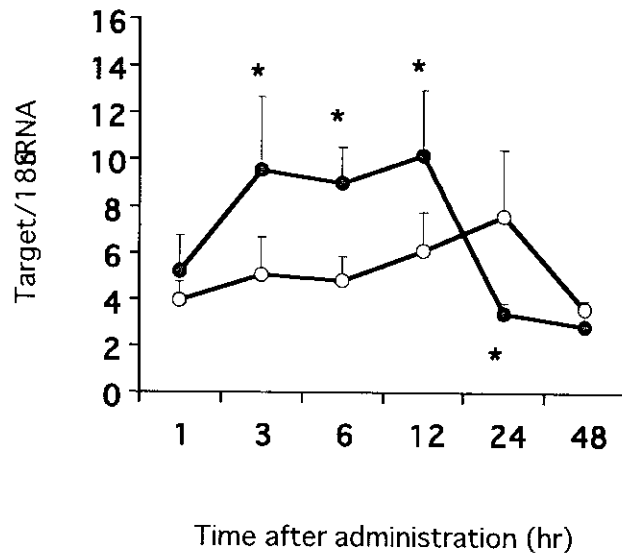
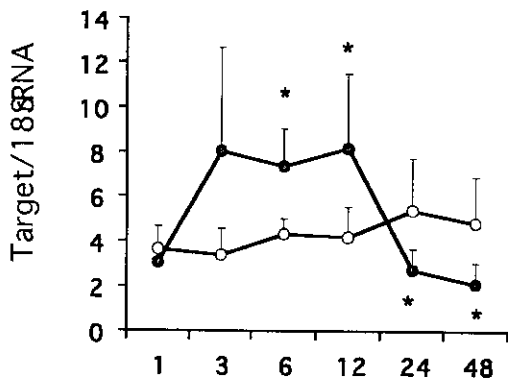


cyclinD1 mRNA

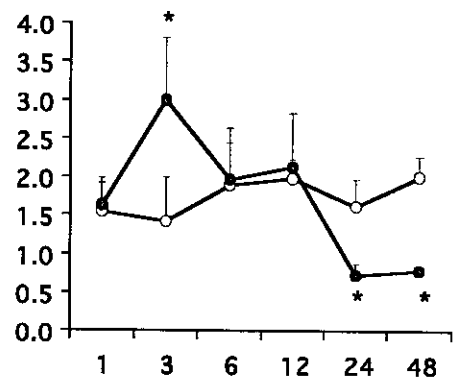


○ : Vehicle, ● : EE 3 μg/kg Mean ± SD, *: p < 0.05

Wnt4 mRNA



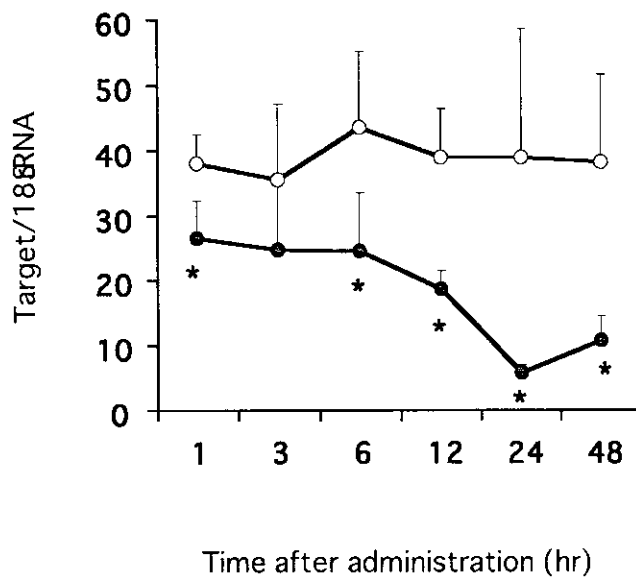
Wnt5a mRNA



Time after administration (hr)

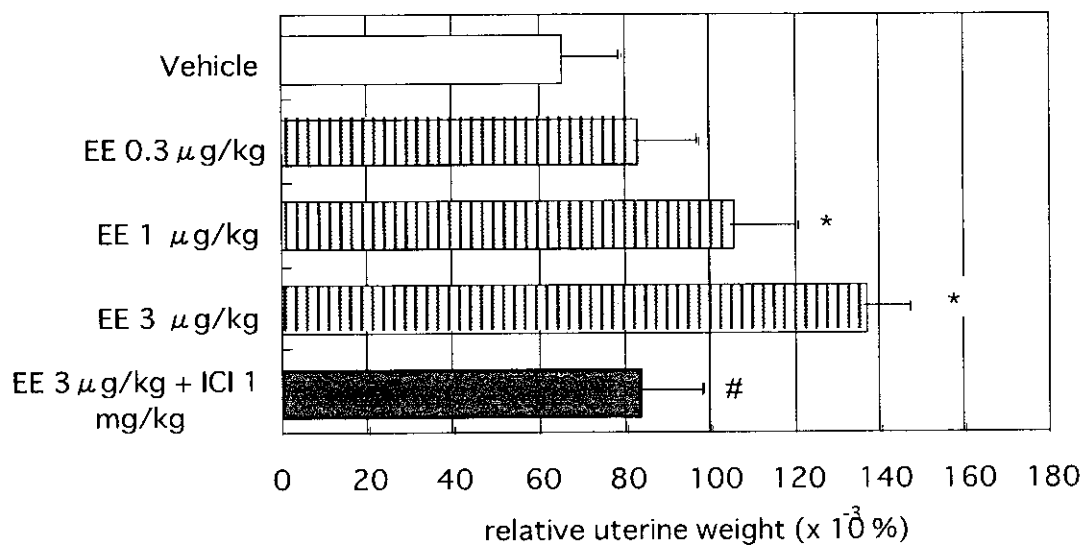
○ : Vehicle, ● : EE 3 μg/kg Mean ± SD, *: p < 0.05

Wnt7a mRNA

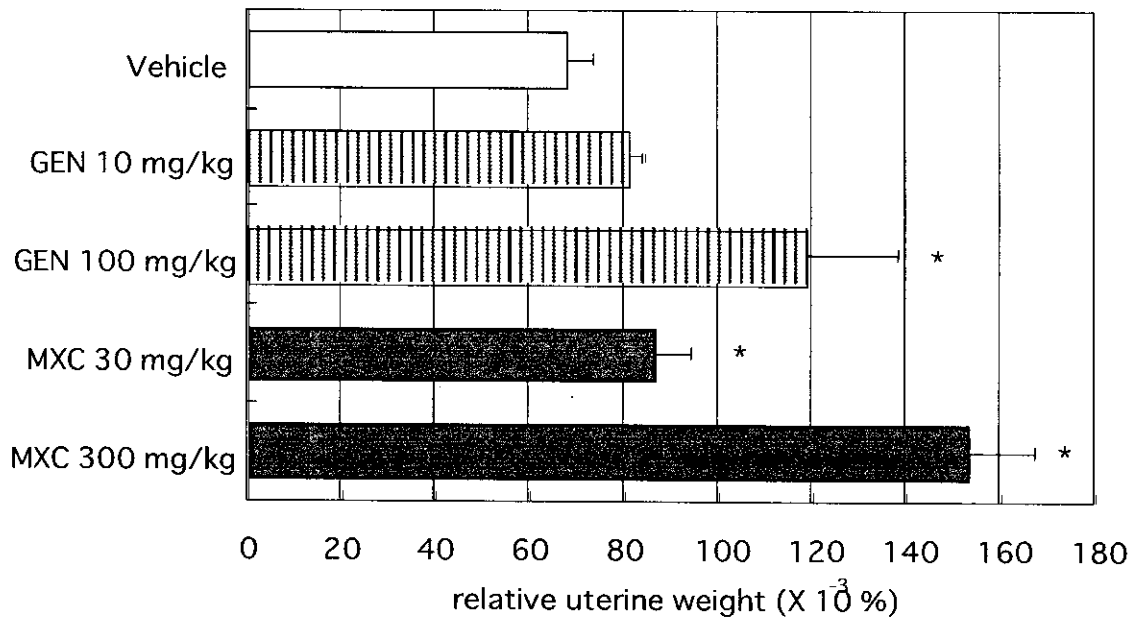


○ : Vehicle ● : EE 3 µg/kg Mean ± SD, *: p < 0.05

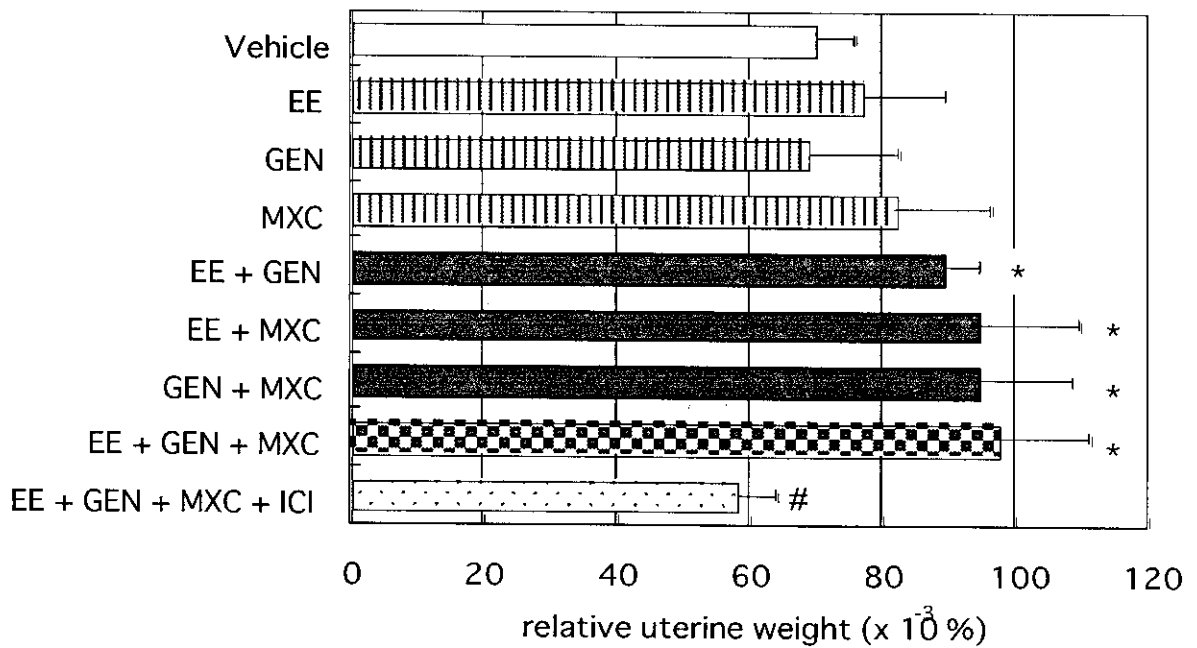
Effects of EE and ICI on the relative uterine weight in immature female rats.



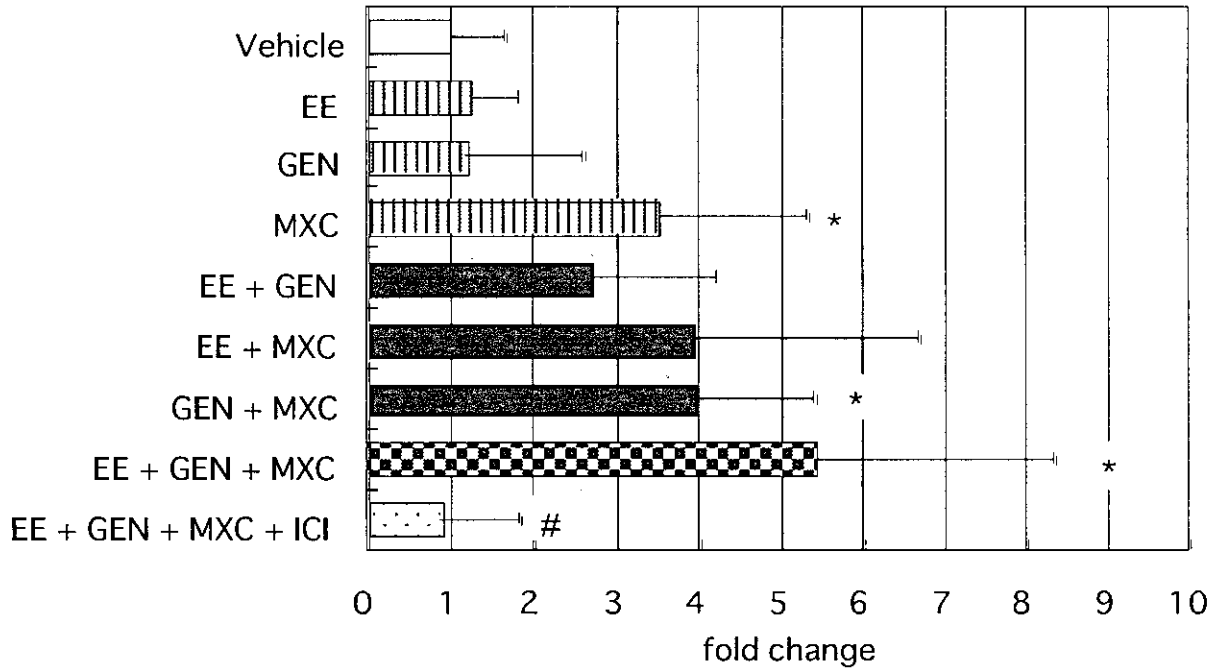
Effects of GEN and MXC on the relative uterine weight in immature female rats.



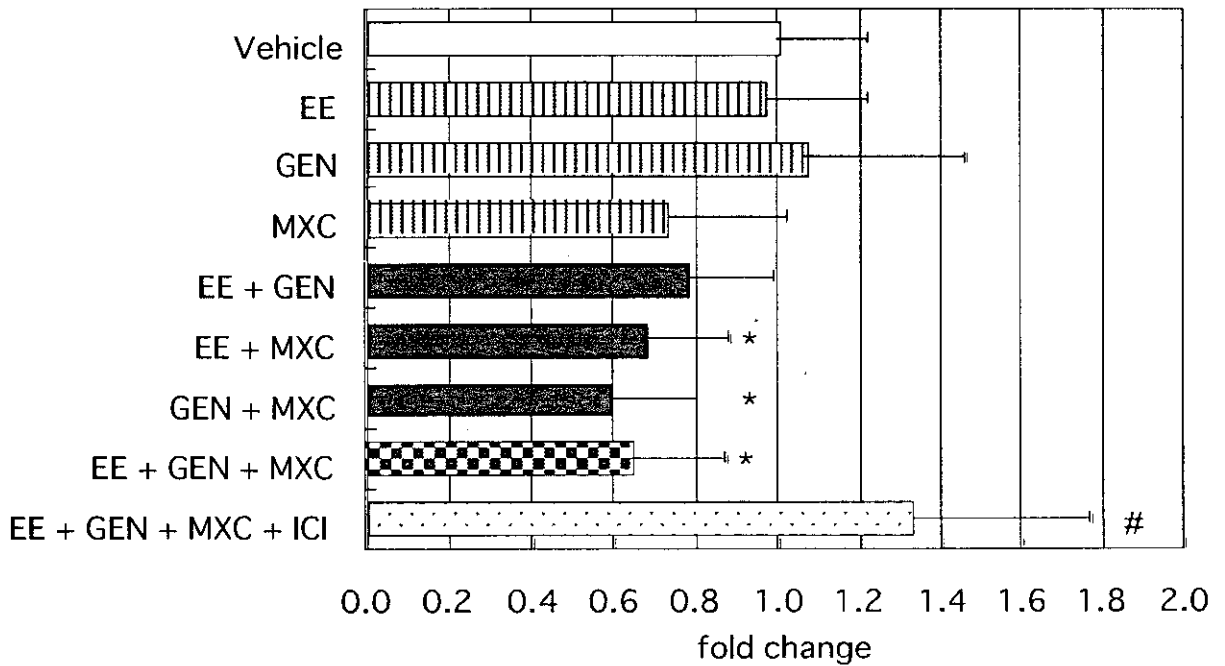
Combined effects of EE, GEN, MXC and ICI on the relative uterine weight in immature female rats.



Combined effects of EE, GEN, MXC and ICI on the complement C3 mRNA expression in immature female rats.



Combined effects of EE, GEN, MXC and ICI on the Wnt7a mRNA expression in immature female rats.



6. 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および解決策の検討

分担研究者 永井 賢司 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 部長

研究要旨 子宮肥大試験に関するデータを OECD Validation phase 2 の結果を中心に整理し、飼料中の植物性エストロジェンの試験系への影響等の問題点の抽出ならびに解決策を検討した。

A. 研究目的

子宮肥大試験には未成熟動物を用いる方法と卵巣摘出成熟動物を用いる方法とがある。1930年代より実施されて以来膨大な報告があるが、これらを整理することにより、本試験法の問題点を抽出し、その解決策を検討する。

B. 研究方法

昨年度は、OECD Validation phase 1 の結果ならびに phase 2 の結果の一部を中心に子宮肥大試験に関するデータを整理した。すなわち、本 Validation 以前に実施された試験結果は OECD Validation Study の protocol に十分反映されていると考えられたことから、4種類の protocol (①幼若ラット, 3日間経口投与, ②幼若ラット, 3日間皮下投与, ③卵巣摘出成熟ラット, 3日間皮下投与, ④卵巣摘出成熟ラット, 7日間皮下投与) を用いて実施された validation の結果を中心にまとめた。その後、OECD Validation phase 2 の詳細な解析結果が報告され、飼料中の植物性エストロジェンの影響等が指摘された。したがって、本年度は OECD Validation phase 2 の結果のうち、昨年度の報告以降に報告された解析結果を中心に、ガイドライン化する上での問題となると考えられる下記の項目についてまとめ、解決策を検討した。

- 1) 飼料中の植物性エストロジェンの影響
- 2) 動物種および系統
- 3) false positive および false negative
- 4) その他のガイドライン化する上での留意点

C. D 研究結果, 考察

昨年度は、国内外の約 20 の機関が参加して実施された OECD Validation phase 1

および phase 2 の結果を中心にまとめた。結論として、強力なエストロジェン様作用を有する ethynyl estradiol (EE), 抗エストロジェン様物質である ZM189.154 および弱いエストロジェン様作用を有するとされる methoxychlor (MX), bisphenol A (BPA), genistein (GN), o,p'-DDT, nonylphenol (NP) を用いて上記 4 種類の protocol が評価された。いずれの protocol も弱いエストロジェン様作用を検出することができ、その再現性、検出感度、試験機関間での再現性等、満足できる試験法であること、いずれの物質にも高い検出力を持つ protocol はなく、試験物質によって最も検出力の高い protocol は異なることが明らかになった。

今年度は、その後報告された、OECD Validation phase 2 の詳細な解析結果 (mini-monograph "The OECD Validation of the Uterotrophic Bioassay"^{1, 2, 3, 4}) 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ジェンの影響

Validation phase 2 で用いられた飼料中の GN, daidzein (DN) および coumestrol (CM) 濃度が測定され、飼料中の total genistein equivalent (TGE, 子宮肥大試験での活性により DN および CM の GN との換算比を決め GN 量として標記) と対照群の子宮重量 (blotted) ならびに BPA および NP の反応性との関連が評価された。

その結果、TGE 含量の高い飼料 (TGE 摂取量が 50 mg/kg/day 以上) を使用し、幼若ラットを用いる protocol B により実施された試験においては、他の機関の試験成績と比べて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。なお、TGE 含量が低から中程度の場合には、TGE 含量と BPA および NP の反応性には影響が認められなかった。本 validation とは別に、TGE として約 20-200 $\mu\text{g/g diet}$ の飼料を用い、protocol B で実施した山崎らの報告⁵でも、TGE 濃度は BPA, GN および NP の反応性に影響を与えなかった。

以上、体重あたりの摂餌量が、幼若ラットでは OVX-adult ラットの約 2 倍であることから TGE の影響がより大きく、幼若ラットを用いた場合には、TGE が 325-350 $\mu\text{g/g diet}$ 以下である必要があること、対照群の子宮重量 (blotted) が幼若ラットでは 40 mg, OVX-adult ラットでは 115 mg 以上の場合には問題があることが明らかになった。

なお、国内の参加機関では飼料として CRF-1, MF, CE-2 を用いていたが、その TGE 値の範囲は、それぞれ 174-310, 256-335, 196-338 $\mu\text{g/g diet}$ であり、各飼料内でも大きなロット間差が認められた。この結果より、実際の試験実施にあたっては、飼料中の TGE 濃度または対照群での子宮重量値を確認する必要があると考えられた。なお、TGE を制限した飼料⁶を使用するのも一つの選択枝と考えられる。

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。これは、これまでの報告^{7,8,9}とも一致しており、ラットの系統差は問題にする必要がないと結論される。

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¹⁰ (前 3 者はほぼ同等, B6CBF1 系では感度が低い)がある以外に、標準 protocol を用いる系統だった比較報告はほとんどない。

ラットとマウスの比較では、Sprague-Dawley 系ラットと CD-1 系マウスとを比較した報告があるが¹¹ (幼若動物への 17β -estradiol 皮下投与)、いずれも同様な用量反応性を示している。また、ICR 系マウ

スを用いた protocol A-C による EE の試験成績¹²では、ラットと比較してほぼ同等か若干感度が低いものの、実用上問題となるほどの相違は認められなかった。

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。これまで、子宮肥大試験に使用する上でのマウス固有の問題は指摘されていないが、今後、弱いエストロゲン様作用を有する物質について標準 protocol を用いた試験で評価することが必要と考えられる。なお、体重あたりの摂餌量が adult マウスでも幼若ラットと比較して約 2 倍高いことから、1) で述べた飼料中植物性エストロジェンの影響に関してラット以上に注意する必要がある¹³。すなわち、飼料中の TGE 濃度の制限をより厳密に行い (TGE が 175 $\mu\text{g/g diet}$ 以下)、また、対照群の子宮重量が 15 mg 以下であることを確認することが必要である。

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 36 試験のうち 3 試験で明らかな false positive が見られた (約 8%)。また、2 試験では DBP 投与群の子宮重量が有意に低下していた。

この結果から、実際の試験実施にあたっては、false positive や false negative が起こりえると考えられることから、陽性・陰性のボーダーラインにあって評価の難しいデータの取り扱いについて予め考えておく必要がある。

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が、前者は感度の点で問題があり、後者については、方法の標準化およびバリデーションがなされていないという問題がある。False positive については抗エストロジェンを同時に投与することにより被験物質の影響をキャンセ

ルできるかを評価することも考えられるが、飼料中の TGE の影響が加わると評価が難しくなる。

したがって、子宮肥大試験単独で評価の難しいデータを解釈することは適当ではない。段階的かつ階層的な評価系の一環としての本試験の位置付けを考慮するならば、構造活性相関、in vitro 試験成績等と合わせた総合的な評価を行なうべきであると考えられる。

4) その他のガイドライン化する上での留意点

① 用量設定

予め in vitro 試験成績あるいは他の安全性試験成績が得られない場合、用量設定試験を考慮すべきである。例えば、1 群あたりの動物数を減らし、公比 10 で 3 群程度の規模が考えられる。phase2 では MTD を越える用量でも子宮肥大は検出可能であったが、MTD 以下の用量で実施することが望ましく、これは用量設定試験を実施することで可能である。

② 対照群の子宮重量

飼料中の植物性エストロゲン以外にも子宮重量に影響を与える要因がある。したがって、飼料中の TGE 値を確認しておくことも重要であるが、最終的には、対照群の子宮重量を試験成績の採用する要件とすべきであると考えられる。OVX-adult ラット、幼若ラット、OVX-adult マウスで、それぞれ 115mg, 45 mg, 16mg 以上のデータは、試験系に何らかの問題があったとし、不採用とすることが考えられる。

③ 試験機関でのバリデーション

EE あるいは BPA 等の弱いエストロゲン様作用物質を用いたバリデーションを実施し、当該試験施設での試験系に問題のないことを確認しておく必要がある。バリデーションは定期的実施することが推奨される。なお、用量は OECD Validation phase 1 および 2 の結果を参考に設定する。

(参考文献)

1. Owens W and Koeter BWM. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: An Overview.

Environ Health Perspect 111:1527-1529

2. Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Dose-Response Studies. Environ Health Perspect 111:1530-1549

3. Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Coded Single-Dose Studies. Environ Health Perspect 111:1550-1558

4. Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Dietary Phytoestrogen Analyses. Environ Health Perspect 111:1559-1567

5. Yamasaki K, Sawasaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. 2003. Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 162,780 or antide. Arch Toxicol 76: 613-620

6. Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T, 2002, Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies. J Agric Food Chem 50: 3883-3885

7. Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RNM, Ben-Jonathan N. 1998. The xenoestrogen Bisphenol A induces growth, differentiation and C-fos gene expression in the female reproductive tract. Endocrinology 139: 2741-2747

8. Odum J, Pyrah ITG, Foster JR, Van Miller JP, Joiner RL, Ashby J. 1999. Comparative activities of *p*-nonylphenol and diethylstilbestrol in Noble rat mammary gland and uterotrophic bioassays. Reg Toxicol Pharmacol 25: 176-188

9. Odum J, Pyrah ITG, Soames AR,

Foster JR, Van Miller JP, Joiner RL, Ashby J. 1999. Effects of *p*-nonylphenol (NP) and diethylstilbestrol (DES) on the Alderley Park (ALPK) rat: Comparisons of mammary gland and uterus sensitivity following oral gavage or implanted minipumps. *J Appl Toxicol* 19: 367-378

10. Ashby J, Owens W, Odum J, Tinwell H. 2003. The Intact Immature Rodent Uterotrophic Bioassay: Possible Effects on Assay Sensitivity of Vomeronasal Signals from Male Rodents and Strain Differences. *Environ Health Perspect* 111:1568-1570

11. Padilla-banks E, Jefferson WN, Newbold RR. 2001. The Immature Mouse Is a Suitable Model for Detection of Estrogenicity in the Uterotrophic Bioassay. *Environ Health Perspect* 109:821-826

12. 小野宏, 太田亮, 渡辺千朗, 田面喜之. 子宮肥大および Hershberger 試験に関する研究. 平成 14 年度厚生労働科学研究補助金 (食品・化学物質安全総合研究事業) 分担研究報告書

13. Thigpen JE, Haseman JK, Saunders H, Lockler J, Caviness G, Grant M, Forsythe D, 2002, Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect Prev* 26: 381-393

E. 結論

昨年度の報告以降に報告された OECD Validation phase 2 の解析結果を中心に, 飼料中の植物性エストロジェンの影響, 動物種および系統, false positive および false negative 等の問題点と解決策を検討し, ガイドライン化する上での留意点についてまとめた. この中で, 最も留意すべき点として, 飼料中の植物性エストロジェンの影響があり, 特に, 体重あたりの摂取量が adult ラットに比べて高い幼若ラットさらにはマウスを用いる場合には TGE 濃度,

あるいはベースとなる子宮重量を確認する必要があることが明らかになった. また, 試験実施にあたっては, 実施機関は予めバリデーションを実施し, その試験系に問題のないことを確認しておく必要がある. 結果の評価にあたっては, 段階的かつ階層的な評価系の一環としての本試験の位置付けを考慮し, 構造活性相関, *in vitro* 試験成績等と合わせた総合的な評価を行なうべきであると考えられた.

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

著者: 永井賢司、子宮肥大試験-幼若ラット法、書籍編集者: (監修) 井上達, (編集) 今井清, 長村義之, 加藤正信, 菅野純、内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、出版社: シュプリンガー・フェアラーク(株)、日本、2000年、65-69

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

7. 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
子宮肥大試験を用いた E₂, Bisphenol A, Genistein の複合作用の検討 (飼料 PLD)
- 2 時間目及び 24 時間目の網羅的遺伝子発現の解析 -

分担研究者 松島 裕子

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 主任研究官

研究要旨

卵巣摘出マウスに 17 β -estradiol (E₂) 0.3 μ g/kg、Bisphenol A (BPA) 70mg/kg、Genistein (GEN) 25mg/kg、BPA (35mg/kg) と GNE (12.5mg/kg) は同時に、単回皮下投与した。投与 2 時間および 24 時間後に、子宮重量を測定し網羅的に遺伝子発現をみた。子宮重量は、投与 2 時間後の E₂、BPA、GEN、BPA+GEN いずれも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。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。GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現の解析では、spike で絶対量化した遺伝子発現量は、何れの群も 2 時間に比し、24 時間において顕著に上昇した。BPA 単独投与および GEN 単独投与における遺伝子発現量に比し、BPA+GEN 群で発現が 1.5 倍以上上昇する遺伝子は、投与後 2 時間で 28 遺伝子、24 時間で 40 遺伝子であったが、BPA と GEN の複合投与により相乗的に発現が増加する遺伝子群は E₂ 応答遺伝子群とは異なることが示唆された。

A. 研究目的

本研究は、エストロジェニックな内分泌かく乱候補化学物質である BPA と植物性エストロゲンである GEN の複合および相互作用を、すでに確立されつつある in vivo 高感度内分泌作用検出系である子宮肥大試験を用い、子宮重量の変化および網羅的遺伝子解析の面から、その実態を総合的に把握することを目的とする。

B. 研究方法

1) 動物の処置および子宮採取

動物は 6 週齢の雌性 C57BL/6N マウス (日本チャールスリバー) を購入し、1 週間の馴化期間後、卵巣摘出手術を行った。E₂、BPA、GEN の各化学物質は、DMSO で溶解し、コーンオイルで希釈した。術後 2 週間目に E₂ 0.3 μ g/kg、BPA 70mg/kg、GEN 25mg/kg、BPA (35mg/kg) と GEN (12.5mg/kg) は同時に、単回皮下投与した。溶媒対照群としてコーンオイル投与群、10% DMSO 含有コーンオイル群を置いた。投与後、2 時間および 24 時間

目に各群 5 匹ずつ頸椎脱臼により屠殺し、速やかに子宮を採取した。子宮重量 (wet) と内腔液を取り除いた (blotted) 重量を測定し、RNAlater に浸漬した。

動物の飼育には、入荷時より植物性エストロゲンを除去した飼料 (PLD 飼料) を用いた。

馴化期間中および屠殺時まで飼料および水は自由に摂取させた。試験は、温度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、照明 12 時間に設定されたバリア方式の動物室で実施した。動物は床敷をひいたプラスチックケージで 5 匹ずつ飼育した。

2) マウス組織からの RNA の分離精製

RNAlater (Ambion 社) にて RNase を不活化した子宮は、RNA 抽出操作まで -80 $^{\circ}$ C にて保存した。RNAlater を除いた後、RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破砕液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破砕液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて、SpikeRNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用い

て全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.5 μ g を電気泳動し品質を確認した。

3) GeneChip 解析

Affymetrix 社のプロトコールに従い、全 RNA 5 μ g を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製した。得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (Affymetrix 社) を用い、ビオチン化 CTP, UTP を共存させつつ cRNA を合成した。二本鎖 DNA および cRNA 精製には Affymetrix 社の GeneChip sample cleanup module キットを用いた。得られた cRNA を 300-500bp となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し GeneChip ターゲット液とした。GeneChip は MOE430A を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16~18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNA のシグナル値を元に、各遺伝子のシグナル値を DNA 当たりの値に変換し絶対量化した値を用い、Gene Spring にて解析を行った。

C. 研究結果

1) 子宮重量は、投与 2 時間後では E_2 、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 E_2 、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。

① Scatter 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。

D. 考察

本研究は、エストロジェニックな内分泌かく乱化学物質である BPA と植物性エストロゲンである GEN の複合および相互作用を、すでに確立されつつある in vivo 高感度内分泌作用検出系である子宮肥大試験を用い、子宮重量の変化および網羅的遺伝子解析の面から、その実態を総合的に検討した。

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 1.5 倍以上上昇する相乗的遺伝子 (投与後 2 時間で 28 遺伝子、24 時間では 40 遺伝子) の中には、 E_2 により発現が上昇する多くの遺伝子、例えば heat shock protein、insulin-like growth factor binding protein、glucose regulated protein 等が含まれていなかった。

人体への実際的な暴露形態は複合的であり、個々の化学物質の影響が小さいものであっても相加、あるいは相乗性を示す場合には、全体としてのリスク評価が必要となる点から、複合作用の検討は非常に重要である。

今回得られた遺伝子リストの解析を更に進めることで、この主要な問題の解明の糸口となることが期待される。

E. 結論

子宮肥大反応が引き起こされる最低用量に近い低用量においても、BPA と GEN による子宮の遺伝子発現変化が十分に推測されることが分かった。さらに、複合投与時に相加的あるいは相乗的に反応する遺伝子群が抽出されることが分かった。これらから、エストロゲン様化学物質に共通の作用と、個々の物質に固有の作用とを適切に評価する糸口となる情

報が保たれると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

雑誌

・ Yuko Matsuhima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun kanno, Twenty-eight day repeated dose oral toxicity test of synergist of a pyrethroid insecticide, Bull Natl Inst Health Sci (2003) 121, 040-047.

・ 小川幸男、関田清司、梅村隆志、齊藤 実、小野 敦、川崎 靖、内田雄幸、松島裕子、井上 達、菅野 純、Wistar ラットによるギムネマ・シルベスタ葉抽出物の 52 週間混餌投与毒性試験、食衛誌、45、8-18、2003

・ 関田清司、梅村隆志、齊藤 実、小川幸夫、上野克典、金子豊蔵、内田雄幸、松島裕子、川崎 靖、井上 達、F344 ラットによるクーロー色素の 90 日間反復混餌投与毒性試験、食衛誌、43、148-154、2003

・ 関田清司、梅村隆志、齊藤 実、小川幸夫、上野克典、金子豊蔵。内田雄幸、松島裕子、川崎 靖、黒川雄二、井上 達、F344 ラットによるフクロノリ抽出物の 90 日間反復混餌投与毒性試験、食衛誌、43、96-101、2002

2. 学会発表

- 1) 卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた農薬 o,p'-DDT と Methoxychlor エストロゲン様作用の検討、環境ホルモン学会第 5 回研究発表会、平成 14 年 11 月 25、26 日 (2002)、松島裕子、井上 達、菅野 純
- 2) 子宮肥大の特性について、第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会、平成 13 年 6 月 10~12 日 (2001)、松島裕子、井上 達、菅野 純
- 3) 17 β -estradiol の思春期前ラット投与

における子宮肥大について -内分泌かく乱作用を照準とした経世代試験改良のための考察-、日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会)、横浜、第 3 回、2000 年、松島裕子、井上 達、菅野 純

H. 知的所有権の取得状況

なし

8. 内分泌かく乱化学物質の胎生期曝露による包皮分離試験に関する研究

分担研究者 吉村慎介 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 病理学研究室長

研究要旨 化学物質の投与時期と雄ラットの性成熟時期の変化との関連を明らかにするため、抗アンドロゲン物質であるビクロゾリン(VZ)、エストロゲン剤であるエチニルエストラジオール(EE)、さらにタモキシフェン(TAM)を妊娠 14-17 日、あるいは 18-21 日にラットに投与し、雄出生児の包皮分離を観察した。その結果、FLU および VZ では尿道下裂が発生し、これらの例では包皮分離の完了が判定できなかった。尿道下裂発生例を除いて検定するといずれの化学物質でも明らかな遅延はみられなかった。

A. 研究目的

本研究は雄動物を対象に、内分泌かく乱化学物質の投与時期、投与期間の違いが雄ラットの性成熟時期を含む雄性生殖器および副生殖器のその後の分化、発達にどのような影響を与えるかにつき明らかにするとともに、これらの影響を検出するためのスクリーニング試験法を確立することを目的としている。そのため、胎生期の異なる時期に、代表的な抗アンドロゲン物質あるいはエストロゲン様作用物質を投与して、包皮分離時期をマーカーとして検索し、さらに病理形態学的ならびに組織学的に雄性生殖器・副生殖器関連組織に示される変化についても観察する。

B. 研究方法

11 週齢で購入した雌雄ラット(系統: Crj:CD(SD)IGS)を交配し、交尾確認日を妊娠 0 日として、コーン油に溶解した VZ、EE あるいは TAM を妊娠 14 日から 17 日(GD 14-17)まで、あるいは妊娠 18 日から 21 日まで(GD 18-21)4 日間投与した。投与前の体重をもとに平均値が均等になるよう群分けを行い、投与経路は強制経口投与とした。投与量を VZ は 10、30、100 mg/kg/day、EE は 10、100 µg/kg/day、TAM は 30、100 µg/kg/day とし、各群 3 から 5 例の妊娠ラットに投与した。対照群には溶媒であるコーン油を投与した。出生日を 0 日齢とし、

6 日齢に出生児の肛門生殖突起間距離(AGD)を測定した後、各腹より 4 匹の雄出生児を残した。体重を 0、6、22、35、56 日齢および包皮分離完了日に測定した。35 から 56 日齢まで包皮分離を肉眼的に観察した後、56 日齢に麻酔下放血屠殺して剖検し、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢を採取し、ホルマリン固定後に重量を測定したほか、包皮および陰茎についても固定し、一部の例を病理組織学的に観察した。解剖時および分離完了時体重、包皮分離完了日、AGD および AGD 測定時の体重、器官重量については多重比較を行った。

C. 研究結果

(1) 生殖器奇形の発生(表 1)

VZ 曝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 に曝露した群の 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 曝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 曝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 に曝露した群にみられ、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 曝露群に認められた。

(2) 包皮分離の観察 (表 2)

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 曝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、いずれの曝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 µg/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 µg/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 (表 3)

AGD は体重補正值 ($\text{mm}/\sqrt{\text{g}}$) で比較した。その結果、VZ では GD 14-17 曝露群の 10 mg/kg 以上の全群および GD 18-21 曝露群の 100 mg/kg 群で有意に短縮した。EE では GD 18-21 に曝露した 10 µg/kg 群に有意な伸長がみられたが、100 µg/kg 群に有意な差はなかった。TAM 曝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 (表 4)

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 に曝露した 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 に曝露した 100 µg/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 に曝露した 100 µg/kg 群の精

巣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。しかし、尿道下裂が発生した例では龟头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、龟头腹側面に上皮層の形成はなく、包皮と龟头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。

D. 考察

VZ の妊娠ラットへの投与により雄出生児に尿道下裂が発生することがすでに知られている。また、VZ では GD 15-16 の曝露が最も感受性が高いと報告されている。包皮分離の完了は陰茎腹側面における包皮の分離で判定するが、尿道下裂が発生すると包皮分離完了時期の確認ができないため、発生の可能性が少ないと考えられる GD 18 以降の投与についても試みたところ、VZ では GD 14-17 曝露で陰茎裂と包皮裂の両方を伴う尿道下裂がみられたが、GD 18-21 の曝露ではいずれの発生もなかった。しかし、昨年度報告したように FLU では GD 14-17 曝露で尿道下裂を伴う陰茎裂と包皮裂の両方がみられ、発生の可能性が少ないと予想される GD 18-21 曝露では包皮裂はなかったが、尿道下裂を伴う陰茎裂がみられ、包皮分離完了の判定はできなかった。このように FLU および VZ はいずれもアンドロゲン受容体拮抗薬であるが、陰茎裂を発生させる曝露時期に相違がみられた。包皮分離の完了は尿道下裂例を除いて判定したが、

いずれの化学物質でも包皮分離の遅延はみられなかった。

AGD に及ぼす影響は VZ 曝露で明らかであった。抗アンドロゲン物質で AGD が短縮することが知られており、その感度も比較的高いといわれている。

器官相対重量については、VZ の GD 14-17 曝露群で前立腺の相対重量が低値を示した。この群は、前立腺の無形成あるいは低形成が認められている。TAM では精嚢重量が低値を示したが、その他には明らかな変化はなかった。

E. 結論

抗アンドロゲン物質である VZ の GD 14-17 曝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 曝露では尿道下裂が発生しなかったが、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、胎生期曝露による包皮分離試験の有効性は明らかではなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

雑誌

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

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

表 1 胎生期に化学物質を曝露した雄ラットの生殖器奇形

化学物質	曝露時期	群	例数	腹数	陰茎裂・ 尿道下裂	包皮裂	異所性 精巣	前立腺 無・低形成
VZ								
	GD 14-17	Control	20	5	0	0	0	0
		10 mg/kg	20	5	0	0	0	0
		30 mg/kg	20	5	0	0	0	0
		100 mg/kg	20	5	17	17	1	1
	GD 18-21	Control	20	5	0	0	0	0
		10 mg/kg	16	4	0	0	1	0
		30 mg/kg	16	4	0	0	0	0
		100 mg/kg	15	4	0	0	0	0
EE								
	GD 14-17	Control	16	4	0	0	0	0
		10 µg/kg	16	4	0	0	0	0
		100 µg/kg	20	5	0	0	0	0
	GD 18-21	Control	19	5	0	0	0	0
		10 µg/kg	15	4	0	0	0	0
		100 µg/kg	16	4	0	0	0	0
TAM								
	GD 14-17	Control	16	4	0	0	0	0
		30 µg/kg	15	4	0	0	0	0
		100 µg/kg	7	2	0	0	0	0
100 µg/kg群の2/4例の妊娠雌は死亡								
	GD 18-21	Control	19	5	0	0	0	0
		30 µg/kg	12	3	0	0	0	0
		100 µg/kg	11	3	0	0	0	0

曝露時期, 妊娠日

表 2 胎生期に化学物質を曝露した雄ラットの包皮分離完了時期

化学物質	曝露時期	群	例数	腹数	分離完了時日齢	分離完了時体重(g)	未完例
VZ							
	GD 14-17	Control	20	5	44.4 ± 2.0	245.3 ± 18.5	0
		10 mg/kg	20	5	43.7 ± 1.8	242.4 ± 21.2	0
		30 mg/kg	20	5	44.5 ± 1.8	246.2 ± 15.6	0
		100 mg/kg	3	1	43.7 ± 1.5	254.1 ± 34.7	0
100 mg/kg群の尿道下裂17例は除外した							
	GD 18-21	Control	20	5	44.1 ± 2.0	252.1 ± 39.0	0
		10 mg/kg	16	4	43.8 ± 2.3	248.2 ± 24.4	0
		30 mg/kg	16	4	43.3 ± 2.3	240.8 ± 19.0	0
		100 mg/kg	15	4	45.1 ± 2.3	258.9 ± 25.2	0
EE							
	GD 14-17	Control	16	4	44.4 ± 1.5	254.6 ± 14.2	0
		10 µg/kg	16	4	45.6 ± 2.1	240.2 ± 12.2 *	0
		100 µg/kg	20	5	45.8 ± 2.5	261.6 ± 22.7	0
	GD 18-21	Control	19	5	43.6 ± 1.7	246.5 ± 15.1	0
		10 µg/kg	15	4	43.3 ± 1.4	247.6 ± 17.1	0
		100 µg/kg	16	4	42.8 ± 1.8	247.6 ± 14.6	0
TAM							
	GD 14-17	Control	16	4	44.4 ± 1.5	254.6 ± 14.2	0
		30 µg/kg	15	4	44.3 ± 1.8	250.9 ± 28.8	0
		100 µg/kg	7	2	43.6 ± 1.7	245.3 ± 17.9	0
100 µg/kg群の2/4例の妊娠雌は死亡							
	GD 18-21	Control	19	5	43.6 ± 1.7	246.5 ± 15.1	0
		30 µg/kg	12	3	43.2 ± 1.3	242.7 ± 32.1	0
		100 µg/kg	11	3	43.7 ± 1.6	255.3 ± 28.0	0

曝露時期, 妊娠日; *, p<0.05

表 3 胎生期に化学物質を曝露した雄ラットの6日齢における AGD体重補正值

化学物質	曝露時期	群	例数	腹数	AGD体重補正值 (mm ³ √g)	体重 (g)
VZ						
	GD 14-17	Control	35	5	286 ± 0.18	131 ± 1.2
		10 mg/kg	38	5	273 ± 0.18 **	143 ± 1.7 **
		30 mg/kg	28	5	274 ± 0.13 *	133 ± 0.7
		100 mg/kg	34	5	1.98 ± 0.22 **	138 ± 2.0
	GD 18-21	Control	43	5	268 ± 0.27	130 ± 1.9
		10 mg/kg	28	4	259 ± 0.18	132 ± 1.1
		30 mg/kg	24	4	270 ± 0.12	144 ± 2.0 **
		100 mg/kg	26	4	246 ± 0.22 **	136 ± 1.3
EE						
GD 14-17		Control	30	4	280 ± 0.19	133 ± 2.0
		10 μg/kg	26	4	278 ± 0.17	114 ± 1.3 **
		100 μg/kg	37	5	281 ± 0.16	130 ± 1.0
GD 18-21		Control	32	5	279 ± 0.20	141 ± 0.7
		10 μg/kg	35	4	297 ± 0.18 **	126 ± 1.0 **
		100 μg/kg	31	5	290 ± 0.21	147 ± 1.6
TAM						
GD 14-17		Control	30	4	280 ± 0.19	133 ± 2.0
		30 μg/kg	25	4	275 ± 0.22	141 ± 2.3
		100 μg/kg	9	2	273 ± 0.17	139 ± 0.7
GD 18-21		Control	32	5	279 ± 0.20	141 ± 0.7
		30 μg/kg	16	3	273 ± 0.14	158 ± 1.5 **
		100 μg/kg	25	4	270 ± 0.23	142 ± 2.2

曝露時期, 妊娠日; *, p<0.05; **, p<0.01

表 4 胎生期に化学物質を曝露した雄ラットの器官相対重量

化学物質 曝露時期	群	例数	腹数	解剖時体重(g)	精巣(mg/g)	精巣上体(mg/g)	前立腺(mg/g)	精嚢(mg/g)
VZ								
14-17	Control	20	5	355.2 ± 24.5	7.177 ± 0.601	1.463 ± 0.123	0.982 ± 0.122	1.729 ± 0.313
	10 mg/kg	19	5	352.8 ± 11.7	7.492 ± 0.460	1.518 ± 0.127	0.935 ± 0.122	1.756 ± 0.195
	30 mg/kg	19	5	344.5 ± 24.4	7.766 ± 0.739	1.481 ± 0.168	0.965 ± 0.151	1.817 ± 0.362
	100 mg/kg	20	1	369.2 ± 20.7	7.404 ± 0.875	1.489 ± 0.117	0.755 ± 0.129**	1.675 ± 0.249
18-21	Control	20	5	363.8 ± 49.2	7.766 ± 1.132	1.523 ± 0.196	0.970 ± 0.155	1.869 ± 0.286
	10 mg/kg	16	4	358.5 ± 34.6	7.768 ± 0.917	1.596 ± 0.199	1.007 ± 0.212	1.996 ± 0.397
	30 mg/kg	16	4	357.4 ± 21.8	7.525 ± 0.503	1.597 ± 0.126	0.934 ± 0.114	1.830 ± 0.376
	100 mg/kg	15	4	356.9 ± 20.9	7.588 ± 0.627	1.515 ± 0.118	0.970 ± 0.173	1.762 ± 0.184
EE								
14-17	Control	16	4	364.1 ± 22.9	7.912 ± 0.557	1.583 ± 0.147	0.954 ± 0.111	1.918 ± 0.162
	10 µg/kg	16	4	333.8 ± 22.2**	7.693 ± 0.383	1.482 ± 0.092	0.967 ± 0.175	1.877 ± 0.321
	100 µg/kg	20	5	354.9 ± 21.2	7.745 ± 0.348	1.538 ± 0.101	0.980 ± 0.176	1.993 ± 0.305
18-21	Control	19	5	358.0 ± 21.9	7.640 ± 0.611	1.478 ± 0.131	0.946 ± 0.145	1.969 ± 0.275
	10 µg/kg	15	4	371.3 ± 28.5	7.759 ± 0.929	1.545 ± 0.114	1.037 ± 0.140	2.107 ± 0.178
	100 µg/kg	16	4	364.8 ± 14.2	7.791 ± 0.620	1.618 ± 0.122**	0.923 ± 0.159	2.070 ± 0.237
TAM								
14-17	Control	16	4	364.1 ± 22.9	7.912 ± 0.557	1.583 ± 0.147	0.954 ± 0.111	1.918 ± 0.162
	30 µg/kg	15	4	355.9 ± 27.7	7.829 ± 0.658	1.491 ± 0.134	1.011 ± 0.197	1.934 ± 0.305
	100 µg/kg	7	2	362.1 ± 17.1	7.317 ± 0.486	1.470 ± 0.140	0.902 ± 0.071	1.667 ± 0.136*
100 µg/kg群の2/4例の妊娠雌は死亡								
18-21	Control	19	5	358.0 ± 21.9	7.640 ± 0.611	1.478 ± 0.131	0.946 ± 0.145	1.969 ± 0.275
	30 µg/kg	12	3	359.8 ± 42.4	7.142 ± 0.772	1.469 ± 0.077	0.932 ± 0.186	1.869 ± 0.273
	100 µg/kg	11	3	372.2 ± 47.7	7.497 ± 0.584	1.514 ± 0.102	0.950 ± 0.126	1.738 ± 0.195

曝露時期, 妊娠日; *, p<0.05; **, p<0.01

9. 内分泌かく乱化学物質の新生児期曝露による包皮分離試験に関する研究

分担研究者 吉村慎介 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 病理学研究室長

研究要旨 化学物質の投与時期と雄ラットの性成熟時期の変化との関連を明らかにするため、抗アンドロゲン物質であるフルタミド(FLU) およびピンクロゾリン(VZ)、エストロゲン剤であるジエチルスチルベストロール(DES)、エチニルエストラジオール(EE)、さらにタモキシフェン(TAM)を1-5日齢の新生児雄ラットに投与して包皮分離を観察し、17-21日齢あるいは35-39日齢に投与した群と比較した。その結果、FLUおよびVZの35-39日齢での曝露およびEE、TAMの1-5日齢曝露では包皮分離の有意な遅延がみられ、DESでは1-5および35-39日齢曝露で有意な遅延がみられた。

A. 研究目的

本研究は雄動物を対象に、内分泌かく乱化学物質の投与時期、投与期間の違いが雄ラットの性成熟時期を含む雄性生殖器および副生殖器のその後の分化、発達にどのような影響を与えるかにつき明らかにするとともに、これらの影響を検出するためのスクリーニング試験法を確立することを目的としている。そのため、新生児期およびその後の異なる時期に、代表的な抗アンドロゲン物質あるいはエストロゲン様作用物質を投与して、包皮分離時期をマーカーとして検索し、さらに病理形態学的ならびに組織学的に雄性生殖器・副生殖器関連組織に示される変化についても観察する。

B. 研究方法

11週齢で購入した雌雄ラット(系統:Crj:CD(SD)IGS)を交配し、分娩させて得た雄ラットを用いた。出生日を0日齢(PND 0)とした。PND 1-5の曝露のためにはPND 1に雄5あるいは6匹を残し、コーン油に溶解したFLU、VZ、DES、EEあるいはTAMをPND 1から5まで5日間投与した。また、新生児曝露との比較のために、離乳直前のPND 17-21、性成熟

直前のPND 35-39に投与する試験を実施した。投与経路は強制経口投与とし、PND 1-5投与には栄養カテーテルを用い、その他の曝露時期には胃ゾンデを用いた。投与量をFLUは、1、10、30mg/kg/day、VZは10、30、100mg/kg/day、DESは10、100、300 μ g/kg/day、EEは10、100 μ g/kg/day、TAMは0.3、1、3mg/kg/dayとし、各群3あるいは4腹(一部2腹)よりの雄出生児に投与した。溶媒対照群にはコーン油を投与した。いずれの曝露時期の群もPND 6に各腹より4匹の雄を残した。体重を投与日のほかPND 0、6、22、35、56および包皮分離完了日に測定した。PND 35からPND 56まで包皮分離を観察した後、PND 56に麻酔下放血屠殺して剖検し、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢を採取してホルマリン固定後に重量を測定したほか、包皮および陰茎についても固定し、一部の例を病理組織学的に観察した。包皮分離完了時の日齢および体重、解剖時体重、器官重量については多重比較を行った。ただし、包皮分離がPND 56の解剖時にも完了しない例は完了日を56日として集計し、検定した。

C. 研究結果

(1) 包皮分離の観察 (表 1)

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 10mg/kg 以上、VZ は 30mg/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 曝露群に有意な遅延はみられなかった。

DES では PND 1-5 に曝露した 100 および 300 μ g/kg 群で有意な遅延が認められ、100 μ g/kg 群の 16 例中 2 例、300 μ g/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 に曝露した 100 および 300 μ g/kg 群で有意な遅延がみられた。PND 17-21 曝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 の曝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 曝露では 1 および 3 mg/kg 群で有意差がみられ、1mg/kg 群の 16 例中 5 例および 3mg/kg 群の 15 例中 13 例が解剖時にも完了しなかった。TAM の 0.3mg/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 曝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 (表 2)

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 に曝露した 30mg/kg 群の精巣上部、前立腺および精嚢の相対重量が有意な低値を示し、10mg/kg でも精嚢の相対重量が有意な低値を示したが、他の曝露時期に変化はみられなかった。VZ では PND 1-5 に曝露した 10mg/kg 群の精巣上部の相対重量が有意な低値を示したが用量依存性はなく、他の群および曝露時期に有意な変化はみられなかった。

DES では PND 1-5 に曝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 曝露の精巣上部、PND 17-21 曝露の精巣および精巣上部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 曝露群に変化はみられなかった。

EE では PND 1-5 曝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、その他の曝露時期では、PND 35-39 に曝露した 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 曝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、その他の曝露時期では、PND 35-39 に 3 mg/kg を曝露した群で体重の有意な低値がみられ、同群の精巣上部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。DES や EE、TAM の PND 1-5 曝露で生じた包皮分離未完例では、陰茎亀頭腹側面の上皮