された。学会参加人数は約2500名であり、演題は、ポスターを含め2000題以上であった。その中で内分泌かく乱に関する発表は64題あり、内分泌かく乱作用に関連する「Reproductive and Developmental Toxicity」は201題であった。内分泌関連の報告から波及した「Genomics and Proteomics」、「Toxicogenomics」関連の発表も多くみられた。

ヒトゲノム配列の全貌が国際協力プロジェクトによりほぼ解明され、本格的なポストゲノム到来の時代が到来する。生命科学のあらゆる研究分野に大きな情報革命の波が押し寄せ、今後バイオインフォマティック

ス、機能ゲノム学的解析、プロテオーム解析、遺伝子多型性の解析等、系統的に引き出せる必要があり、トキシコロジー関連情報をこの中にリンクさせることが緊急必要となってきた。当班は、すでにマイクロアレイの毒性学領域での急速な応用の動きに鑑みて、内分泌かく乱化学物質として取り上げることの可能なOECDで検討対象とした化学物質についてマウスもしくはラットの内分泌機能に関連した発現遺伝子の諸臓器サーベイと、各化学物質間の比較を行い、今後のこの方面からの研究の基礎となる基盤開発を緊急に立ち上げ、可能な限りの系統的成果を上げてきた。内分泌かく乱問題の解決には、それらの問題を考慮しつつ、現在利用可能な試験法を組み合わせると共に、科学の進歩に即応した新規試験法開発も重要であると考察され、本研究班で検証を進めている「マイクロアレイ基盤技術調査」等は、上記に即応する研究であり、内分泌かく乱化学物質の問題点をカバーするためには、引き続き国際的な視野にたった最新の地検に基づく新規試験法開発が重要であると考え

#### E. 結論

内分泌かく乱化学物質の問題点を

カバーするためには、引き続き国際的な視野にたち、最新の地検に基づく新規試験法開発が重量であると考ええる。

無し

2. 実用新案登録

無し

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

T Inoue, Toxicogenomics; a new paradigm of toxicology, T Inoue, WD Pennie Eds, toxicogenomics, pp.3-11, Springer-Verlag Tokyo, 2002

T Inoue, Toxicogenomics- Applied Genomics; a Tool in Toxicology. Proceedings of the Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology (Special Session on the Use of Genomics (Toxicogenomics, Proteomics) in Hazard and Risk Assessment), OECD(2002,02, Paris)

小泉睦子、大野泰雄、広瀬雅雄、江馬 眞、井上 達、長谷川隆一、DINPの毒性評価と耐容摂取量の算定、日本食品化学学会誌、9(2)、39-45、2002

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

(4) 〈確定試験等開発研究〉

15. 内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究—継世代試験の改良—

研究者 長尾 哲二 近畿大学理工学部生命科学科 発生生物学研究室 教授

研究要旨

性腺構築過程における傷害性の有無が内分泌かく乱化学物質の次世代生殖影響を早期かつ短期に検出できるエンドポイントになり得るかを結論するために、まず内分泌かく乱性を有する合成エストロゲンのジエチルスチルベステロール (DES) を用いて検討した。生殖巣の初期発生段階にあるマウス胎児に DES を経胎盤的に暴露し、生殖巣の形態の組織学的変化ならびに生殖細胞の減少などを観察した。その結果、対照群の生殖巣と比較して DES 暴露胎児の生殖巣では、間質細胞に多数の脂肪滴の存在を認めた。さらにグリコーゲンの蓄積も観察されたことから、DES 暴露後の早期に胎児生殖巣に生じた変化を組織の形態変化として捉えることが可能であった。但し、胎児期に DES に暴露された雄マウスの成熟後に観察されている生殖器官の組織学的変化ならびにそれに起因すると考えられる生殖機能の障害と胎児生殖巣でみられた上記変化との関連は現在のところ明らかにはできない。次いで、胎児期 DES 暴露後の胎児生殖巣あるいは新生児精巣に過剰細胞死アポトーシスが観察されるかを検討した結果、胎児生殖巣に TUNEL 陽性細胞の増加は観察されなかったが、新生児の精巣に顕著な TUNEL 陽性細胞の増加が観察された。また、 $17\beta$ -エストラジオール、エチニルエストラジオール、タモキシフェンあるいはアトラジンのマウス胎児期暴露でも発生初期の性腺に組織変化が認められた。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の胎児期暴露による生殖巣原基における傷害と、生後の生殖器官の発達障害ならびに成熟後の生殖機能の障害との関連について検討し、性腺構築過程における組織変化を指標とした傷害性、過剰アポトーシス誘発あるいは熱ショック蛋白レベル上昇などの有無が、内分泌かく乱化学物質の次世代生殖影響を早期かつ短期に検出するエンドポイントになり得るか

を結論する。

B. 研究方法

[実験1] ICR マウスの妊娠 10~13 日 (産栓発見日=妊娠 0 日と規定) に、ジエチルスチルベステロール (DES, Sigma Chem.製) をコーン油に懸濁して、100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を連日背部皮下に注射した。最終投与の 24 時間後 (妊娠 14 日) に頸椎脱臼により屠殺して開腹し、子宮を摘出して胎児を得た。実体

顕微鏡下で雄胎児の生殖巣を取り出し、0.1M リン酸緩衝 1.25%グルタルアルデヒドおよび 2%パラホルムアルデヒド混合液で固定したマウス胎児生殖巣を細切して 0.1M リン酸緩衝液で洗浄後、同緩衝 2%四酸化オスミウムで後固定した。エタノール脱水後、エポキシ樹脂に包埋して厚切り切片トルイジンブルー染色標本による光顕観察を行った。次いで電顕用にトリミングし、超薄切片を作成して酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛の重染色を行って電顕（日立 H-7100）観察した。また、胎児生殖巣および新生児精巣における過剰アポトーシスの観察では、同様に子宮内暴露した胎児を、胎齢 14 および 17 日に摘出し、頭部を除去して生殖巣あるいは精巣を傷つけないよう 0.1M 磷酸緩衝 10%ホルマリン液に固定した。さらに一部の DES 暴露した妊娠マウスは、妊娠 18 日に帝王切開して雄胎児を摘出し、胎児は無処置マウスに哺育させた(養母哺育)。これらの児は、生後 9、14 あるいは 28 日にエーテル麻酔して屠殺し、実体顕微鏡下で開腹して精巣を摘出した。摘出した精巣は同様に 0.1M 磷酸緩衝 10%ホルマリン液に固定した。固定した胎児生殖巣および新生児精巣は、常法に従いパラフィン包埋し、Tunel 法に準じて Tunel 陽性細胞の有無を観察した。

[実験 2] ICR マウスの妊娠 10~13 日に、17β-エストラジオール (E<sub>2</sub>)、エチニルエストラジオール (EE)、タモキシフェン (TAM)、クロミフェン (CLOM) の 100 μg/kg/day あるいはアトラジン (ATZ) (いずれも Sigma Chem.製) の 100 mg/kg/day をコーン油に懸濁して連日背部皮下に注射し、[実験 1]と同様に、胎児生殖巣の組織変化を

電顕観察した。

[実験 3] 実験 1 および 2 で内分泌かく乱化学物質に暴露した妊娠マウスの一部は、妊娠 17 日に胎児を摘出（固定後に精巣を摘出）、また自然分娩させ、生後 9、14 および 28 日に雄出生児の精巣を摘出して 0.1M 磷酸緩衝 10%ホルマリン液に固定した後、常法に従い H&E 染色し光顕観察を行った。

なお、いずれの実験においても使用した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など苦痛の少ない方法を用いた。

### C. 研究結果

[実験 1] 胎齢 14 日（最終暴露の 24 時間後）の生殖巣の光顕観察の結果、DES 暴露群の間質細胞の細胞質に多数の脂肪滴と思われる褐色色素像がみられ、電顕観察により脂肪滴であることを確認した。さらに細胞質にグリコーゲンの蓄積も確認された (Fig. 1-A, B)。しかし、生殖索には、DES 暴露による傷害を示唆する変化は、セルトリ細胞および生殖細胞のいずれにも観察されなかった。

胎児生殖巣および新生児の精巣のアポトーシス細胞の観察では、胎児生殖巣に Tunel 陽性細胞の増加は観察されなかったが、生後 9 および 14 日の新生児の精巣に顕著な Tunel 陽性細胞の増加が観察された (Fig. 1-C)。

[実験 2] E<sub>2</sub> 暴露の結果、生殖索では生殖細胞の細胞質が部分的に脱落し、細胞質全体が淡明化した。また、間質細胞の軽度過形成が認められた。EE 暴露では、生殖細胞の萎縮および間質細胞の軽度過形成がみられた。TAM 暴露でも間質細胞の軽度過形成がみられた。CLOM 暴露では超微形態的変化

はみられなかった。ATZ 暴露では、間質細胞の軽度過形成がみられ、さらに脂肪滴の大型化および増加、脂肪滴周囲のグリコーゲン顆粒の集簇が観察された(Fig. 1-D)。

[実験 3] 妊娠 17 日に摘出した胎児精巣の光顕観察では異常は認められなかった。生後 9 および 14 日の観察をした対照群、E<sub>2</sub>、TAM および CLOM 投与群では、精細管内にごく少数の変性細胞が含まれていた。生後 28 日の観察を実施した対照群、E<sub>2</sub>、DES、TAM および CLOM 投与群では空胞変性に陥った精子細胞が認められ、DES 投与群では他の群よりやや多い傾向を示したが、著しい差ではなかった。対照群、DES、TAM および CLOM 投与群では精細管内にごく少数の多核巨細胞がみられた。

#### D. 考察

DES、E<sub>2</sub>、EE、TAM あるいは ATZ のマウス胎児期暴露により生殖巣に生じる組織学的変化を観察した結果、間質細胞に脂肪滴の増加ならびにグリコーゲンの蓄積などを認めた。これらの変化はテストステロンなどのステロイドホルモンの合成異常に関連した変化であると考えられた。生殖索には、暴露物質の影響を示唆する変化はみられなかった。このように内分泌かく乱化学物質の胎児への暴露後、胎児の生殖巣に生じた初期変化は、組織学的に観察することが可能であった。さらに生殖巣あるいは精巣における過剰アポトーシスについては、DES の暴露後の胎児期では対照レベルと差はないが、生後の精巣発達期ならびに生殖細胞分裂・増殖期に顕著に認められることが確認された。

今後、内分泌かく乱化学物質の胎児期暴

露による初期生殖巣変化が成熟後の生殖器官の形態的变化あるいは生殖機能変化とどのように関連するかを結論し、胎児期暴露による生殖巣における初期変化（組織形態変化、Tunel 陽性細胞、Bcl2 発現、熱ショック蛋白レベルなど）を観察し、生後の成熟期にみられる生殖器官の変化との関連を明らかにすることにより、生殖巣の初期形態変化が内分泌かく乱化学物質暴露による adverse な変化であると結論できる。

#### E. 結論

DES、E<sub>2</sub>、EE、TAM あるいは ATZ のマウス胎児期暴露により、生殖巣に生ずる組織変化を短期に検出することができた。したがって、今後性腺構築過程における組織変化を含む形態変化を指標とした傷害性、過剰アポトーシス誘発あるいは熱ショック蛋白レベル上昇などの有無が、内分泌かく乱化学物質の次世代生殖影響を早期かつ短期に検出するエンドポイントになり得るかを結論する必要がある。

#### F. 健康危険情報

得られた研究成果に健康危険に関する情報は無し

#### G. 研究発表(2001-2003)

##### 1. 論文発表

Nagao T., Fujikawa K. Male-Mediated Developmental Toxicity. Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens. Kluwer Academic Publisher (Holes B. ed.), in press.

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.*, **16**: 123-130 (2002).

Nagao T., Yoshimura S., Totsuka Y., Wakabayashi K. Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline. *Human & Exp. Toxicol.*, **21**: 147-151 (2002).

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 (2001).

Kuwagata M., Yoshimura S., Nagao T. Reproductive effects of early neonatal exposure to genistein in Wistar rats. *Cong. Anom.*, **41**: 338-339 (2001).

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

## 2. 学会発表

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. *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**: 723 (Sydney) 2002.

渡辺千朗、桑形麻樹子、長尾哲三、吉村愼介、畔上二郎、小島幸一：生後 1 日からのラット強制経口投与法の検討 日本実験動物技術者協会関東支部第 27 回懇話会（東京）2002

長尾哲三：シンポジウム「化学物質に関する

るリスク評価の最近の話題」ジエチルスチルベストロールの生体影響 第42回日本先天異常学会（浜松）2002.

桑形麻樹子、宗岡克政、渡辺千朗、長尾哲三：ジエチルスチルベストロールのラット新生児期投与による中枢神経系への影響 第42回日本先天異常学会（浜松）2002.

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、白見憲司、齊藤義明、長尾哲三：胎生期 BrdU 曝露による雄出生児の生殖障害 —脳の状態変化— 第

41回日本先天異常学会（横浜）、抄録集 p.129、2001.

Kuwagata M., Muncoka 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）、抄録集 p.392、2001.

H. 知的財産所有権の出願、登録状況  
特許取得および実用新案登録のいずれもなし



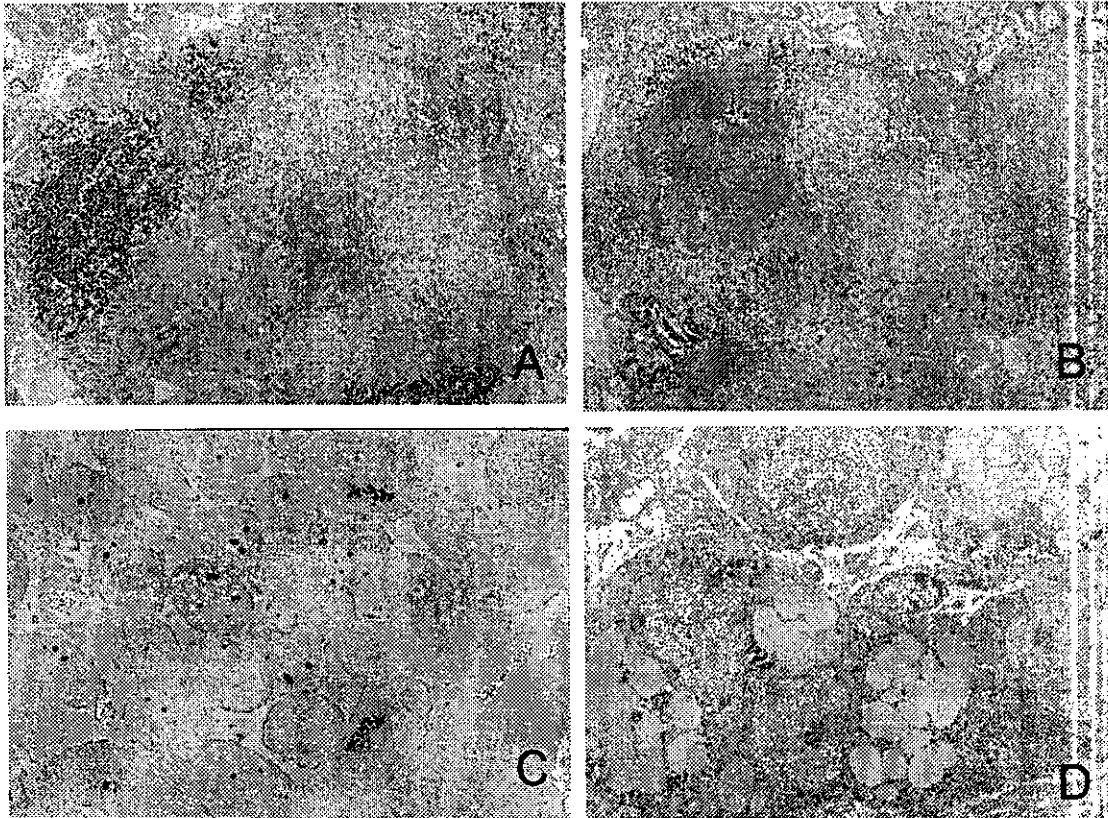


Fig. 1 胎児期の暴露により生殖巣原基にみられた変化  
A: DES暴露により細胞質にみられた脂肪滴; B: DES暴露により細胞質  
にみられたグリコーゲン蓄積; C: DES暴露により新生児にみられたア  
ポトーシス; D: ATZ暴露による脂肪滴の大型化およびグリコーゲン顆  
粒の集簇

## 16. (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 近畿大学工学部生命科学科 発生生物学研究室 教授

### 研究要旨

ラットおよびマウスの妊娠末期に帝王切開により摘出した胎児を、その子宮内着床位置を記録して養母哺育し、生後の発育および分化の程度に着床位置が関連するか否かを検討した。その結果、生殖突起肛門間距離、性成熟（包皮分離、膣開口の時期）、性周期、行動、生殖器官の発達および形態のいずれにも、胎児期の着床位置と関連する変化は観察されなかったことから、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・胎児の着床位置を考慮する必要はないと判断した。

### A. 研究目的

本研究は、ラットあるいはマウスなどの実験動物における胎児の子宮内での着床位置と、生後の発育および分化との関連の有無を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### [実験1] ラットを用いた実験

Sprague-Dawley ラットの妊娠 21 日（膣栓発見日＝妊娠 0 日）に帝王切開して胎児を摘出し、分娩後 1～3 日の母ラットに養母哺育させた。なお、産児の日齢は帝王切開日を生後 0 日と規定した。帝王切開により摘出した胎児は、その着床位置により雄に挟まれた雄（2M）、雌に挟まれた雄（0M）、雄と雌に挟まれた雄（1M）、雌に挟まれた雌（2F）、雄に挟まれた雌（0F）、雌と雄に挟まれた雌（1F）の 6 タイプに分類した。また、帝王切開時に生殖突起肛門間距離（AGD）および体重を測定した。生後 21 日に離乳させ、一部の雄は精巣、精巣上体および前立腺＋精囊の重量を、雌は子宮お

よび卵巣の重量を測定した後、組織検査のために 0.1M 燐酸緩衝 10%ホルマリン液に固定した。残りの雌雄については、生後 35 日から包皮分離の時期を、生後 28 日から膣開口の時期を調べた。また、生後 4～5 週に情動性の変化の有無を観察するためにオープンフィールド試験を、生後 7～8 週に自発運動量を回転ケージを用いて測定した。生後 10 週に屠殺して、雄は精巣、精巣上体、前立腺、精囊の重量を、雌は子宮および卵巣の重量を測定した。

#### [実験2] マウスを用いた実験

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（膣栓発見日＝妊娠 0 日）まで、コーン油あるいは 17- $\alpha$ -エストラジオール（E<sub>2</sub>）0.05  $\mu$ g/kg/day を連日皮下投与した。飼料として CE-2 あるいは植物性エストロゲンを除いて調製された PLD を自由に摂取させた。いずれの雌も妊娠 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(2M)、雌に挟まれた雄(0M)、雌に挟まれた雌(2F)、雄に挟まれた雌(0F)の4タイプのみを、無処置のマウスに養母哺育させた。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日から膣開口の時期を調べ、雌雄とも完成日に体重を測定した。さらに雌については膣開口日から性周期を観察した。生後10週に剖検し、生殖器官(精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣)の重量を測定した。これらの器官および前立腺は0.1M 燐酸緩衝10%ホルマリン液に固定し組織観察を行った。

なお、いずれの実験においても使用した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など苦痛の少ない方法を用いた。

#### C, D. 研究結果および考察

[実験1] 結果はTable 1に示した。AGD、膣開口および包皮分離の時期、生後21日の生殖器官重量、離乳後の行動および運動性、性周期、成熟後の生殖器官重量には、2M、1M および 0M、あるいは 2F、1F および 0F の間に統計学的有意差はみられなかった。さらに生殖器官にも子宮内位置に関連した

変化は観察されなかった。

[実験2] 出生日における体重には雌雄ともPLD 給与群およびCE-2 給与群の間で有意な差はみられず、E<sub>2</sub> 投与の影響もみられなかった。AGDについては、PLD 給与群では差はみられなかったが、CE-2 給与群ではE<sub>2</sub> 投与の影響が雄出生児にみられた。雌の膣開口時期および雄の包皮分離時期には飼料、子宮内位置およびE<sub>2</sub> 投与の影響は確認されなかった。さらに雌の性周期にも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<sub>2</sub> 投与のいずれの影響もみられなかった。これらのことから、マウス胎児では、子宮内で両側に着床する胎児から分泌された性ホルモンの影響により生後の性成熟の時期に差違が生じることはないと考えられた。

#### E. 結論

ラットおよびマウスを用いた実験から、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・胎児の着床位置を考慮する必要はないと判断した。

**Table 1 Effects of prior intrauterine position on postnatal growth, sexual maturation and behavior in Sprague-Dawley rats**

| Group                                | 2M                     | 1M           | 0M           | 2F          | 1F          | 0F          |
|--------------------------------------|------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Anogenital distance (AGD)</b>     |                        |              |              |             |             |             |
| No. of litters                       | 19                     | 27           | 24           | 18          | 29          | 27          |
| No. of pups                          | 36                     | 73           | 43           | 38          | 83          | 41          |
| Body weight (g)                      | 5.6 ± 0.4 <sup>d</sup> | 5.6 ± 0.3    | 5.7 ± 0.4    | 5.2 ± 0.3   | 5.4 ± 0.3   | 5.3 ± 0.4   |
| AGD                                  | 3.23 ± 0.42            | 3.15 ± 0.43  | 3.15 ± 0.38  | 1.36 ± 0.2  | 1.44 ± 0.19 | 1.38 ± 0.24 |
| AGD / Body weight                    | 0.58 ± 0.07            | 0.56 ± 0.08  | 0.56 ± 0.07  | 0.26 ± 0.04 | 0.27 ± 0.03 | 0.26 ± 0.04 |
| AGD / $\sqrt[3]{\text{Body weight}}$ | 1.82 ± 0.22            | 1.77 ± 0.24  | 1.77 ± 0.20  | 0.78 ± 0.12 | 0.82 ± 0.11 | 0.79 ± 0.13 |
| <b>Sexual maturation</b>             |                        |              |              |             |             |             |
| No. of litters                       | 18                     | 27           | 24           | 17          | 27          | 25          |
| No. of offspring                     | 21                     | 32           | 30           | 23          | 36          | 26          |
| Day of vaginal opening               | 43.3 ± 1.3             | 43.4 ± 1.2   | 44.0 ± 1.8   | —           | —           | —           |
| Day of preputial separation          | —                      | —            | —            | 33.8 ± 2.2  | 33.8 ± 1.8  | 34.1 ± 1.7  |
| <b>Organ weight on PND 21</b>        |                        |              |              |             |             |             |
| No. of litters                       | 11                     | 24           | 11           | 10          | 25          | 11          |
| No. of offspring                     | 13                     | 37           | 11           | 14          | 43          | 12          |
| Body weight (g)                      | 40.9 ± 6.3             | 40.5 ± 6.5   | 40.2 ± 9.6   | 38.8 ± 6.3  | 38.2 ± 7.0  | 40.7 ± 7.0  |
| Testes (mg) <sup>a</sup>             | 169.3 ± 27.5           | 172.2 ± 22.2 | 164.9 ± 26.1 | —           | —           | —           |
| Testes <sup>b</sup>                  | 416.3 ± 48.4           | 429.2 ± 40.3 | 418.2 ± 46.7 | —           | —           | —           |
| Epididymides (mg) <sup>a</sup>       | 23.3 ± 3.1             | 23.5 ± 4.8   | 21.9 ± 4.4   | —           | —           | —           |
| Epididymides <sup>b</sup>            | 60.5 ± 10.8            | 58.2 ± 7.8   | 55.2 ± 7.0   | —           | —           | —           |
| Prostate + S.V. (mg) <sup>a,c</sup>  | 47.2 ± 9.9             | 46.7 ± 10.3  | 45.9 ± 7.9   | —           | —           | —           |
| Prostate + S.V. <sup>b,c</sup>       | 115.6 ± 18.0           | 115.7 ± 19.0 | 117.2 ± 19.5 | —           | —           | —           |
| Ovaries (mg) <sup>a</sup>            | —                      | —            | —            | 24.3 ± 4.0  | 22.9 ± 3.9  | 24.8 ± 3.6  |
| Ovaries <sup>b</sup>                 | —                      | —            | —            | 63.5 ± 10.1 | 60.8 ± 9.5  | 61.5 ± 7.3  |
| Uterus (mg) <sup>a</sup>             | —                      | —            | —            | 10.2 ± 2.0  | 11.2 ± 3.7  | 11.8 ± 2.9  |
| Uterus <sup>b</sup>                  | —                      | —            | —            | 26.4 ± 4.5  | 28.8 ± 6.8  | 29.1 ± 6.0  |

Table 1 (continued-1)

| Group                     | 2M            | 1M            | 0M            | 2F            | 1F             | 0F            |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| <b>Behavioral tests</b>   |               |               |               |               |                |               |
| Open field                |               |               |               |               |                |               |
| No. of litters            | 18            | 27            | 24            | 17            | 27             | 24            |
| No. of offspring          | 18            | 27            | 24            | 17            | 27             | 24            |
| Latency (sec.)            | 20.4 ± 40.8   | 17.9 ± 16.9   | 15.3 ± 16.2   | 12.0 ± 9.4    | 13.8 ± 12.3    | 16.9 ± 36.1   |
| Ambulation (cm)           | 676.3 ± 411.3 | 627.1 ± 417.2 | 659.0 ± 501.9 | 940.6 ± 538.1 | 1039.8 ± 436.3 | 970.7 ± 449.8 |
| No. of rearing            | 2.3 ± 3.1     | 3.0 ± 3.2     | 1.5 ± 1.4     | 3.5 ± 2.1     | 4.5 ± 3.4      | 3.8 ± 2.3     |
| No. of grooming           | 0.6 ± 0.9     | 0.7 ± 0.7     | 1.1 ± 1.2     | 0.8 ± 0.9     | 0.4 ± 0.5      | 0.8 ± 0.8     |
| No. of defecation         | 2.8 ± 1.9     | 2.1 ± 1.5     | 3.3 ± 2.2     | 1.9 ± 1.9     | 1.7 ± 1.8      | 1.8 ± 1.9     |
| No. of urination          | 0.4 ± 0.6     | 0.4 ± 0.6     | 0.5 ± 0.5     | 0.2 ± 0.4     | 0.5 ± 0.5      | 0.7 ± 0.6**   |
| Spontaneous activity      |               |               |               |               |                |               |
| Count / 24 hours          | 1547 ± 467    | 1789 ± 697    | 1559 ± 638    | 4107 ± 1140   | 4429 ± 1501    | 4746 ± 1831   |
| <b>Estrous cycle</b>      |               |               |               |               |                |               |
| No. of litters            | —             | —             | —             | 17            | 27             | 25            |
| No. of offspring          | —             | —             | —             | 23            | 36             | 26            |
| Mean estrous length (day) | —             | —             | —             | 4.16 ± 0.29   | 4.08 ± 0.30    | 4.20 ± 0.42   |
| No. of females showing    |               |               |               |               |                |               |
| regular cycle (%)         | —             | —             | —             | 18 (78.3)     | 28 (77.8)      | 21 (80.8)     |
| 4-day cycle               | —             | —             | —             | 11 (47.8)     | 26 (72.2)      | 17 (65.4)     |
| 5-day cycle               | —             | —             | —             | 5 (21.7)      | 2 ( 5.6)       | 4 (15.4)      |
| 4/5-day cycle             | —             | —             | —             | 2 ( 8.7)      | 0 ( 0.0)       | 0 ( 0.0)      |
| No. of females showing    |               |               |               |               |                |               |
| irregular cycle (%)       | —             | —             | —             | 5 (21.7)      | 8 (22.2)       | 5 (19.2)      |
| 4/other-day cycle         | —             | —             | —             | 2 ( 8.7)      | 4 (11.1)       | 2 ( 7.7)      |
| 3/4-day cycle             | —             | —             | —             | 1 ( 4.3)      | 1 ( 2.8)       | 0 ( 0.0)      |
| 3/4/5-day cycle           | —             | —             | —             | 2 ( 8.7)      | 3 ( 8.3)       | 2 ( 7.7)      |
| 3/4/5/other-day cycle     | —             | —             | —             | 0 ( 0.0)      | 0 ( 0.0)       | 1 ( 3.8)      |

Table 1 (continued-2)

| Group   | 2M           | 1M           | 0M           | 2F           | 1F           | 0F           |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Organ weight at 10 weeks old</b>                 |              |              |              |              |              |              |
| No. of litters                                      | 18           | 27           | 23           | 17           | 27           | 25           |
| No. of offspring                                    | 18           | 27           | 23           | 17           | 27           | 25           |
| Body weight (g)                                     | 417.2 ± 31.6 | 416.1 ± 34.4 | 413.6 ± 36.9 | 270.0 ± 23.2 | 271.8 ± 28.9 | 273.6 ± 29.1 |
| Testes (mg) <sup>a</sup>                            | 3.00 ± 0.20  | 2.98 ± 0.15  | 3.00 ± 0.17  | —            | —            | —            |
| Testes <sup>b</sup>                                 | 0.72 ± 0.05  | 0.72 ± 0.06  | 0.73 ± 0.07  | —            | —            | —            |
| Epididymides (mg) <sup>a</sup>                      | 0.77 ± 0.05  | 0.78 ± 0.07  | 0.76 ± 0.06  | —            | —            | —            |
| Epididymides <sup>b</sup>                           | 0.19 ± 0.01  | 0.19 ± 0.02  | 0.18 ± 0.02  | —            | —            | —            |
| Ventral prostate (g) <sup>a</sup>                   | 0.46 ± 0.08  | 0.44 ± 0.08  | 0.43 ± 0.10  | —            | —            | —            |
| Ventral prostate <sup>b</sup>                       | 0.11 ± 0.02  | 0.11 ± 0.02  | 0.11 ± 0.03  | —            | —            | —            |
| S.V. <sup>c</sup> +dorsal prostate (g) <sup>a</sup> | 1.53 ± 0.28  | 1.56 ± 0.24  | 1.52 ± 0.27  | —            | —            | —            |
| S.V. <sup>c</sup> +dorsal prostate <sup>b</sup>     | 0.37 ± 0.07  | 0.38 ± 0.05  | 0.37 ± 0.07  | —            | —            | —            |
| Ovaries (mg) <sup>a</sup>                           | —            | —            | —            | 92.6 ± 13.3  | 91.8 ± 13.7  | 95.4 ± 16.9  |
| Ovaries <sup>b</sup>                                | —            | —            | —            | 34.3 ± 3.6   | 33.8 ± 3.4   | 35.0 ± 5.8   |
| Uterus (g) <sup>a</sup>                             | —            | —            | —            | 0.36 ± 0.06  | 0.38 ± 0.06  | 0.38 ± 0.05  |
| Uterus <sup>b</sup>                                 | —            | —            | —            | 0.13 ± 0.02  | 0.14 ± 0.03  | 0.14 ± 0.02  |

a, absolute weight; b, relative weight (g or mg per 100g body weight); c, seminal vesicle; d, mean ± S.D.

2M, male fetus between two male fetuses; 1M, male fetus between male fetus and female fetus; 0M, male fetus between two female fetuses;

2F, female fetus between two female fetuses; 1F, female fetus between male fetus and female fetus; 0F, female fetus between two male fetuses.

\*\*, significantly different from group 2F,  $P < 0.01$  (by Multiple comparison and Student t-test)

—, Not examined

## 16. (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

研究者 長尾 哲二 近畿大学理工学部生命科学科 発生生物学研究室 教授

### 研究要旨

胎児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、視床下部における神経細胞の過剰アポトーシスならびにその誘発に関連する遺伝子発現、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（神経核体積の画像解析による測定）による影響評価法に替わる方法の可能性を探っている。これまで DES の新生児期暴露後の視床下部における熱ショック蛋白レベル、アポトーシス関連遺伝子発現などについて検討した。さらに今年度は、新生児期の DES を暴露したラットの脳の各部位におけるモノアミン濃度の変動についても検討した。

### A. 研究目的

脳における組織形態の代表的なものとして、皮質構造と神経核構造が挙げられる。神経核構造を示す領域は、大脳基底部、視床下部、視床、前視蓋、被蓋、橋などに広く認められ、神経核構造は脳における主要な組織形態であるといえる。神経核は、特定の形質を持った神経細胞が集まって構成されており、各神経核は特定の神経機能に関わる。そこで、本研究では、胎児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し、生殖行動に関与すると考えられている性的二型核や前腹側脳室周囲核をはじめとする神経核の形成に及ぼす影響を、細胞生物学的あるいは神経化学的に検討し、神経核の構造変化が成熟後の生殖影響と如何に関連しているかを考察し、最終的には、視床下部における熱ショック蛋白レベル、アポトーシス関連遺伝子発現、脳内モノアミンの変動な

どが、神経核の形態変化の観察（体積変化）に替わり、視床下部神経核構築に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響を検出するエンドポイントになり得るかを結論する。

### 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 1~5 日（出生日=生後 0 日と規定）に連続して、ジエチルスチルベステロール (DES) の 0、1、10、50 あるいは 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を背部に皮下注射した。最終投与の 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はパラフィン包埋後に切片を作成し、Tunel 法に準拠してアポトーシス細胞を観察し、さらに Bcl2 について免疫染色をした。残りの雄出生児も同様に屠殺して脳を摘出

し、視床を含む部位を液体窒素にて凍結して Hsp ウェスタンブロッティングによる検討を実施した。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 Hsp90 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 0.025M トリス-0.19M 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ティングした。ブロッティング後の免疫化学染色は、転写膜に 1 次抗血清 monoclonal anti-Hsp90 で 37°C、Ig 37°C、30 分間感作させ、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。③脳の各部位に対する内分泌かく乱化学物質の神経伝達系への影響を検討する目的で、生後 1~5 日に連続して DES の 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を背部に皮下注射して、成熟させ生後 10 週に断頭にて屠殺して脳を摘出し、氷上にて大脳皮質前頭部、線条体、海馬、中脳および視床下部に分離した。ドパミン (dopamine:DA)、セロトニン (5-hydroxytryptamine:5-HT) およびそれらの代謝物 (dihydrophenylacetic acid:DOPAC、homovanilic acid:HVA、5-hydroxy-3-indolacetic acid:5-HIAA) を HPLC-ECD を用いて測定した。

なお、使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは断頭など苦痛の少ない方法を用いた。

### C. 研究結果

\_Tunel 法による視床下部の過剰アポトーシスの観察では、DES 暴露群の雄新生児の

SDN-POA 部位に Tunel 陽性細胞の増加が認められたが、雌新生児では逆にアポトーシスは抑制された (Fig. 1)、Bel 2 の発現は観察されなかった。\_DES 投与群 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) と対照群の新生児の視床下部について免疫化学的染色法による Hsp90 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 Hsp90 のタンパクとして同定された。Hsp 90 は、DES 投与群に明瞭な反応産物が認められたことから、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。③大脳皮質前頭部の DA 濃度が DES の投与により有意に減少し、DOPAC 濃度も減少傾向を示した。また、代謝率 (DOPAC/DA) が DES 投与群では有意に増加した。5-HT 濃度が DES 投与により有意に減少したが、代謝率 (5-HIAA/5-HT) には DES 投与の影響は認められなかった。視床下部では DES 投与により DA および DOPAC 濃度の増加傾向、5-HT 濃度の減少傾向およびその代謝率が有意に増加した (Fig. 2)。線条体、海馬および中脳のモノアミン濃度には DES 投与の影響は認められなかった。

### D. 考察

ラット新生児への DES 暴露により視床下部に 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、DES 投与において認められる性分化過程にある視床下部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推測された。Tunel 法による視床下部の過剰アポトーシスの観察では、DES 暴露群の新生児



の SDN-POA 部位に Tunc1 陽性細胞の増加が認められたことから、DES の新生児期暴露による SDN-POA の体積減少には過剰アポトーシスが関与しているものと推察されたが、Bcl 2 の関与はないと判断された。脳内モノアミンの脳の各部位における変化については、視床下部において DA 伝達系の増加傾向が認められたことから、神経内分泌系への DES 新生児暴露の影響が考えられる。DES 誘発性高プロラクチン(PRL)血症が報告されているが、本研究でみられた DA、DOPAC 濃度の上昇は PRL 分泌抑制を示唆することからフィードバック機構が働いていると考えられる。大脳皮質前頭部における DA および 5-HT 伝達系の抑制は性行動の減弱、多動などの行動異常と何らかの関連があるものと思われる。DES 暴露により、5-HT レプター機能は間接的に減退し、DES 誘発性 5-HT 伝達系の抑制は雄の攻撃性の減弱と関連があると考えられている。DA 濃度の減少から運動量の増加が推測されたが、今回、DES 暴露により立ち上がり回数の増加のみが確認された。これらのことから、ラットの新生児期の DES 暴露は、成熟後に脳内神経伝達系、特に視床下部と大脳皮質の機能異常を招来すると考えられる。

視床下部に位置する神経核形成への内分泌かく乱化学物質の影響を、神経核の体積測定など形態変化を指標として評価することは、これまでの研究から非常に困難であることは明らかである。そこで、本研究では、神経核構築過程における視床下部傷害性を過剰アポトーシス誘発、熱ショック蛋白レベル、あるいは脳内モノアミン変動などを新たなエンドポイントとして検討し、

内分泌かく乱化学物質の次世代児神経核への影響を早期かつ短期に検出することが可能か否かを検討し、これらエンドポイントの可能性を確認した。

## E. 結論

DES 暴露群の新生児の SDN-POA 部位ではアポトーシス像の増加、視床では Hsp90 のタンパク増加、成熟後に脳内モノアミンの変動がみられ、脳内神経伝達系、特に視床下部と大脳皮質の機能異常を招来することが推察された。これらのことから視床下部における Hsp レベル、アポトーシス関連遺伝子発現、脳内モノアミンの変動などが、視床下部神経核の形態変化の観察（体積変化）に替わり、視床下部神経核構築に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響を検出するエンドポイントになり得ると考えられる。

## F. 健康危惧情報

得られた研究成果に健康危惧に関する情報は無し

## G. 研究発表(2001-2003)

### 1. 論文発表

Nagao T., Fujikawa K. Male-Mediated Developmental Toxicity. Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens. Kluwer Academic Publisher (Holes B. ed.), in press.

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.*, **16**: 123-130 (2002).

Nagao T., Yoshimura S., Totsuka Y., Wakabayashi K. Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline. *Human & Exp. Toxicol.*, **21**: 147-151 (2002).

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 (2001).

Kuwagata M., Yoshimura S., Nagao T. Reproductive effects of early neonatal exposure to genistein in Wistar rats. *Cong. Anom.*, **41**: 338-339 (2001).

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

## 2. 学会発表

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. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19: 723 (Sydney) 2002.

渡辺千朗、桑形麻樹子、長尾哲二、吉村慎介、畔上三郎、小島幸一：生後 1 日からのラット強制経口投与法の検討 日本実験動物技術者協会関東支部第 27 回懇話会（東京）2002

長尾哲二：シンポジウム「化学物質に関するリスク評価の最近の話題」ジエチルスチルベストロールの生体影響 第 42 回日本先天異常学会（浜松）2002.

桑形麻樹子、宗岡克政、渡辺千朗、長尾哲

三：ジエチルスチルベストロールのラット  
新生児期投与による中枢神経系への影響  
第42回日本先天異常学会（浜松）2002.

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、田見憲司、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）、抄録集 p.129、

2001.

Kuwagata M., Muncoka 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）、抄録集 p.392、2001.

H. 知的財産所有権の出願、登録状況  
特許取得および実用新案登録のいずれも  
なし

Male

Female

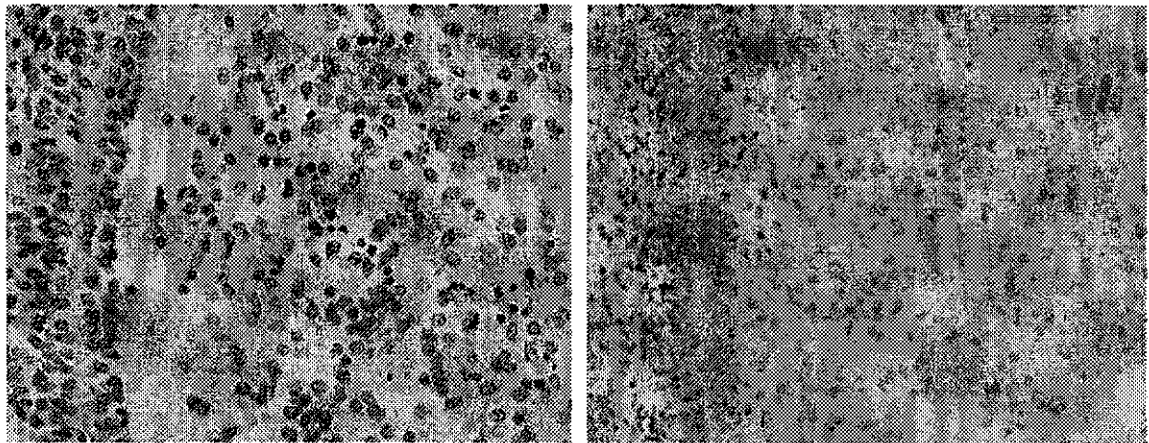


Fig.1 DES 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ をラットの生後4日に皮下投与し、視床下部を24時間後に観察 (Tunel陽性細胞を指標)

A:アポトーシスの誘発 ; B:アポトーシスの抑制