

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あるいは精巣を取り出し、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。固定後に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/精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。さらに半数の内分泌かく乱化学物質に暴露した妊娠マウスは、妊娠 19 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、光顕観察を実施するとともに、Tunel 法に準じて Tunel 陽性細胞の有無を観察した。

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

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。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（図 1,2）。

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、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 (図 3)。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。

D. 考察

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。

正常な精子形成過程において、胚細胞が減少することによって、成熟精子細胞となりうる細胞の 75%もが成人の精巣では失われるといわれており、新生児期、思春期前の発育

過程においても精巣では種々の頻度で胚細胞の変性が恒常的に起こるとされている。ラット、マウスにおける形態学的な検討によると、通常、精原細胞において最も多く胚細胞の変性が起こり、この変性はアポトーシスによる細胞死であることが分かっている。また、精巣機能を維持するうえで重要な作用を有するセルトリ細胞やライディッヒ細胞は、アポトーシス細胞死の形態をとらないようである。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 (とく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。

E. 結論

DES、E₂、EE、TAM あるいは ATZ のマウス胎児期暴露により、生殖巣に生ずる超微形態的变化を短期に検出することができた。したがって、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い。

G. 研究発表(2001-2003 年度)

1. 論文発表

書籍

Nagao T., Kagawa N., Nakagomi M., Fujikawa K. Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens. In: Advances in Male Mediated Developmental Toxicity. (Robaire B. and Holes BF. eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.211-217.

雑誌

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Nakagomi M., Watanabe C., Yoshimura S., Saito Y., Usumi K., Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod. Toxicol.*, 18: 109-120 (2004)

Watanabe C., Kuwagata M., Yoshimura S., Azegami J., Kojima K., Ono H., Nagao T. An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Cong. Anom.*, 43: 177-179 (2003)

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).

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).

2. 学会発表

Nagao T.: Biological effects of diethylstilbestrol. Transgenerational effect. 国際毒性病理学会 (神戸) 2004

長尾 哲二: ジェチルスチルベステロールの生体影響 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム 性腺軸 (視床下部-下垂体-性腺) の発育と異常 (葉山)、抄録集 pp. 41-45、2003

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 二郎、小島 幸一: 生後 1 日からのラット強制経口投与方法の検討 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」ジェチルスチルベステロールの生体影響 第 42 回日本先天異常学会 (浜松)、抄録集 p.76、2002.

桑形 麻樹子、宗岡 克政、渡辺 千朗、長尾 哲二: ジェチルスチルベステ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)、抄録集 p.166、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、臼見 憲司、斉藤 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., Muneoka K., Nagao T., Ono H., Takigawa M.: Behavior and neurochemical evidence of the dopaminergic and serotonergic dysregulation in male rats exposed to 5-bromo-2'-deoxyuridine in utero: A possible model of hyperactivity disorder. 2001 年国際薬理学会広島会議 (広島)、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無い。

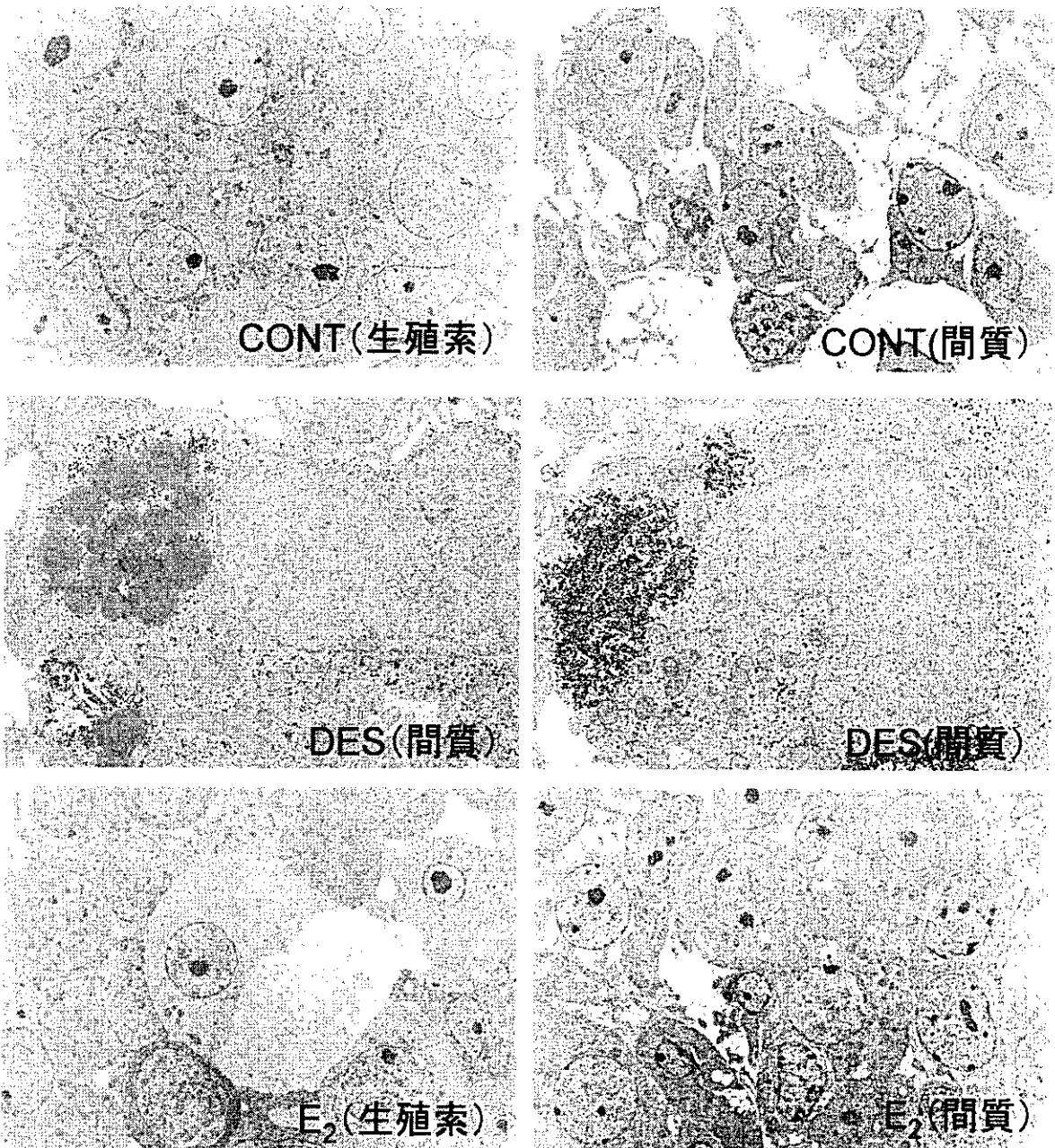


図1 胎齢10~13日に内分泌かく乱化学物質を暴露した胎児の投与後24時間の生殖巣の電顕像 (I)

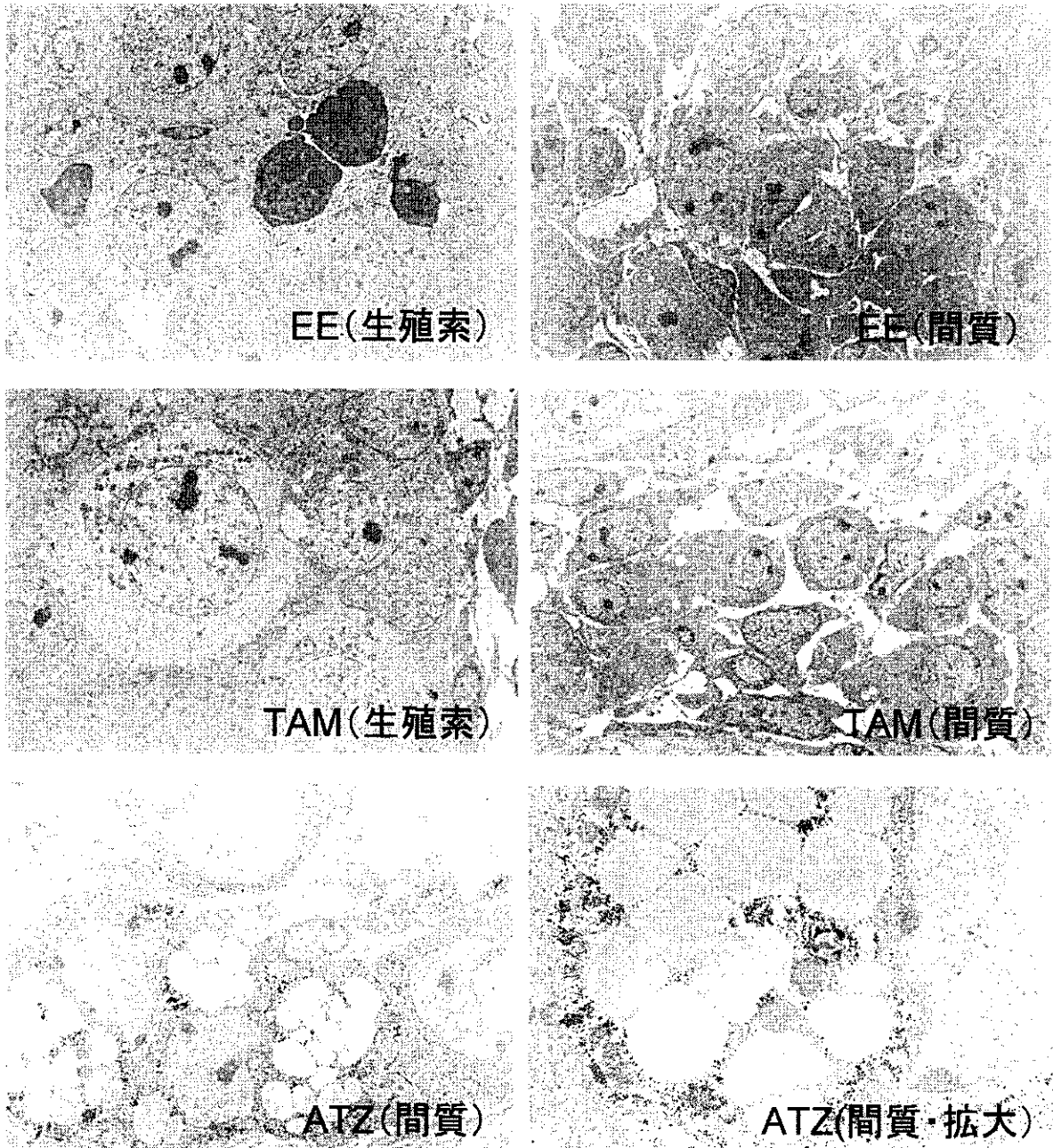


図2 胎齡10～13日に内分泌かく乱化学物質を暴露した胎児の投与後24時間の生殖巣の電顕像 (I I)

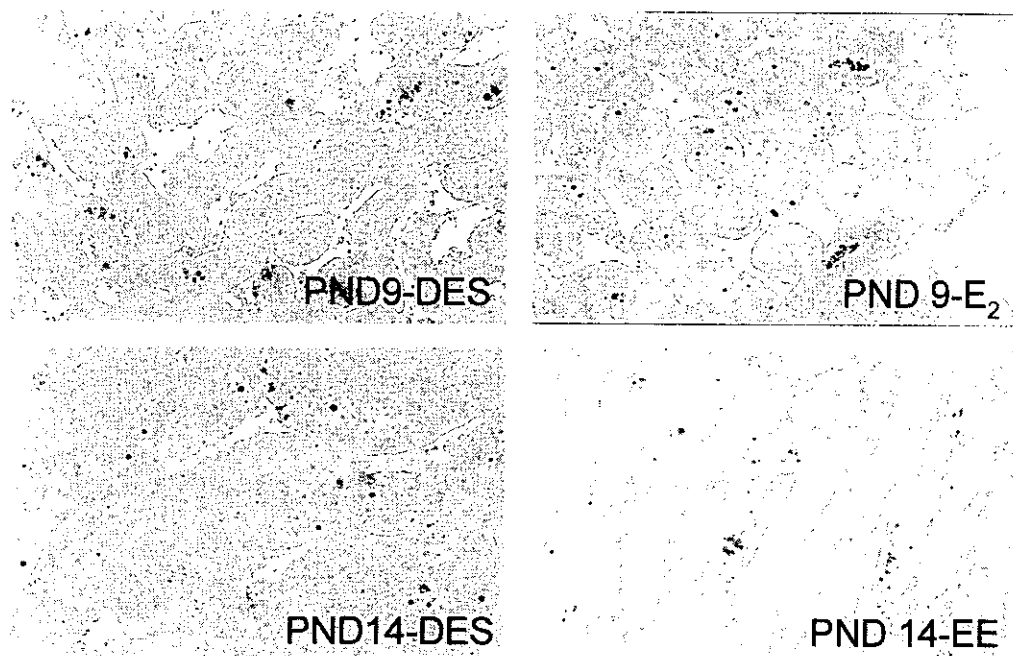


図3 胎齡10～13日に内分泌かく乱化学物質を暴露した新生児の生後の精巢にみられたTunel陽性細胞

1 8. 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

分担研究者 ○長尾 哲二¹、斉藤義明²、臼見憲司²

¹近畿大学理工学部生命科学科 発生生物学研究室 教授

² (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 病理学研究室

研究要旨：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(Sexual dimorphic nucleus of preoptic area: SDN-POA)や前腹側脳室周囲核(anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area: AVPVN-POA)をはじめとする神経核の形成に及ぼす影響を暴露後の比較的早期に検索することを目的として、視床下部における神経細胞の過剰アポトーシスを検討し、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た。今年度は、青班核におけるアポトーシス誘発について検討し、青班核の DES 曝露による性差の逆転にはアポトーシス誘発は関連しないことを明らかにした。さらに、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引き続き検討した結果、視床下部ではドパミン伝達系の増加傾向がみられたことから、神経内分泌系への影響が確認された。

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および青班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、過剰アポトーシス誘発あるいは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した。

B. 研究方法

Sprague-Dawley 系ラット（チャールズ・リバー株式会社）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（誕生日＝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、以下の実験を行った。

[実験 1] 視床を含む部位を 0.1M 燐酸緩衝 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 法に準拠して過剰アポトーシス細胞を観察した。

[実験 2] 青班核における過剰アポトーシスについても観察した。青班核は、大脳皮質や脊髄まで軸索を伸ば

している、脳幹の橋にある神経細胞群である。摘出した脳は、0.1M 磷酸緩衝 10%ホルマリン液に固定し、常法に従いパラフィン包埋して、Tunel 法に準じて Tunel 陽性細胞の有無を観察した。

次いで、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[実験 3]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

[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、Bcl 2 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(図 1)。

[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(図 2、3)。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

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 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、Bcl 2 の関与はないと判断された。近年、ビスフェノール A が、青班核の性分化を障害することが報告された(粟生ら、内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム 2003)。すなわち青班核の大きさは、対照群では雌のほうが大きい、妊娠期および授乳期に DES あるいはビスフェノール A を曝露されたラットでは雄のほうが大きく、性差が逆転した。そこで、本研究においては、性差の逆転が SDN-POA と同様に過剰アポトーシスによるものその有意な変動はみられなかった。そのことから、青班核における性差の逆転にはアポカどうか確認するために、青班核における DES 曝露後のアポトーシス誘発を観察したが、アポトーシスは関与しないことが明らかになった。

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、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過剰アポトーシス誘導、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い。

G. 研究発表(2001-2003)

1. 論文発表

書籍

Nagao T., Kagawa N., Nakagomi M., Fujikawa K. Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens. In: *Advances in Male Mediated Developmental Toxicity*. (Robaire B. and Holes BF. eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.211-217.

雑誌

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Nakagomi M., Watanabe C., Yoshimura S., Saito Y., Usumi K., Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod. Toxicol.*, 18: 109-120 (2004)

Watanabe C., Kuwagata M., Yoshimura S., Azegami J., Kojima K., Ono H., Nagao T. An improved technique for

repeated gavage administration to rat neonates. *Cong. Anom.*, 43: 177-179 (2003)

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).

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).

2. 学会発表

Nagao T.: Biological effects of diethylstilbestrol. Transgenerational effect. 国際毒性病理学会(神戸) 2004

長尾 哲二: ジエチルスチルベステロールの生体影響 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム 性腺軸(視床下部-下垂体-性腺)の発育と異常(葉山)、抄録集 pp. 41-45、2003

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 二郎、小島 幸一: 生後 1 日からのラット強制経口投与方法の検討 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テロールの生体影響 第 42 回日本先天異常学会

(浜松)、抄録集 p. 76、2002.

桑形 麻樹子、宗岡 克政、渡辺 千朗、長尾 哲二：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)、抄録集 p. 166、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、斉藤 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., Muneoka K., Nagao T., Ono H., Takigawa M.: Behavior and neurochemical evidence of the dopaminergic and serotonergic dysregulation in male rats exposed to 5-bromo-2'-deoxyuridine in utero: A possible model of hyperactivity disorder. 2001 年国際薬理学会広島会議 (広島)、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無い。

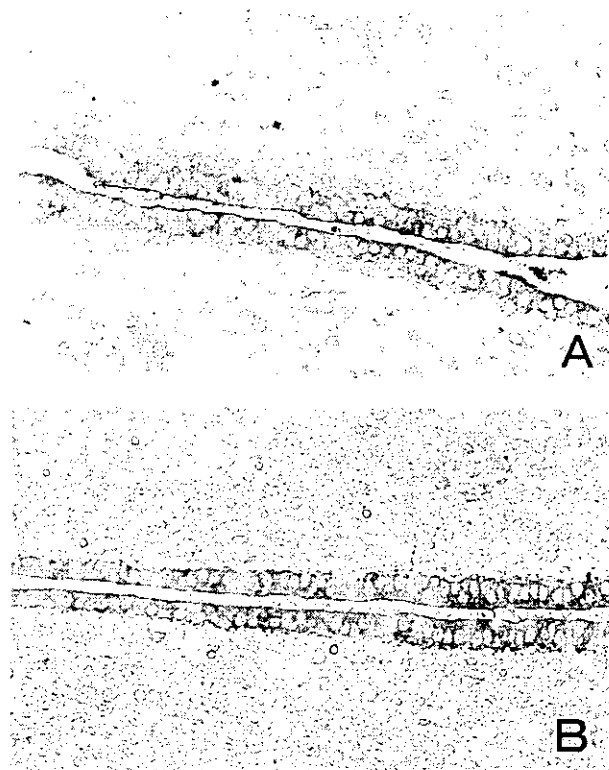


図1 新生児期にDES曝露されたラットの成熟後の青斑核
A：対照群 B：DES曝露群

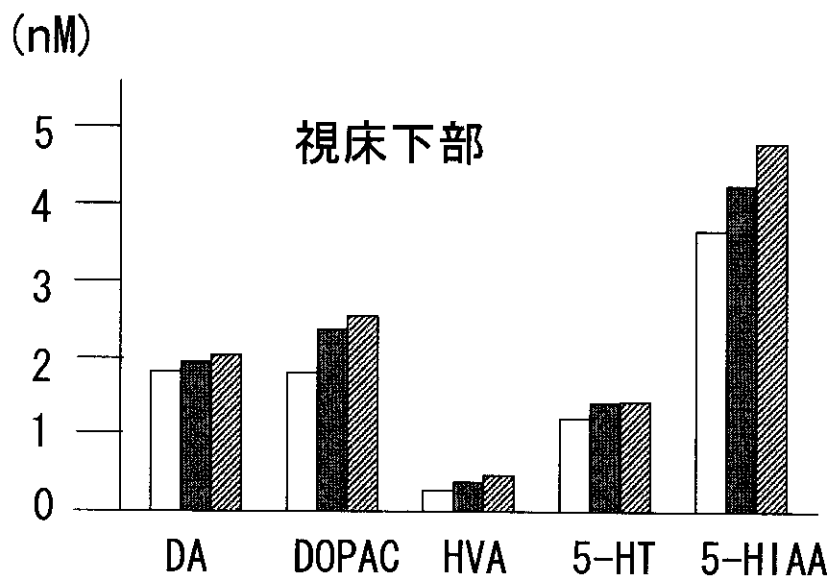
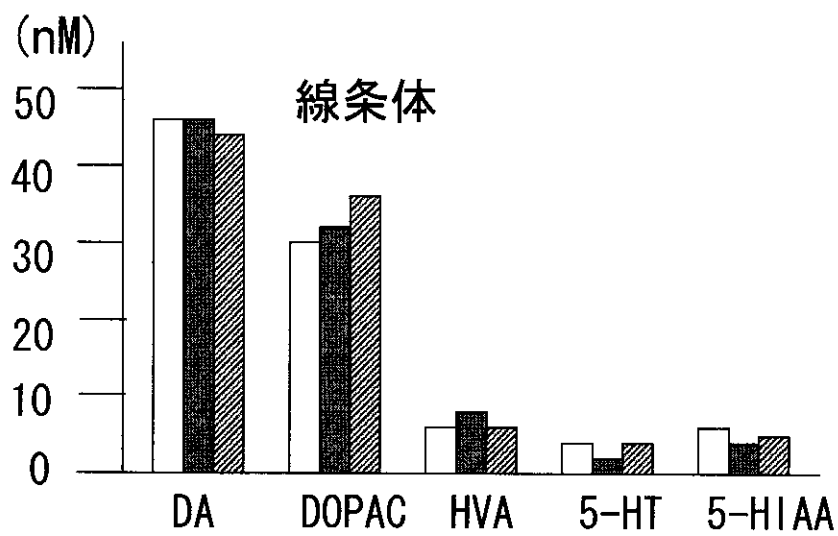
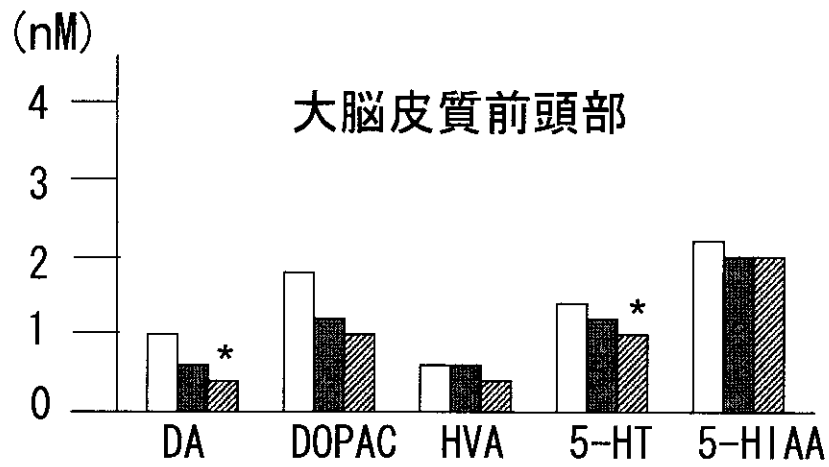


図2 新生児期にDES曝露されたラットの成熟後の脳内アミン濃度

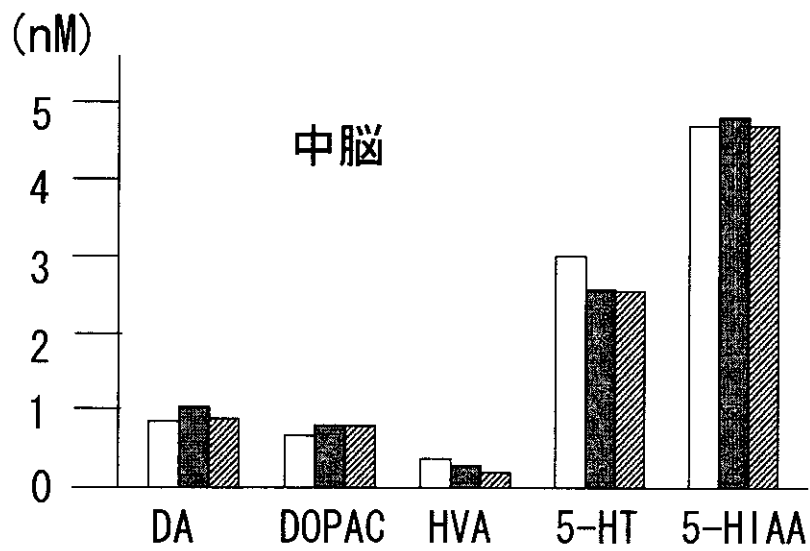
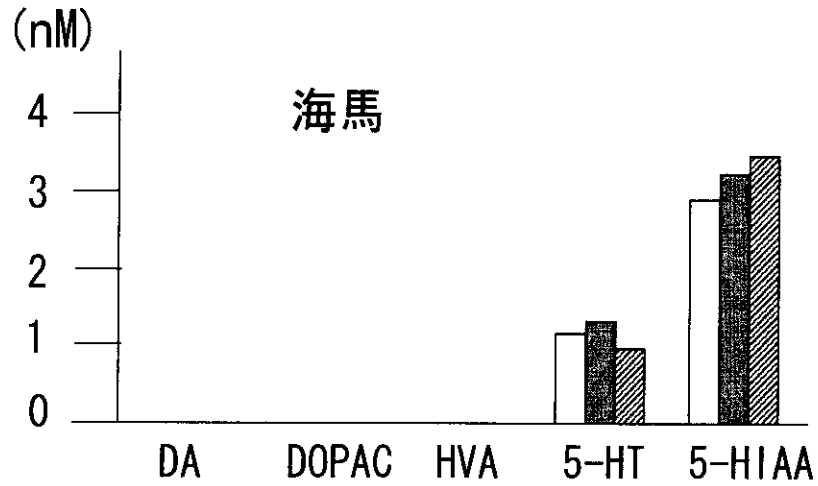


図3 新生児期にDES曝露されたラットの成熟後の脳内アミン濃度

□ : 対照群 ■ : DES 10 µg/kg ▨ : 50 µg/kg

DA:Dopamine; DOPAC:Dihydrophenylacetic acid; HVA:Homovanilic acid;
 5-HT:5-Hydroxytryptamine; 5-HIAA:5-Hydroxy-3-indolacetic acid
 * $P < 0.05$

19. トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱物質の検討

分担研究者 白井智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨 短期間で高率にアンドロゲン依存性前立腺癌を発生するトランスジェニックラット (Tg ラット) を用い抗アンドロゲン作用のある除草剤のアトラジンの前立腺発症に対する作用を検討したところ、抗アンドロゲン作用は検出できなかった。

A. 研究目的

トリアジン系除草剤であるアトラジンは、抗アンドロゲン作用の可能性が指摘されているのでこの動物に混餌投与し、その前立腺癌発生への影響を検討した。

B. 研究方法

6週齢の雄性 probasin-SV40 Tag Tg ラットに、アトラジンの0%、0.05%あるいは0.1%を13週間混餌投与した(図1)。投与終了時に剖検し、前立腺重量及び血清中テストステロン濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋市立大学動物実験委員会の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護を十分配慮しおこなった。

C. 研究結果

いずれの群にも死亡はみられなかった。剖検時には、0.05%群で12%、0.1%群で19%程度の体重増加抑制がみられた。前立腺重量及び血清中テストステロン濃度には有意な差はみられなかった(表1)。前立腺腹葉の Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) と腺癌の発生はずべての群で前例に認められ、発生率には差はなかった。そこで半定量的に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(表2)。しかし統計学的な有意差はなかった。なお、アトラジン投与群で体重増加抑制がみられたため、同程度の体重増加抑制を示す摂餌制限群を追加した実験を実施中である。

D. 考察

雄性 probasin-SV40 Tag Tg ラットの系をつかってアトラジン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、アトラジン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学された。追加実験は平成16年4月中にはデータが揃う予定である。

E. 結論

雄性 probasin-SV40 Tag Tg ラットの前立腺癌を用いる実験系では、アトラジンの抗アンドロゲン作用は検出できなかった。従って、アトラジンが有するとされている抗アンドロゲン作用は無いかきわめて比較的弱いと推測される。

G. 研究発表

1. 論文発表

著書

白井智之、内分泌活性物質の哺乳動物における実験的研究と人間集団への健康影響、季刊化学総説、内分泌

かく乱物質研究の最前線、日本化学
会編、学会出版センター、15-30、2001

雑誌

Ito, N., Tamano, S., Shirai, T. : A
medium-term rat liver bioassay for
rapid in vivo detection of
carcinogenic potential of chemicals.
Cancer Sci., 94: 3-8, 2003.

Cho, Y.-M., Takahashi, S., Asamoto,
A., Suzuki, S., Inaguma, S.,
Hokaiwado, N., Shirai, T. : Age-
dependent histopathological
findings in the prostate of
probasin/SV40 T antigen transgenic
rats: Lack of influence of
carcinogen or testosterone
treatment. Cancer Sci., 94: 153-157,
2003.

Suzuki, T., Mizuo, K., Nakazawa, H.,
Funae, Y., Fushiki, S., Fukushima,
S., Shirai, T., Narita, M. : Prenatal
and neonatal exposure to
bisphenol-A enhances the central
dopamine D1 receptor-mediated
action in mice: Enhancement of the
methamphetamine-induced abuse
state. Neuroscience, 117: 639-644,
2003.

Ichihara, T., Yoshino, H., Imai, N.,
Tsutsumi, T., Kawabe, M., Tamano, S.,

Inaguma, S., Suzuki, S., Shirai, T. :
Lack of carcinogenic risk in the
prostate with transplacental and
lactational exposure to bisphenol A
in rats. J. Toxicol. Sci., 28(3):
165-171, 2003.

Inaguma, S., Takahashi, S., Ohnishi,
H., Suzuki, S., Cho, Y.-M., Shirai,
T. : High susceptibility of the ACI
and spontaneously hypertensive rat
(SHR) strains to 2-amino-1-
methyl-6-phenylimidazo[4,5-
b]pyridine (PhIP) prostate
carcinogenesis. Cancer Sci., 94:
974-979, 2003.

Yoshida, M., Shimomoto, T.,
Katashima, S., Shirai, T., Nakae, D.,
Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A. :
Effects of maternal exposure to
nonylphenol on growth and
development of the female
reproductive system and uterine
carcinogenesis in rats. J. Toxicol.
Pathol., 16: 259-266, 2003.

Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho,
Y.-M., Tsuda, H., Shirai, T. Lack of
effect human *c-Ha-ras* prostate
carcinogenesis in *probasin/SV40* T
antigen transgenic rats. Cancer
Sci., 94:1042-1045, 2003.

Toshio Mori, katsumi Imaida, Seiko Tamano, Masashi Sano, Satoru Takahashi, Makoto Asamoto, Masazumi Takeshita, Hiroshi Ueda, and Tomoyuki Shirai, Beef tallow, but not perilla or corn oil, promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, Jpn, J. Cancer Res. 92, 1026-1033, 2001

Makoto Asamoto, Naomi Hokaiwado, Young-Man Cho, Satoru Takahashi, Yoshihisa Ikeda, Katsumi Imaida, and Tomoyuki Shirai, Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent, Cancer Research, 15, 4693-4700, 2001

2. 学会発表

白井智之、ラット前立腺癌モデルを用いてのイソフラボンによる化学予防、第62回日本癌学会総会、名古屋、2003年9月25日-27日。(日本癌学会総会記事 P. 45)

曹永晩、二口充、朝元誠人、稲熊真悟、白井智之、PhIP ラット前立腺癌における PIN から Carcinoma への進展に関わる因子の追究、第19回日本毒性病理学会、東京、2003年1月23、

24日。(第19回日本毒性病理学会講演要旨集、p. 66)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Effects of atrazine on prostate carcinoma in Probasin/SV40 Tag transgenic rats

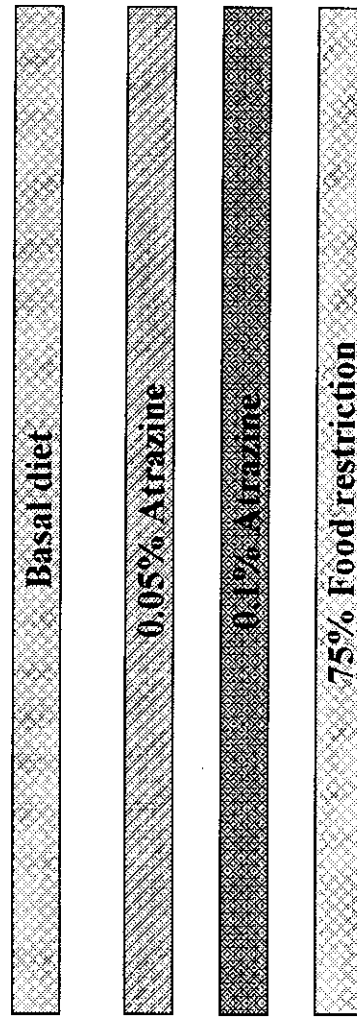
☒ 1

Animals: PB/SV40Tag Tg, 6 weeks of age, male

Number of Animals: 10/group

Duration of Experiment.: 13weeks

Experimental design:



Sacrificed at 19 weeks of age

Organ weight (body weight ratio)

表1-1

BW(g)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)	Prostate, (%)				
				Ventral (%)	Dorso-lateral (%)	Anterior+ S.V. (%)	Testes (%)	
Control	479.3	3.77	0.62	0.20	0.08	0.19	0.50	0.72
	±28.7	±0.27	±0.03	±0.12	±0.02	±0.09	±0.12	±0.03
0.05%	420.1	3.81	0.65	0.19	0.08	0.16	0.54	0.83
	±29.0	±0.42	±0.05	±0.02	±0.01	±0.02	±0.12	±0.13
0.1%	387.8	3.95	0.71	0.20	0.09	0.17	0.58	0.89
	±21.2	±0.27	±0.04	±0.02	±0.01	±0.01	±0.08	±0.06

S.V.: Seminal vesicle

n=10, Values are expressed as mean±S.D.