

量反応性>

EE 単回投与後の子宮重量の用量反応性を検討するために、幼若雌性ラットにEEを0.3、1および3 μ g/kgの用量で単回強制経口投与し、投与後24時間に子宮重量を測定した。子宮重量は、EE 1 μ g/kg以上の群で溶媒群に対して有意な高値が認められた。溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg群で1.27、EE 1 μ g/kg群で1.61およびEE 3 μ g/kg群で2.09であった。

ER antagonist に対する子宮重量の反応性を検討するために、EEを3 μ g/kgの用量で単回強制経口投与した直後にICIを1mg/kgの用量で単回強制経口投与した群では、EE 3 μ g/kg群に対して有意な低値が認められた (EE 3 μ g/kg群の0.61倍、溶媒群の1.28倍)。

<実験3: GEN および MXC 単回経口投与後の子宮重量の用量反応性>

GEN およびMXC 単回投与後の子宮重量の用量反応性を検討するために、幼若雌性ラットにGEN (10、100mg/kg) およびMXC (30、300mg/kg) を単回強制経口投与し、投与後24時間に子宮重量を測定した。GEN群の子宮重量の溶媒群に対する割合は、GEN 10mg/kg群で1.19倍、GEN 100mg/kg群で1.75倍であり、GEN 100mg/kg群で溶媒群に対して有意な高値が認められた。MXC群の子宮重量の溶媒群に対する割合は、MXC 30mg/kg群で1.27倍、MXC 300mg/kg群で2.25倍であり、MXC 30mg/kg以上の群で溶媒群に対して有意な高値が認められた。

<実験4: EE、GEN、MXC および ICI の複合影響>

子宮重量の溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg群で1.10倍、GEN 10mg/kg群で0.99倍、MXC 30mg/kg群で1.17倍、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg群で1.28倍、EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg群で1.35倍、GEN

10mg/kg + MXC 30mg/kg群で1.35倍、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg群で1.40倍であった。単独投与では、EE 0.3 μ g/kg群、GEN 10mg/kg群およびMXC 30mg/kg群のいずれにおいても有意な変化は認められなかった。しかし、それらの混合物を投与したEE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg群、EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg群、GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg群、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kgのいずれにおいても、有意な高値が認められた。EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg + ICI 10mg/kg群の子宮重量は、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg群に対して有意な低値 (0.60倍) が認められた。子宮におけるC3 mRNAの発現量の溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg群で1.26倍、GEN 10mg/kg群で1.20倍、MXC 30mg/kg群で3.51倍、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg群で2.69倍、EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg群で3.93倍、GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg群で3.98倍、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg群で5.43倍であった。単独投与では、MXC 30mg/kg群では有意な高値がみられたものの、EE 0.3 μ g/kg群およびGEN 10mg/kg群では有意な差は認められなかった。しかし、それらの混合物を投与したGEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg群およびEE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 3mg/kg群において、有意な高値が認められた。EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg + ICI 10mg/kg群の子宮におけるC3 mRNAの発現量は、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg群に対して有意な低値 (0.17倍) が認められた。

子宮におけるWnt7a mRNAの発現量の溶媒群に対する割合は、EE 0.3 μ g/kg群で0.97倍、GEN 10mg/kg群で1.07倍、MXC 30mg/kg群で0.73倍、EE 0.3 μ g/kg + GEN 10mg/kg群で0.78倍、EE 0.3 μ g/kg + MXC 30mg/kg群で0.68倍、GEN 10mg/kg +

MXC 30mg/kg 群で0.59倍、EE 0.3 μg/kg + GEN 10 mg/kg + MXC 30 mg/kg 群で0.64倍であった。単独投与では、EE 0.3 μg/kg 群、GEN 10mg/kg 群およびMXC 30mg/kg 群のいずれにおいても有意な変化は認められなかった。しかし、それらの混合物を投与したEE 0.3 μg/kg + MXC 30mg/kg 群、GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群およびEE 0.3 μg/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg において、有意な低値が認められた。EE 0.3 μg/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg + ICI 10mg/kg 群の子宮におけるWnt7a mRNAの発現量は、EE 0.3 μg/kg + GEN 10mg/kg + MXC 30mg/kg 群に対して有意な高値(2.07倍)が認められた。

永井賢司；国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討

OECD Validation phase 2の詳細な解析結果(mini-monograph "The OECD Validation of the Uterotrophic Bioassay")を中心に問題点を抽出し、その解決策を検討した。

1) 飼料中の植物性エストロゲンの影響

飼料中のtotal genistein equivalent (TGE)含量の高い飼料(TGE摂取量が50 mg/kg/day以上)では、ベースとなる対照群の子宮重量が高値を示し、BPAおよびNPの反応性が低下していた。TGEは各飼料内でも大きなロット間差が認められた。体重あたり摂取量が、幼若ラットではOVX-adultラットの約2倍である。

2) 動物種および系統

OECD validationでは主としてSprague-DawleyおよびWistar由来のラットが用いられたが、系統の違いによる影響は認められなかった。マウスの系統差については、CD-1、C57B16、AlpkおよびB6CBF1系を比較したAshbyらの報告のみである。ラットとマウスの比較では、いずれも同様な用量反応性を示している。

マウスを使用する利点として、被験物質が少量で済むこと、飼育スペースが小さくて済む

こと、遺伝子発現変化に関する解析をする上で遺伝子情報が豊富であるという利点がある。

3) false positive および false negative

phase 2において、ブラインドで実施した単一用量試験の中で陰性対照としてdibutylphthalate (DBP)が使用された3/36試験でfalse positiveが見られた(約8%)。

子宮重量の他、オプションとして膈の角質化、子宮内膜の病理組織学的検査等を実施し、それらの結果を総合して判断することも一つの対応策と考えられる。

松島裕子；卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究

1) 子宮重量は、投与2時間後ではE₂、BPA、GEN、BPA+GENの組み合わせは、対照群と変わらなかった。一方、投与24時間後ではE₂、BPA、GEN、BPA+GEN群はいずれも増加した。一方、BPAあるいはGEN単独投与に比し、BPA+GEN群ではわずかに減少したが、有意差はなく、相加的であった。

2) GeneChipによる解析

遺伝子発現はflagをPとMに絞り、発現量が少なすぎるもの、再現性の悪い遺伝子を除去し、11938遺伝子を解析に用いた。

①Scatter plotにてX軸にBPA、Y軸にBPA+GEN投与群を置き、遺伝子発現が1.5倍以上あるいは0.67以下の遺伝子を得た。その結果、BPA+GENの組み合わせで発現が1.5倍以上なる遺伝子は、2時間、24時間で各々370、356遺伝子であった。②同様に、GENに対して、BPA+GENで発現が1.5倍以上なる遺伝子は、2時間、24時間で各々168、166遺伝子であった。更に、①②で共通する遺伝子をvenn diagramで合わせた結果、2時間、24時間で各々28、40遺伝子であった。

spikeで絶対量化した遺伝子発現量は、2時間に比し、24時間が顕著に上昇した。

吉村慎介；内分泌かく乱化学物質の胎生期暴露による包皮分離への影響

(1) 生殖器奇形の発生

VZ暴露では出生後の雄に尿道下裂が発生した。VZの100 mg/kgをGD 14~17に暴露

した群の 20 例中 17 例に陰茎および包皮の形成不全（陰茎裂および包皮裂）がみられ、尿道下裂を伴っていたが、GD 18~21 暴露群に異常は見られなかった。陰茎の形成不全は腹側面にみられ、外尿道口は陰茎腹側面に開口していた。正常動物の包皮分離は、陰茎亀頭先端の背側面に始まり、陰茎亀頭腹側面の分離が終了すると完了するが、尿道下裂例では陰茎亀頭腹側面の形成不全により、包皮分離の判定ができなかった。EE および TAM 暴露群に尿道下裂はみられなかった。

精巣が陰嚢内に下降せず腹部皮下に位置する異所性精巣が、VZ を GD 14~17 あるいは GD 18~21 に暴露した群にみられ、いずれも片側性であった。前立腺の低形成あるいは無形成が VZ の GD 14~17 暴露群に認められた。

(2) 包皮分離の観察

包皮分離の判定は、尿道下裂例を除いて行った。その結果、VZ 暴露では尿道下裂例を除くと、いずれの群にも有意な遅延はなかった。EE では、いずれの暴露時期においても包皮分離に変化はみられなかった。TAM は 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群も試みたが、妊娠雌が死亡し、出生児を得ることはできなかった。TAM 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の GD 14~17 群でも 4 例中 2 例の妊娠雌が死亡した。出生した雄の包皮分離に有意な差はなかった。

(3) AGD の測定

AGD は体重補正值($\text{mm}^3/\sqrt{\text{g}}$)で比較した。その結果、VZ では GD 14~17 暴露群の 10 mg/kg 以上の全群および GD 18~21 暴露群の 100 mg/kg 群で有意に短縮した。EE では GD 18~21 に暴露した 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群に有意な伸長がみられたが、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群に有意な差はなかった。TAM 暴露群に有意な変化はなかった。

AGD と同時に測定した 6 日齢の体重は、各化学物質で対照群より有意な高値あるいは低値がみられたが、いずれも用量依存性はなかった。

(4) 器官重量の測定

絶対および相対重量（比体重値）は同様の傾向を示したため相対重量を表に示し、以下には相対重量の結果を示す。VZ では GD 14~17 に暴露した 100 mg/kg 群の前立腺の相対重量が有意な低値を示した。EE では GD 18~21 に暴露した 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の精巣上体の相対重量が有意な高値を示した。TAM では GD 14~17 に暴露した 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の精嚢の相対重量が有意な低値を示した。その他の群に有意な変化はなかった。

(5) 組織所見

包皮分離は、陰茎亀頭と周囲の包皮組織との境界に形成された上皮層を構成する細胞が、未熟な細胞群から重層扁平上皮へと分化し、亀頭表面の多数の乳頭状突起表面が角化し、角化層が亀頭表面および包皮内面に広がると完了する。しかし、尿道下裂が発生した例では亀頭背側面には上皮層が形成されて、解剖時には角化重層扁平上皮となっていたが、亀頭腹側面に上皮層の形成はなく、包皮と亀頭との分離が認められなかった。

異所性精巣がみられた例では、異所性を示した側の精巣に著しい精細管萎縮があった。

吉村慎介；内分泌かく乱化学物質の新生児期暴露による包皮分離への影響

(1) 包皮分離の観察

FLU および VZ を PND 1~5 に投与した群では、いずれの物質でも包皮分離完了時期に変化はみられなかった。一方、PND 35~39 に投与した群では、FLU は 10 mg/kg 以上、VZ は 30 mg/kg 以上の群で包皮分離完了時期の有意な遅延が認められた。FLU および VZ の PND 17~21 暴露群に有意な遅延はみられなかった。

DES では PND 1~5 に暴露した 100 および 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で有意な遅延が認められ、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の 16 例中 2 例、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の 16 例中 3 例は PND 56 の解剖時にも分離は完了しなかった。また、DES では PND 35~39 に暴露した 100 および 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で有意な遅延がみられた。PND 17~21 暴露では変化はみられなかった。

EE および TAM ではいずれも PND 1~5 の暴露で明らかな遅延が認められ、EE は全ての群で遅延し、10 μ g/kg 群の 12 例中 1 例および 100 μ g/kg 群の 12 例中 10 例は解剖時にも分離が完了しなかった。TAM の PND 1~5 暴露では 1 および 3 mg/kg 群で有意差がみられ、1 mg/kg 群の 16 例中 5 例および 3 mg/kg 群の 15 例中 13 例が解剖時にも完了しなかった。TAM の 0.3 mg/kg 群では有意差は示さなかったが軽度な遅延があり、16 例中 2 例は解剖時にも分離が完了しなかった。しかし、EE および TAM では PND 17~21 および PND 35~39 暴露による影響は認められなかった。包皮分離完了時の体重は、包皮分離に遅延がみられた群で高値を示す傾向があった。

(2) 器官重量の測定

絶対および相対重量（比体重値）は同様の傾向を示したため相対重量を表に示し、以下には相対重量の結果を示す。FLU では PND 35~39 に暴露した 30 mg/kg 群の精巣上体、前立腺および精嚢の相対重量が有意な低値を示し、10 mg/kg でも精嚢の相対重量が有意な低値を示したが、他の暴露時期に変化はみられなかった。VZ では PND 1~5 に暴露した 10 mg/kg 群の精巣上体の相対重量が有意な低値を示したが用量依存性はなく、他の群および暴露時期に有意な変化はみられなかった。

DES では PND 1~5 に暴露した各用量群の前立腺および 300 μ g/kg 群の精嚢の相対重量が有意な低値を示した。また DES の PND 1~5 暴露の精巣上体、PND 17~21 暴露の精巣および精巣上体に有意な低値がみられたが、用量依存性はなかった。PND 35~39 暴露群に変化はみられなかった。

EE では PND 1~5 暴露で体重増加の抑制および測定した各器官の相対重量の低下がみられたが、その他の暴露時期では、PND 35~39 に暴露した 100 μ g/kg 群の前立腺の相対重量が有意な低値を示したほかに変化はなかった。TAM でも PND 1~5 暴露で体重増加の抑制および測定した各器官の相対重量の低下が明らかであったが、その他の暴露時期では、PND 35

~39 に 3 mg/kg を暴露した群で体重の有意な低値がみられ、同群の精巣上体の相対重量が有意な高値を示したほかに変化はなかった。

(3) 組織所見

包皮分離は、陰茎龟头と周囲の包皮組織との境界に形成された上皮層を構成する細胞が、未熟な細胞群から重層扁平上皮へと分化し、龟头表面の多数の乳頭状突起表面が角化し、角化層が龟头表面および包皮内面に広がると完了する。DES や EE、TAM の PND 1~5 暴露で生じた包皮分離未完例では、陰茎龟头腹側面の上皮層が部分的に不連続となり、包皮と癒着している例があった。その他、精巣や副生殖器に相対重量の低値がみられたこれらの群では、いずれの器官も萎縮性であったが顕著な変化は認められなかった。

武吉正博；28 日間試験の改良 - α_{2U} グロブリン評価の利用について

TestLiver 培養後、経時的に培地を採取し、AUG の産生を ELISA 法にて確認したところ、経時的な AUG の蓄積が観察され、AUG を産生することが確認された。同 TestLiver を同一培養条件にて E_2 10^{-10} M、 10^{-11} M 及び Clofibrate 10^{-6} M、 10^{-7} M を作用させた場合、いずれも培養上清中の AUG 分泌量には明らかな変動は示さなかった。本実験に使用した細胞から得られた total RNA を Template として蛍光標識 cDNA (Cy3, Cy5) を作製し Agilent 社製 glass cDNA microarray を用いて網羅的に遺伝子の変動を観察した結果、 E_2 10^{-10} M 及び Clofibrate 10^{-6} M で細胞中の mRNA レベルでは AUG は有意に減少していた。また、rat senescence marker protein 2 (SMP-2) の発現量は E_2 及び Clofibrate のいずれの暴露でも増加が認められた。

山崎寛治；国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討

OECD Validation phase 2 試験の一環として、国内の 7 試験機関において Hershberger 試験を実施し、2003 年の OECD、学会（ユーロトックス）に日本のデータとして報告、発表

した。

日本で実施した androgen agonist である methyltestosterone、antagonist である vinclozolin、*p,p'*-DDE の結果について、各機関間における本質的な差は認められなかった。また、antagonist 検出系で Testosterone propionate (TP) について 0.2mg/kg/day を使用したが（日本を除く機関では 0.4mg/kg/day を使用）、影響の検出に問題ないものと考えられた。しかし、この TP の用量については今後の世界的に実施されている phase 2 試験のデータを含め議論されるべきと考えられた。また、器官別の反応性ではどの器官の反応性が良好であるかは、一律には決定できないと考えられた。

平成 15 年度に公表された論文、学会発表について調査した結果、androgen receptor binding assay と Hershberger 試験との相関性は本質的に良好であったが、一部の物質においては必ずしも両試験の結果は一致せず、receptor binding assay で affinity がみられたが Hershberger 試験で陰性の物質もあった。更に estrogen 物質が Hershberger 試験で陽性の反応を示している例、Hershberger 試験を実施したところ、内分泌かく乱物質の中には甲状腺機能を傷害する物質がみられたとの報告がある。

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

高木篤也；臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析

昨年度まで、E₂による子宮、肝臓、腎臓、視床下部、海馬の遺伝子発現変動について検討した。今年度は、他の化合物について、臓器毎に遺伝子発現変化を検討した。目的は、(1) 網羅的遺伝子発現解析によるエストロゲン様作用判定の可否；子宮を対象に検討、(2) 子宮以外の臓器に対する化合物による遺伝子発現変動の比較、に絞った。化合物としては、BPA、GEN を選び、投与濃度は各々 70mg/kg、25mg/kg とし、DMSO を 10%含むコーンオイルを溶媒として用い、皮下投与した。この濃度は E₂ 0.3 μg/kg と同等の子宮肥大反応を示

す濃度として選んだ。投与後のサンプリング時間は 2 時間、24 時間とし、投与後早期と後期のパターンを解析した。

1) 子宮における BPA、GEN の遺伝子発現変動比較

子宮における BPA、GEN による遺伝子発現変動を検討した。両化合物共に 2 時間、24 時間で多数の遺伝子に発現変動を示した。特に、24 時間では RNA 合成が全体的に亢進していることを示す結果（大多数の遺伝子発現シグナル値が上昇）が得られた。また、昨年度までの検討で明らかになった E₂ によって子宮で早期に発現が変動する遺伝子群 (VEGF、c-Fos 様の反応) が、2 時間で発現変動を示した遺伝子群に多数含まれており、BPA、GEN はエストロゲン様作用を子宮で発揮していることが遺伝子発現プロファイルの面からも示唆された。ただし、発現変動が BPA、GEN の間で異なる遺伝子も見いだされ、これらの遺伝子が BPA、GEN 特有の作用を担う可能性もあり注目された。

2) 子宮以外の臓器における BPA、GEN による遺伝子発現変化

次に、他の臓器、肝臓、腎臓、視床下部、海馬、での遺伝子発現変動解析を行った。その結果、BPA、GEN は今回の実験条件においては肝臓、腎臓に対してほとんど発現変化を引き起こさないことが明らかとなった。海馬、視床下部に対しては少数の遺伝子の発現変化を引き起こした。特に海馬では BPA、GEN ともに Transthyretin の発現上昇が 24 時間で見いだされた。以下で、各臓器についての解析結果を補足する。

1) 肝臓

BPA、GEN ともに 2 時間、24 時間で大きく発現変動する遺伝子は見いだされなかった。BPA の 24 時間で少数の遺伝子群の発現が上昇していた。これらには、thyroid hormone responsive SPOT14 homolog、serum amyloid A2、cytochrome P450 3a41、lipocalin 2、orosomucoid 2、fatty acid binding protein 5、methionine adenosyltransferase II alpha 等が含まれていた。なお、GEN の 24 時間でも cytochrome

P450 3a41 の発現は上昇していた。この遺伝子の発現制御については、growth hormone による制御についての報告があるのみである。

II) 腎臓

肝臓同様、BPA、GEN ともに大きな発現変動は引き起こさなかった。少数見いだされた発現が変動した遺伝子は EST が多く、それらの遺伝子群から化合物の腎臓に対する作用を予測するのは現状では困難であると思われた。

III) 視床下部

肝臓や腎臓よりは変動した遺伝子数は多かったが、少数に留まっていた。変動した遺伝子は EST がほとんどで、それらの遺伝子群から化合物の視床下部に対する作用を予測するのは現状では困難であると思われた。

IV) 海馬

子宮以外の臓器では最も多くの遺伝子の発現が見られた臓器であった。それらは、Transthyretin、Folate receptor1、Klotho、ATPase H⁺ transporting lysosomal V0 subunit a1、angiotensin converting enzyme、claudin 2、Phosphodiesterase 2、ABC1、Rho GTPase activating protein 6 等であった。この中で、Transthyretin は甲状腺ホルモンの担体であり、これらの化合物が海馬において Transthyretin の発現を上昇させ、甲状腺ホルモン作用をかく乱する可能性が示唆され、注目される。

小野 宏；子宮肥大及び Hershberger 試験

1. 化学物質について、マウス子宮肥大試験を実施した結果、エストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用のいずれかを示した物質は、20 物質中 10 物質 (50%) であった。そのうち、抗エストロゲン作用のみを示した物質は 10 物質中 6 物質 (60%)、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方を示した物質は 4 物質 (40%)、エストロゲン作用のみを示した物質はなかった。投与経路では、経口と皮下の両方で反応がみられた物質は 10 物質中 5 物質 (50%)、皮下のみが 3 物質 (30%)、経口のみが 2 物質 (20%) であった。子宮重量を変化させる最小有効用量は、30

mg/kg 以下が 3 物質 (30%)、100 mg/kg が 4 物質 (40%)、300 mg/kg 以上が 3 物質 (30%) であった。

2. bisphenol A について、マウス子宮肥大試験を実施した結果、単独投与群では用量が増加するに従って子宮重量が増加し、100 mg/kg 以上で溶媒対照群と比較して有意差が認められた。EE 併用投与群では、100 mg/kg 以上の投与群において、子宮重量が溶媒対照群より有意に低下した。

3. BHPMBA のマウス子宮肥大試験では、BHPMBA を単独投与した群の子宮重量は、用量に依存して増加し、10 mg/kg 以上で溶媒対照群と比較して有意差が認められた。また、BHPMBA と EE を併用投与した群の子宮重量は、10 mg/kg 以上の投与群において有意に低下した。子宮肥大試験における BHPMBA のエストロゲンアゴニストおよびエストロゲンアンタゴニストとしての最小有効用量は、いずれも 10 mg/kg であった。

広瀬雅雄；OECD ガイドライン 407：28 日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

EE 投与により 2 倍以上の発現の増減する遺伝子数は雄より雌で多く、雌では EE の用量に応じて変動遺伝子数が多く、発現上昇遺伝子では 0.01 ppm より変動するものも多かった。雄では発現減少遺伝子は用量に応じた数の増加を認めず、発現増加遺伝子の数は用量の増加とともに増加した。無処置対照に較べ最高用量(1.0 ppm)で 5 倍以上の発現変動を示し、かつ用量依存性に変動するものを選択した結果、発現上昇遺伝子は、雄で 4 個、雌では 24 個得られた。発現低下遺伝子は、雄で 1 個、雌では 4 個であった。雄で用量依存的に発現上昇を示した 4 遺伝子は相対発現量が非常に低く、サンプル間のばらつきを変動係数(CV)で見たところ、CV 値が 100 以上と高かった。雌で用量依存性に発現低下した 1 遺伝子 (proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase) も投与群で CV 値が 100 以上を示した。雌で発現上昇を

示した遺伝子の多くは相対発現量が高く（全遺伝子の平均発現量は26.5）、特に、p53-activated gene 608、 mitochondrial malate dehydrogenase、 GTP-binding protein、 and ras guanine nucleotide-releasing factor-1 の相対発現量は100以上を示した。

MXC、GEN、NPの3化合物の各用量で発現変動する遺伝子数を集計した結果、MXCでは発現上昇する遺伝子は雌で多いものの、雌雄とも用量依存的な上昇遺伝子数の増加を認めず、発現低下する遺伝子数は、雌雄とも用量依存的に増加していた。NPでは、用量依存的な変動遺伝子数の増加は、雌雄で発現上昇するものと雄で発現低下するものに認められた。3化合物中GEN投与により変動する遺伝子数は最も少なく、増減の幅も少なかった。

次に、各化合物で、最高用量で対照群に比べて5倍以上の発現上昇を示し、かつ用量依存的に変動した遺伝子を抽出したところ、GENでは発現増加を示す遺伝子はなく、発現低下を示すものが雌雄で各1遺伝子認められたのみであった（雄:B-myc transforming protein; 雌:lost on transformation 1）。MXCでは発現上昇する遺伝子は雄で1個、雌では12個であったが、いずれも発現量が全遺伝子の平均発現量より低かった。また、発現低下する遺伝子は雄で20個、雌で13個であったが、雄の発現低下遺伝子の全ては構成的発現量が低いものであった。NPでは発現上昇遺伝子は雄で19個、雌で8個であったが、雄の発現上昇遺伝子は全て構成的発現量が低かった。NPによる発現低下遺伝子は雄で40個、雌で3個であった。

EE投与により雌で発現上昇した24遺伝子につき、GEN、MXC、NP投与例の雌の各用量での発現変動を検討した結果、GEN、MXCでは用量に依存した発現増加する遺伝子は認められなかったが、NP投与例ではEEと同様な発現上昇を示すものが多く認められた。次いで、雌雄の各物質投与群の各用量間でクラスタ解析を行ったところ、雌ではEEの0.1 ppmと1.0 ppm、NPの50と250 mg/kg、GENの各用量、MXCの各用量がそれぞれ近

似した階層に分類された。その中で、EEとNPが最も近似した階層を形成していた。雄ではEEの0.1 ppmと1.0 ppm、GENの各用量、NPの50と250 mg/kg、MXCの各用量がそれぞれ近似した階層に分類されたが、EEと近似した階層を形成する化合物はなかった。

菅野 純；内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究

性的二型核の測定法、脳環流固定法、凍結切片作製法、染色法、神経核の解析法及びラット新生児への経口投与法のシナリオを作製し、一連のビデオ撮影を行った。

井上 達；OECD/WHO 関連総括

これまでの会議および学会からの知見から、今後、内分泌かく乱化学物質問題で解決すべき課題として残されているもの、また、解決されるべきものとして新たに明らかになったものは、大きくは二つあり、第1に、引き続き低用量問題を巡る高感受性問題、第2にマイクロアレイゲノム解析による今後の内分泌かく乱のメカニズムの解明を挙げることが出来る。前者については、まず、ヒトの受精を人為的に抑制するようなadverse effectを引き起こす用量での影響が、通常の実験動物の試験法で検知できないという、EDCsでの試験法の根本問題である。これは受容体原性障害にリンクしたすべての対象に共通した問題であり、結果として多くの毒性試験に根本的な改良が求められるに至っている。後者については、マイクロアレイを用いたゲノミクス手法によるEDCsの研究があるが、これにも用量相関などの課題を含む低用量問題が関連している。またこれは、今後のリスクアセスメントの問題にもつながってゆくものである。

(4) 〈確定試験等開発研究〉

長尾哲二；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 -経世代試験の改良-

胎齢14日（最終暴露の24時間後）の生殖巣の顕微鏡観察の結果、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。しかし、生殖索には、内分泌かく乱化学物質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。E₂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变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。

妊娠17日に摘出した胎児精巣の顕微鏡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、E₂、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、E₂、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。

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、14および28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。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、DES投与群と同様、E₂、TAMおよびCLOM投与群の胎児生殖巣にTunel陽性細胞の増加は観察されなかったが、生後9、14および28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。ATZ群では、いずれの時期の精巣にもTunel陽性細胞の増加は観察されなかった。

長尾哲二；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

[実験1] 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が、Bcl2の発現は観察されなかった。

[実験2] 青班核ではDES暴露によるアポトーシスの有意な上昇はみられなかった。

[実験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。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。

白井智之；トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱化学物質の検討

いずれの群にも死亡はみられなかった。剖検時には、用量依存性に体重増加抑制がみられた。血清中テストステロン濃度および前立腺重量に有意な差はみられず、前立腺腹葉のProstatic intraepithelial neoplasia (PIN)と腺癌の発生率には差はなかった。半定量的にPINと腺癌の数を標本上で算定したところ濃度依存的に腺癌の数が減少する傾向が認められた。

広瀬雅雄；内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究

生存率については、雌雄の低ヨード食群と対照群の間に差はみられていない。体重については、低ヨード食雄群において、発癌処置終了後より徐々に体重増加抑制傾向がみられ、発がん物質処置終了後20週においては対照群と比較して有意な(p<0.05)増加抑制がみられた。雌群には体重に及ぼす影響はみられていない。触診において、雄群にはいずれの動物にも触知可能な腫瘍の発生はみられていない。雌群については、発がん物質処置終了後20週までにおける触知可能な腫瘍の発生頻度は、対照及び低ヨード飼料の各群で5/22(22.7%)及び4/22

(18.2%)であり、発生数及び腫瘍体積においても低ヨード食による影響はみられていない。

長村義之；内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんに及ぼす影響の検討

5群では、1、3および4群に比較して腫瘍発生率、個数および重量で低値を示し、また、腫瘍発現までの期間も長かった。病理組織学的検査では1、3および4群で乳管由来の腺腫/癌が主体であったが、5群では拡張した乳管や腺房由来と考えられる腺管内乳頭腫/癌が多く、E₂用量による組織型の違いが認められた。免疫組織化学的観察ではER α は無処置正常乳腺組織に対しE₂投与各群で減弱しており、特に投与量の高い5群で明らかであった。また、ER β は各群とも腫瘍では発現が弱かったが、5群のみで他群と比較し弱陽性を示す部位が広範に見られた。RT-PCR法およびWestern blotting法では、ER α は他群と比較し5群で減弱する傾向が見られた。一方、ER β は5群でやや増強する傾向が見られた。Ki-67は1、3および4群の腺管癌では中等度に、5群の腺管内癌では高率な陽性細胞の発現が見られた。

吉田 緑；内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

1. ヒト暴露相当量の低用量新生児期暴露が雌性生殖器に及ぼす影響

NPのいずれの群においても、性成熟前の観察として実施した子宮の発育・分化(Fig.1)および性腺刺激ホルモン、腔開口時期などのいずれの項目にも異常は認められず、15ヶ月齢まで実施した性周期観察および子宮癌修飾作用についても、投与による影響は観察されなかった。また投与した母動物の繁殖成績にも投与による影響は認められなかった。

NPの血清・組織中濃度測定の結果、10および100mg/kg群の母動物の乳汁中に検出されたが、その他の項目には検出されなかった。

2. 新生児期暴露が卵巣に及ぼす影響

laser capture micro-dissection法による発育および閉鎖卵胞を採取した結果、Bcl-2、CyclinD2、IGFRいずれの遺伝子の発現につ

いても対照群と同様であった。

D. 考察

菅野 純；総括補佐及びOECDバリデーション関連総括・確定試験開発関連調査研究

厚生労働省は、現行のスクリーニングによる物質のホルモン活性の評価は、新たな科学的知見や、或いは将来的な手法の増強により、変動が予想されるとの立場を採っている。リスト上位の化合物から逐次詳細試験を行い「要リスク管理」物質及び「リスク管理は当面不要」物質にふるい分け、後者に関しては再評価が必要となるまでholdされる。詳細試験に関しては、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良、また従前の肉眼・組織形態所見の他、遺伝子発現情報を駆使する手法も取り入れる試みを含むところの試験法開発が必要であろう。

(1) 〈プレスクリーニング系追加試験〉

西原 力；酵母Two-Hybrid試験の改良とバリデーション - 特に複合効果の検討 -

単一物質が複数のレセプターの系でアゴニスト活性を示す例を酵母Two-Hybrid試験(PXR系)で示したが、特にCARは多くの物質と反応し、内分泌かく乱作用にも関与している可能性が示唆された。これらの事実は、EDsがRXRのような性ホルモンレセプター以外のレセプターを介していたり、複数レセプターを介して作用を発現する可能性を示唆するものであり、スクリーニング系のみで総合評価することはますます困難になると思われるが、in vitroの試験系は候補物資の確認に必要なメカニズムの検討には重要なツールとなると考えられる。

松島裕子；マイクロアレイ法の基盤技術調査

CodeLinkがGeneChipに次ぐプラットフォームとして評価できることがわかったが、総合評価としてはGeneChipが現状では依然、最も優れたマイクロアレイプラットフォームであるとの結論は変わらなかった。しかし、1種類のプラットフォームに固執せざるを得ない状

況は回避できることとなった。

Spike RNA を用いた手法は、単に発現シグナル値を絶対化するに留まらず、他の手法では容易に判断しにくく研究者間で問題となっているマイクロアレイデータの品質チェックを同時に行うことができ、発展中の技術であるマイクロアレイのバージョンアップにも対応することができる画期的な方法であり、内分泌かく乱化学物質研究の基本技術として重要であると考えられる。

また、今年度は、10ng という極微量の RNA 試料からでもマイクロアレイ解析が可能であることを確認し、通常の 5 μ g に比べると数百倍少ない RNA でマイクロアレイ解析可能であることが示された。しかし、2 回増幅の課程で発現プロファイルに偏りが生ずるので、更に改良を進めることが今後の課題である。

(3) 〈スクリーニング試験系確立研究〉

高木篤也；ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響」に関する研究

EB は、いずれのエストロゲン様物質に対してもサイズ低下がみられ、とくに低濃度でサイズの低下がみられた。これらのことから、ES 細胞培養系は内分泌かく乱物質の影響を検索するモデルとして有用であり、特に低用量域での作用を検索するモデルとして利用しうる可能性が示された。

永井賢司；子宮肥大試験及び Hershberger 試験における遺伝子発現変化に関する研究

エストロゲン刺激に応答する遺伝子は、投与後の時間帯により、発現量の変動パターンが大きく異なり、PR、ER α および AR といった性ステロイドホルモンレセプター遺伝子の発現量は、EE 投与後にいずれも減少することが明らかとなった。

また、EE、GEN、MXC および ICI-182,780 の複合効果を検討した結果、子宮重量は、EE 0.3 μ g/kg、GEN 10 mg/kg および MXC 30 mg/kg の単独単回投与により影響は認められなかったが、これら併用群では子宮重量および遺伝子発現の増加が明らかであった。これらの

複合影響は ICI-182,780 投与によりキャンセルされ、ER を介したものであると考えられた。

松島裕子；卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究

BPA 単独投与および GEN 単独投与での遺伝子発現が同じで、BPA+GEN で発現がより上昇する遺伝子（投与後 2 時間で 28 遺伝子、24 時間では 40 遺伝子）が認められたが、エストロゲンで応答する遺伝群との一致はみられなかった。

内分泌かく乱化学物質の暴露量が少量で人体への影響がみられない場合でも、複合暴露により障害が誘導される可能性があり、複合作用の検討は非常に重要であると考えられる。

吉村慎介；内分泌かく乱化学物質の胎生期暴露による包皮分離試験に関する研究

VZ の GD 14~17 暴露では尿道下裂が発生し、その結果これらの例では包皮分離完了時期が判定できなかった。VZ の GD 18~21 暴露では尿道下裂の発生は認められず、包皮分離の遅延はなかった。尿道下裂の発生がなかったその他の化学物質では明らかな遅延はみられなかったことから、胎生期暴露による包皮分離試験の有効性は明らかではなかった。

吉村慎介；内分泌かく乱化学物質の新生児期暴露による包皮分離試験に関する研究

FLU、DDE および VZ による包皮分離遅延は性成熟直前の暴露で明らかであり、エストロゲン剤の EE あるいは TAM では新生児暴露により体重増加抑制および生殖器成長抑制とともに包皮分離を遅延させた。DES では新生児および性成熟直前のいずれの暴露でも包皮分離を遅延させた。これらのことから、包皮分離試験を用いた内分泌かく乱化学物質の検出のためには、新生児期、特に出生から離乳までの時期の前半に投与する試験と、性成熟直前から連続して投与する試験の 2 種の試験が必要であると考えられる。

武吉正博；28 日間試験の改良 - α_{2U} グロブリン評価の利用について」の研究

E₂ 10⁻¹⁰ M 及び Clofibrate 10⁻⁶ M でいずれも培養上清中の AUG タンパク質は明らかな

変動は示さなかったが、microarray による遺伝子発現解析の結果、E₂及びClofibrateともにAUGの減少、SMP-2の増加を引き起こすことが確認された。Clofibrateはestrogenicな影響或いは内分泌かく乱性を疑わせる報告もなされていることから、同様の機序によりAUG産生を抑制する可能性が示唆された。

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

高木篤也；臓器特異的ハイスループット検出系の開発のための網羅的な遺伝子発現解析

子宮ではBPA、GENともに多数の遺伝子発現変動を引き起こし、それら遺伝子群にE₂投与後早期に発現変動する遺伝子群が含まれていたことから、子宮ではBPA、GENのエストロゲン様作用を網羅的遺伝子発現解析手法によって判定可能であることが示されたと考えられる。他の臓器では子宮とは異なり、BPA、GENで発現変動する遺伝子は少数に留まった。海馬では比較的多くの遺伝子が発現変動し、Transthyretinのような甲状腺ホルモンとの関連を示唆する遺伝子群が含まれていたが、多くはESTであり、遺伝子名から機能に関する情報を得ることができず、今後の解析の必要性が明らかとなった。

小野 宏；子宮肥大及びHershberger試験」に関する研究

エストロゲン様作用が疑われている20化学物質について、マウス子宮肥大試験を実施した結果、約半数に子宮重量の変化がみられたが、そのうち、エストロゲン作用のみを示した物質はなかった。このことから、子宮肥大試験は、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方がみられるように群構成を設定することが望ましいと考えられた。また、投与経路についても、皮下のみ、あるいは経口のみで子宮重量に変化がみられた物質が約半数あったことから、経口と皮下の両方を選択することが必要と考えられた。子宮重量を変化させる最小有効用量は、比較的高用量であったことから、LD₅₀値が低い毒物質などは、子宮肥大試験を実施しても陽性反応は得られ

ないと考えられた。

BPAの単独投与群では、用量に依存して子宮重量が増加したが、BPAとEEとの併用投与群で、子宮重量が低下したことから、BPAは内因性エストロゲンの存在下では抗エストロゲン作用も示すものと考えられた。また、同物質を卵巣摘出ラットに皮下投与した際の最小有効用量とほぼ一致したことから、エストロゲン作用の程度にラットーマウス間の差はほとんどないと考えられた。

広瀬雅雄；OECD ガイドライン407：28日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

EE(positive cont)、GEN、MXC、NPの28日間投与における網羅的遺伝子発現解析を行った。EEは、雌で0.01 ppmから用量依存的に発現上昇する遺伝子が多数みられた。病理組織や性周期回帰の検索では1.0 ppmのみで変化を認めたことを考慮すると、これらの遺伝子発現変化はエストロゲン作用の高感度検出指標になりうる可能性が示唆された。一方、EE投与により雌で発現上昇した遺伝子について、GEN、MXC、NP投与による発現プロファイルと比較したところ、NP以外に近似する発現プロファイルが得られなかった。このことは、肝臓におけるERサブタイプに対する親和性、他のステロイド受容体との親和性、あるいは化学物質固有の細胞毒性など、各化合物に特異的な反応性があると考えられる。

(4) (確定試験等開発研究)

長尾哲二；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 -経世代試験の改良

DES、E₂、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testosterone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。さらに生殖巣あるいは精巣におけるアポトーシスは、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。

近年の検討によると、未熟ラット精巣における精巣細胞のアポトーシスはその日齢とともに増加し、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)のアンタゴニスト投与により高まることから、ゴナドトロピン(特に卵胞刺激ホルモンFSH)依存性と考えられる。またFSH、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)黄体化ホルモン(LH)あるいはテストステロンの投与は、下垂体摘出ラット精巣におけるアポトーシスに対して抑制的に働くことにより、ゴナドトロピンとアンドロゲン(FSH、hCG、テストステロン)は精巣細胞の survival factors として働くと考えられる。このように精巣においては種々のホルモンによるアポトーシス調節機構が存在し、正常および病的な状態(胎児期あるいは新生児期における内分泌かく乱化学物質の暴露を含む)における精子形成過程に深く関わっていると考えられる。

長尾哲二；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

DES 暴露群の新生児の SDN-POA 部位に Tunel 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、Bcl2 の関与はないと判断された。近年、BPA が、青斑核の性分化を障害し、本来雄に比較して雌で大きな容積をもつ青斑核が、妊娠期および授乳期に DES あるいは BPA を暴露されたラットでは雄のほうが大きく、性差が逆転することが報告されているが、DES 暴露後の青斑核のアポトーシスには変化が見られなかった。

また、DES の新生児期暴露により、視床下部において DA 伝達系モノアミンの増加傾向が認められた。DES 誘発性高プロラクチン(PRL)血症が報告されていることから、本研究でみられた DA、DOPAC 濃度の上昇は PRL 分泌を調節するための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、多動雄の攻撃性の減弱などの行動異常と

何らかの関連があるものと思われる。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。

白井智之；トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱化学物質の検討

雄性 probasin-SV40 Tag Tg ラットの系を用いて Atrazine の抗アンドロゲン作用を検討したが、明らかな前立腺癌発生の変化はみられず、Atrazine の抗アンドロゲン作用が無いかあっても極めて弱いことが示唆された。

広瀬雅雄；内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究

乳幼児期における生体内環境変化の発がん感受性に及ぼす影響を明らかにする目的で、低ヨード食を与えたラットの発癌物質に対する感受性の変化を、特に乳腺及び甲状腺を中心に検索したが、明らかな低ヨードの影響は見られなかった。なお、生体内に存在するヨードの一部は甲状腺に存在しているが、その他 60~80% については胃粘膜、乳腺、唾液腺などに存在し、抗酸化効果を呈していることが示唆されている (Venturi S et al.2000)。疫学的には、ヨード欠乏地域において甲状腺癌のみならず、胃癌の発生が多いことも報告されており (Venturi S et al., 1993)、我が国において乳癌の発生率が低い原因として、海産物からの豊富なヨードの摂取がその可能性の一つとして挙げられている (Cann S.A. et al.2000)。実験的にも、ヨード欠乏によるラット乳腺組織の異型化、腫瘍発生、あるいは発癌物質に対する高感受性化が示されており (Eskin B.A.1977)、ヨード欠乏によりエストロゲンに対するラット乳腺組織の反応性が高くなり、腺房細胞の増殖を促進することが明らかにされている (Strum J.M. et al.)。現在 20 週を経過し、30 週で剖検、病理組織学的検査を実施する。

長村義之；内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんにも及ぼす影響の検討

内分泌かく乱物質の乳腺発がんにも及ぼす影響を明らかにするため、エストロゲンを陽性対照物質として DMBA 誘発ラット乳腺腫瘍モデ

ルで検証した。その結果、いずれの用量においても乳腺腫瘍誘発の促進は見られなかった。さらに、高用量ではむしろ明らかな抑制傾向を示し、E₂用量に対する逆相関が認められた。発現した腫瘍は、最高用量として設定した1000 μg/kg 群のみで組織形態、ER 発現およびKi-67 発現で差が認められた。しかし、それ以下の10 および30 μg/kg 群では、内因性のエストロゲンを有するSham 群との間に明らかな差を見出すことは出来なかった。腫瘍におけるERの発現では、1000 μg/kg 群のみでERαの減弱とERβの増強という相補的な関連が示唆された。

各群の誘発腫瘍では、初期病変と考えられる小さな腫瘍で高い細胞増殖活性を示すが、ある程度の大きさになると細胞増殖活性は低下していたことから腫瘍の細胞増殖活性を評価する際にはステージを考慮しての評価が必要であると考えられた。

吉田 緑；内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

低用量から高用量のNPの胎生期・授乳期暴露の結果、性成熟前の検査、性周期および子宮発癌のいずれの項目にも異常が観察されなかった。従って、ヒト暴露量の近似値を含むNPの暴露は児の雌性生殖器へ影響を与えないと考えられた。血清・組織内NPの結果より、NPはヒト暴露量と比較して高い用量において乳汁経路で新生児に暴露されている可能性が示唆されたが、新生児への組織移行については本実験条件下では確認されなかった。

一方、卵胞の細胞増殖関連遺伝子発現の結果より、卵胞において投与による影響は観察されなかった。この結果は前年度のOPのラット新生児期大量暴露は卵巣の形態および機能に対し直接的な影響を与えないという考察を支持するものと考えられた。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質のそれぞれをプレスクリーニング試験ならびにスクリーニング試験を経て、最終的には内分泌かく乱問題の受容体原

性毒性としての性格を考慮し、EDCsの検出感度の高い方法を開発することを目的として、1) 個体レベルスクリーニング系の確立課題として、子宮肥大試験、Hershberger試験、包皮分離試験の実用化の向けての問題点の解決、2) 確定試験としての胎生期、新生児期の高感受性期に焦点を当てた新たな試験法の開発、3) 経世代試験の改良、4) 複合効果の検討、5) 各種臓器、特に内分泌関連臓器に対する発がん修飾作用の検討を主な研究課題として研究を遂行した。その結果、個体レベルでのスクリーニング系の確立に関してはほぼ問題点が解決され、子宮肥大試験に関してはOECD試験法ガイドライン(案)として我が国より提案されるに至った。複合効果に関しては、*in vitro*、*in vivo*による研究成績から、少なくとも相加的な作用が認められることが明らかにされたが、その作用機序については今後検討されるべき問題を多く含む。内分泌関連臓器に対する発がん修飾作用に関しては、複数の臓器において特に高用量において明らかな影響が認められることが確認され、これらの問題点を考慮しながら胎生期、新生児期の高感受性期に焦点を当てた試験法案を提案できる段階に達しており、今後の研究が期待される。なお、*in vitro*、*in vivo*の系で内分泌かく乱が疑われている物質を用いて標的臓器の初期の遺伝子発現の変化を検討した結果、共通して変化する遺伝子が幾つか確認されており、今後遺伝子解析が内分泌かく乱作用を判断するための新たなツールになる可能性が示唆された。

F.健康危険情報

無し

G.研究発表

1.論文発表

A.Maekawa, M.Yoshida, S.Katsuda and K.Imai, "Toxicologic/carcinogenic effects of endocrine disrupting chemicals on the female genitalorgans in rodents. (投稿中)

2.学会発表

無し

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

植田充美、田中渥夫、西川淳一、西原力、河田直紀: 内分泌攪乱物質結合領域を細胞の表層に有する微生物およびその応用、特開

2002-153287、2002/5/28

2.実用新案登録

無し

3.その他

無し

別添 5

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 総括補佐及び OECD バリデーション関連総括・確定試験開発関連調査研究

分担研究者 菅野 純

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 毒性部長

研究要旨 本研究班及び前研究班において、エストロゲン受容体系及びアンドロゲン受容体系については種々の *in vivo* スクリーニング試験法の開発の基本的段階を終了し、これらの研究成果は、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会、中間報告追補」において提案された「試験スキーム」及び、その後の検討会にて承認された拡張スキームに沿って要求される大規模スクリーニングの内の、主に *in vivo* 試験法に関してその科学的根拠及び実務的手順の両面の確立に大きく生かされてきた。それと並行して、試験スキームの完成に向けての「詳細試験」に関わる基礎的な検討を進め、「齧歯類一生涯試験」構想を打ち出し、多世代試験の問題点の整理と必要な改良点を明らかにする試みを展開してきた。今後、*in vivo* スクリーニング試験を着実に推し進め、より精度の高い化学物質優先順位リストの作成及び包括的ガイドラインへ向けた基礎データの集積が期待される。

A. 研究目的

内分泌かく乱性を検討する必要がある数万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立を進め、もって、詳細試験に資する優先順位リストの作成及び詳細試験の開発を平行して行うことを目的とする。

B. 研究方法

ホルモン活性を有する化学物質（Hormonally active chemicals,

HACs）が存在することは周知の事実であり、これら HACs の一義的作用はホルモン受容体に結合し作用を発揮することであると考えられる。これに対して内分泌かく乱化学物質（Endocrine disrupting chemicals, EDCs）は、HACs の内で生体に有害作用を及ぼすもの、即ち受容体原性の毒性を発揮するものということが出来る。ホルモン作用の強弱や有無を検討するスクリーニング試験を比較的簡単に設定することは可能である

が、他方、有害性を検討する試験法（詳細試験）には受容体原性毒性を効率よく見極める性能が要求され、また後述の理由から、現在、最適な方法はその開発を待つ状況にある。暫定的に従来の多世代生殖試験に代表される大型試験、或いはそれに類する規模の改良試験が考慮されるが、その実施には多大な費用と時間が必要であり、多数の物質について逐次実施することは現実的に困難であると考えられている。今までに国内外で行われた環境化学物質・工業化学物質等のホルモン活性測定の結果は、その大半がエストロゲン作用物質、或いは抗アンドロゲン作用物質であることを示してきた。一方、甲状腺ホルモン受容体に直接的に結合し、その系の機能に受容体を介して影響を与える可能性のある物質は殆ど見つかっていない。むしろ、甲状腺ホルモン系に関しては、甲状腺ペルオキシダーゼ阻害が、ある種の化学物質によって強力に引き起こされることが従来型の毒性試験によって判明している。現在、受容体を介する化学物質影響として、EDCs 問題の中心となっているのはエストロゲン様作用を発揮する化合物（E 物質）である。E 物質の生体内での作用点の内、そのメカニズムの解析が進んでいるものを利用して、HACs のスクリーニング試験法が考案されている。

厚生労働省では、スクリーニングの対象となる化合物の数が、既存化学物質を含めて数万種類以上存在する

ことから、「受容体分子への結合性」を検討するスクリーニング試験法に、*in silico*による3次元構造活性相関（SAR）手法を採用した。また、「ホルモン受容体依存性蛋白合成誘導」を検討するスクリーニング試験法には、ヒト由来培養細胞を用いたレポーター遺伝子試験法を採用した。これは、Hela 細胞にヒト ER 及び応答遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入し、ハイスループットスクリーニングを実施するものである。さらに、上記の *in silico* 及び *in vitro* の系で認定されたホルモン活性が生体内において発揮されるか否かを検討する *in vivo* スクリーニング系には、E 物質に関する試験系として子宮肥大試験（Uterotrophic assay）、アンドロゲン様物質に関する試験系としてハーシュバーガー試験を採用した。

内分泌かく乱化学物質による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、低用量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、内分泌かく乱化学物質の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。このような背景からは、従来の多世代試験に代表される生殖毒性試験の改良を進める立場を発展的に解消し、さらに拡大して、上記の生物個体の一生涯を対象とした、毒性試験という立場から内分泌かく乱化学物質の毒性評価を進める立場を提案するに至った。このような立場に立つ利点は、

① 受精前後から死に至るまでの期間をカバーすることを念頭に置いた上で、不必要な部分を切り取る作業を行うことで、漏れのないプロトコルを作成する。

② 生殖毒性に捕らわれず、神経系、内分泌生殖系その他、免疫系、それら個々および相互連携の発達と老化など、あらゆるものを考慮した上で、必要十分な実質実験プロトコルを開発するという点が上げられる。

C. 研究結果

2003年4月15日、パリのOECD本部で開催された、OECD哺乳綱動物バリデーション運営員会（VMG-mammalian）において、げっ歯類一生涯試験プロトコルの発表がなされた。本プロトコルは、概念整理の段階であるが、概要として以下のようない点が提案される。

① 実験期間は最長で受精前（交配前）から死までの単一世代とし、一生涯を概念的にカバーする

② 従来の生殖毒性試験及びその改良試験において実施されている検査項目の実施（取捨選択はあり得る）；（リッターサイズ（同腹仔数規模）、性比、肛門生殖突起間距離、身体発育、繁殖能力、乳頭遺残、膻開口、包皮分離、性周期モニター、精子数、等）

③ 神経学的検索（行動異常など）を、初期（環境省の改良一世代試験で採用されている17週まで）に加えて、26週以降を目安とした神経学的

検索、記憶や学習の能力に関する検討（老化の観点から）を行う。

④ 幼若、成熟及び老齢期における免疫能の測定（液性免疫、細胞性免疫）

⑤ げっ歯類における生殖内分泌系の老化現象としての常時発情（persistent estrus）等の現象の早期発来がモニターできる期間（離乳後数カ月）が必要である。

⑥ その他、前立腺形成阻害・過形成、等を考慮する可能性がある。

それに対して、各国等からの次のようなコメントがあった。

免疫毒性学的意義：免疫毒性学的に、胎生・新生児期に曝露された影響が免疫系に異常をきたすことがあることが知られるようになっている。観察期間の延長によってこれが調べられる。従って大変意義のある試験トリアルだと思う。

プロトコルへの質問：投与期間が鍵だと思うが、どのくらいに設定するのか？ 交配期間はどのくらいに設定するのか？ どんな化学物質で進めようとしているのか？ 他国のグループが共同で行う際の参考のために発表して欲しい（OECD事務局）。

二世代試験との関係：二世代試験に較べて短いのはよい。二世代試験と較べて予想される結果の違いなど実験結果を挙げて示して欲しい。二世代の一部に同様の設定を試みており、重大な関心がある（米）。

その結果は、OECD事務局作成の

議事概要

(ENV/JM/TG/EDTA/RD(2003)11: 25-apr-2003)において、次のようにまとめられている。

- ・（従来の生殖発生毒性試験系よりも）乳幼児期の暴露期間を延長することにより、思春期における事象と生殖に係る成長について補足的データを提供するものと思われる。

- ・さらに観察期間を延長することにより、雌雄双方において、性的老化といった点にも対応しうることが期待される。

- ・スイス及び米国は、類似または関連の論議ないし実験が行われているとした。例えば米国では、二世世代生殖発生毒性試験での動物数を増やし21日齢後も継続することにより抗アンドロゲン作用の感受性に関する懸念に対処しようとしている。

- ・会合では、新たな生殖発生毒性試験の開発と検証について、次期EDTAにおいて討議されるべきであることについて合意した。

また、本研究において、生物個体の一生涯を対象とした毒性試験という立場からEDCsの毒性評価を進めることを提案するに至った。受精前後から死に至るまでの期間をカバーすることを念頭に置いた上で、不必要な部分を切り取る作業を行うことで、漏れのないプロトコールを作成する。生殖毒性に捕らわれず、神経系、内分泌生殖系その他、免疫系、それら個々及び相互連携の発達と老化など、あらゆるものを考慮した上で、

必要十分な実質実験プロトコールを開発することを目的に調査活動を行った。更に、第一線の神経行動学研究者、免疫学者を迎えて、Ad hoc研究会を開催し（平成15年11月11日、於東京国際フォーラム）確定試験としての齧歯類一生涯試験の構想の現実性、問題点を整理し、本申請へ向けての班員構成や必要とされる研究テーマの整理等を行った。

D. 考察

これらのスクリーニングによる物質のホルモン活性の評価は、新たな科学的知見や、或いは将来的な手法の増強により、変動することが科学的に十分予想されるとの立場を厚生労働省は採っている。従ってこの段階では化学物質の優先順位リストを提供するのみとし、その順位は逐次再評価の上、入れ替えを行い（ホルモン活性が強い結果が得られると上位に移動し、弱い結果が得られれば下位に移動）、その上位のものから詳細試験に供するという構想を打ち立てた(Figure 1)。リストは、新しい情報や試験結果が得られることにより、時間とともにその内部構造が成熟して行く事となる(Figure 2)。

リスト上位の化合物から逐次詳細試験を行い、有害性評価、暴露評価を経てリスク評価を行い、「要リスク管理」物質及び「リスク管理は当面不要」物質にふるい分けられ、後者については新たな科学的知見により再評価が必要となるまで暫定的に hold

される（例外として、農薬等、多世代試験などの大型詳細試験）がすでに実施されている物質については、内分泌かく乱性の評価に十分であると考えられるデータが伴っている場合について、直ちに有害性評価、暴露評価、リスク評価へと進むことが出来るとした。詳細試験に関して厚生労働省は、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良、また従前の肉眼・組織形態所見の他、遺伝子発現情報を駆使する手法も取り入れる試みを含むところの試験法開発を、2005年を目標に進めることとした。

E. 結論

今後、内分泌かく乱性確定試験法及び、以下の如く内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発が引き続き求められて、いる。

● 内分泌かく乱性の試験評価に関する包括的ガイドラインの開発を行う。

● 「確定試験」として一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階において内分泌かく乱作用により懸念される毒性指標（神経・行動、免疫毒性等、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標）を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行う。また、これを支援する基礎研究を並行する。

● OECD 試験法ガイドライン化を視野に入れた内分泌かく乱性スクリーニング試験法 (*in vivo*) の開発を継続して行う。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willileeche K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 2004 Jan 15;195(1):19-29.

Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata, Madoka Nakagomi, Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Jun Kanno. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reproductive Toxicology* 18 2004 109-120

Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect*. 2003 Aug;111(11):1411-20.

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. Environ Health Perspect. 2003 Sep;111 (12):1550-8.

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. Environ Health Perspect. 2003 Sep;111(12):1530 -49.

Yoon BL, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. Environ Health Perspect. 2003 Aug;111(11):1411-20.

Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I. A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine disruptor animal experiment- Synergism in endocrine disruptor studies, Environmetrics 2003, Volume 14, Issue 2, : 213-222

Kanno J, Reverse toxicology as a future predictive toxicology, T. Inoue, W.D. Pennie Eds, Toxicogenomics, pp.213-218, Springer-Verlag Tokyo, 2002

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kanno J, Kim DY, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. Toxicol Sci. 2002 Nov;70(1):150-6.

Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K. Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice. Toxicol Lett. 2002 Sep 5;135(1-2):145-53.

2. 学会発表

菅野 純「分子標的」と「全遺伝子トキシコゲノミクス」、がん分子標的治療研究会 2003年6月2日 東京

菅野 純、「トキシコゲノミクスの現状」、第30回トキシコロジー学会学術年会ワークショップ「プロテオミクスとトキシコゲノミクスの現状と問題点」2003年7月20日 相模原

Jun Kanno, Toxicogenomics -A phenotype independent approach-, Annual Meeting of Korean Society of