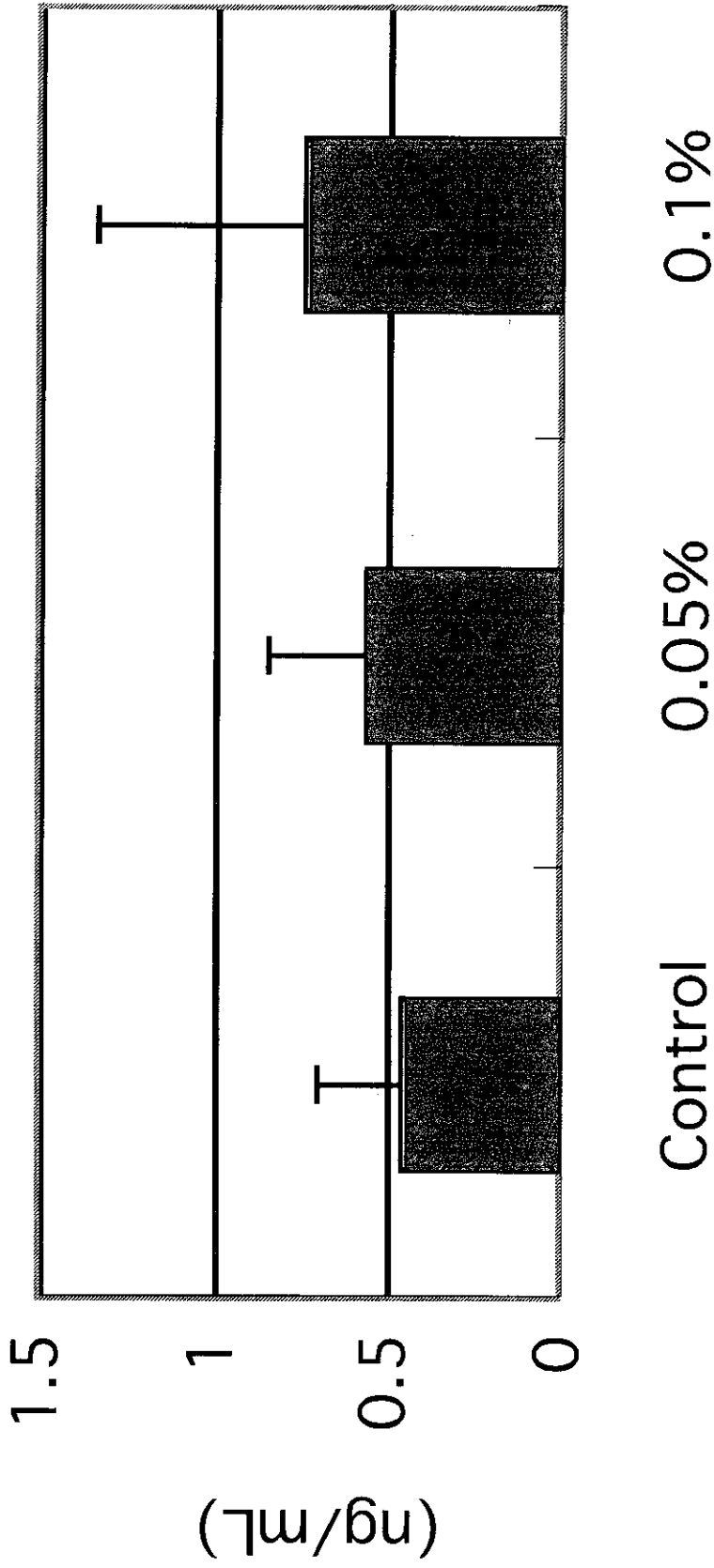


Testosterone (serum)

表1-2

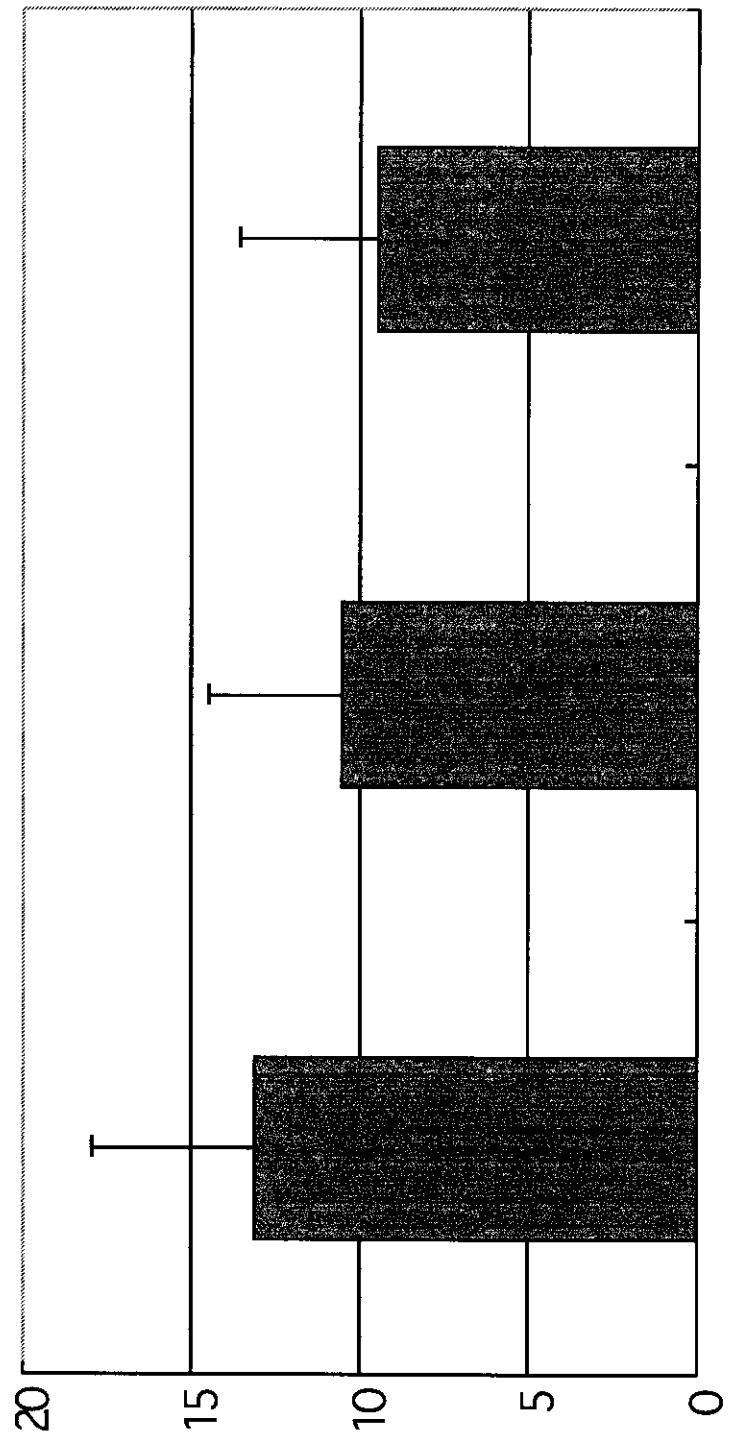


n=10, Values are expressed as mean±S.D.

Number of carcinoma in ventral prostate

表2

	Number	Incidence (%)
Control	13.1 ± 4.8	100
0.05%	10.5 ± 4.0	100
0.1%	9.5 ± 4.0	100



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

20. 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

分担研究者 広瀬雅雄

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 病理部長

研究要旨 内分泌かく乱化学物質の乳幼児期投与による発がん修飾作用については不明な点が多い。本実験では、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基礎検討の一つとして、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検索している。ラットの出生直後から離乳後の6週間、低ヨード飼料により母動物と児動物を飼育した後、児に対して甲状腺などに発癌標的性を示す *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 及び乳腺発癌物質である 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を投与した。現在は発癌物質処置後 20 週目であり、経過を観察している。発癌物質処置より 30 週間経過後に剖検し、病理組織学的に腫瘍の発現状況を低ヨード及び対照群の間で比較検討する。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質 (EDCs) の甲状腺、乳腺など主要臓器に対する発がん促進作用を検出するモデルについて、これまで成体動物を用いて種々の検討が行われてきた。一方、EDCs の乳幼児期投与による発がん修飾作用については不明な点が多い。

ヨード欠乏状態において、ラットの乳腺組織は異型性を呈し、腫瘍が誘発され、更に発癌物質に対する感受性が高くなることが報告されている (Eskin B.A., 1977)。また、エストロゲンに対するラット乳腺組織の反応性がヨード欠乏により高くなり、腺房細胞の増殖を促進する (Strum J.M. et al., 1979)。一方、乳腺腫瘍の増殖はヨードを含む食品で抑制され、ヨードは乳腺腫瘍発生に対し何らかの影響を与えていると考えられる

(Funahashi H. et al., 2001)。

今年度の実験においては、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基礎検討の一つとして、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する。

B. 研究方法

F344 妊娠雌ラット 10 匹を 2 群に分け、出産直後より、通常飼料 (AIN-93G, オリエンタル酵母工業) 及び低ヨード飼料 (AIN-93G, Iodine free) により飼育した。生後 3 週で児動物を離乳すると同時に、児動物にも 3 週間にわたり同じ飼料を与えた。生後 6 週より DHPN を 0.1% (雄) あるいは 0.2% (雌) 濃度で 4 週間飲水に混じり、更に生後 7 週時に 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を

50 mg/kg 体重の用量で強制経口投与した。発癌物質処置終了後は、毎週1回、胸・腹部の触診を行い、触知可能な腫瘍の発生の有無を観察するとともに、腫瘍が触知された際にはその発生部位及び大きさを記録している。現在、発癌物質処置終了後20週目(2004年1月末現在)であり、実験を継続している。

(倫理面への配慮)

動物の取扱いは、国立医薬品食品衛生研究所の規定に基づいて行っている。なお、屠殺はエーテル深麻酔下、動脈からの脱血により行い、動物へ苦痛を与えないよう留意する。

C. 研究結果

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(Fig. 1)。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(Fig. 2)。

D. 考察

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いる(Venturi S et al., 1993)。また、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)。実験的には、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いる(Eskin B.A., 1977)。また、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(Strum J.M. et al.)。

今回の実験においては、乳幼児期における種々の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基礎実験の一つとして、低ヨード食を与えたラットの、発癌物質であるDHPN及びDMBAに対する感受性の変化を検索している。現在、DHPN及びDMBAによる発癌処置終了後20週目である。発癌処置より30週間経過後に剖検し、病理組織学的に腫瘍の発現状況を低ヨード及び対照群の間で比較検討する。

E. 結論

乳幼児期に低ヨード食を与えたラットの発がん物質に対する感受性の変化を検索する実験を開始し継続している。DHPN及びDMBAによる発癌処置より30週間経過後に剖検し、病理組織学的に腫瘍の発現状況を低ヨード及び対照群の間で比較検討する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Son HY, Nishikawa A, Okazaki K, Lee K, Imazawa T, Hirose M. Lack of modifying effects of atrazine and/or tamoxifen on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Food Chem Toxicol.* 2003;41(12):1811-6.
- 2) Son HY, Nishikawa A, Kanki K, Okazaki K, Kitamura Y, Lee KY, Umemura T, Hirose M. Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)- nitrosamine. *Cancer Sci.* 2003;94(4):334-7.
- 3) Son HY, Nishikawa A, Okazaki K, Kanki K, Yamagishi M, Imazawa T, Umemura T, Hirose M. Prolonged effects of β -estradiol 3-benzoate on thyroid tumorigenesis in gonadectomized rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Lett.* 2003;190(1):21-9.
- 4) Takagi H, Mitsumori K, Onodera H, Nasu M, Tamura T, Yasuhara K, Takegawa K, Hirose M. Improvement of a two-stage carcinogenesis model to detect modifying effects of endocrine disrupting chemicals on thyroid carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 2002;178(1):1-9.
- 5) Takagi H, Mitsumori K, Onodera H, Nasu M, Tamura T, Yasuhara K, Takegawa K, Hirose M. Modifying Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on N-bis (2-hydroxypropyl) Nitrosamine and Sulfadimethoxine-Induced Thyroid Carcinogenesis in Rats. *J Toxicol*

Pathol. 2001;14(2):121-8.

- 6) Ikeda T, Nishikawa A, Son HY, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92(4):390-5.
- 7) Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M, Mitsumori K. Environmental Agents, Endocrine Disrupting Chemicals and Rat Thyroid Carcinogenesis. *J Toxicol Pathol.* 2001;14(1):71-7.
- 8) Son HY, Nishikawa A, Ikeda T, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92(2):103-8.

2. 学会発表

- 1) Son HY, 今井俊夫, 蓮村麻衣, 小野瀬淳一, 上田 誠, 広瀬雅雄. Ethinyl estradiol の乳幼児期投与によるラット甲状腺および乳腺発癌修飾作用. 第62回日本癌学会総会(2002).

H. 知的所有権の出願, 登録状況

なし。

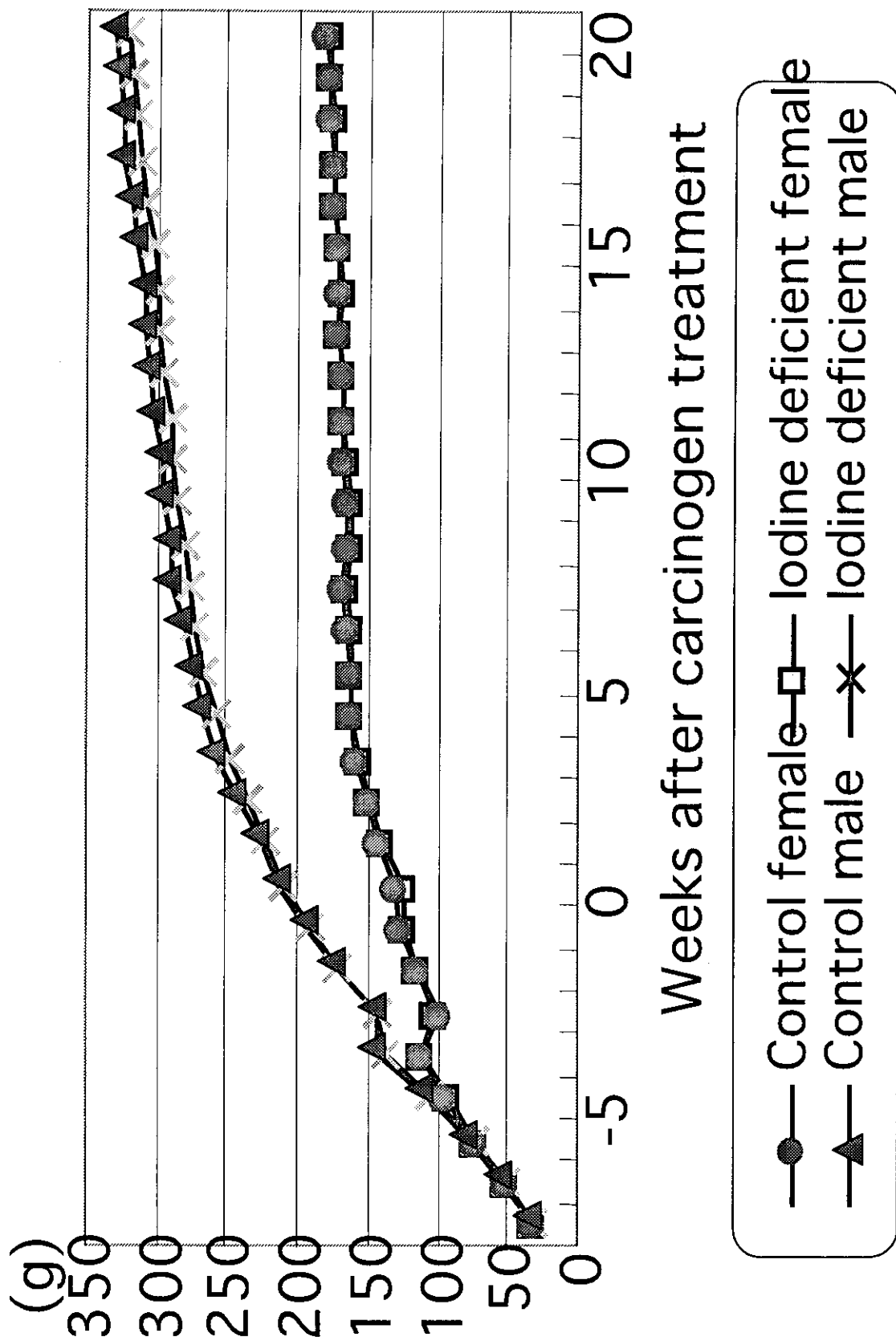


Fig.1

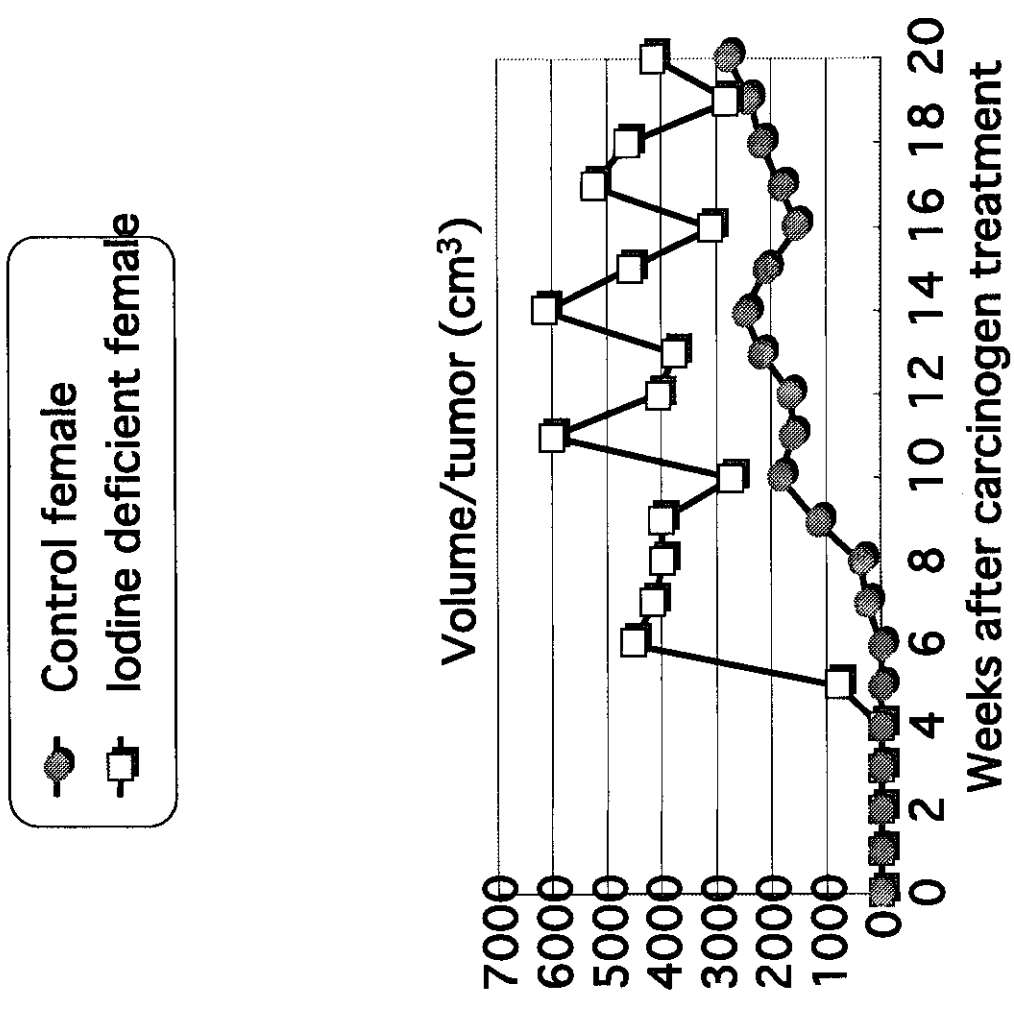
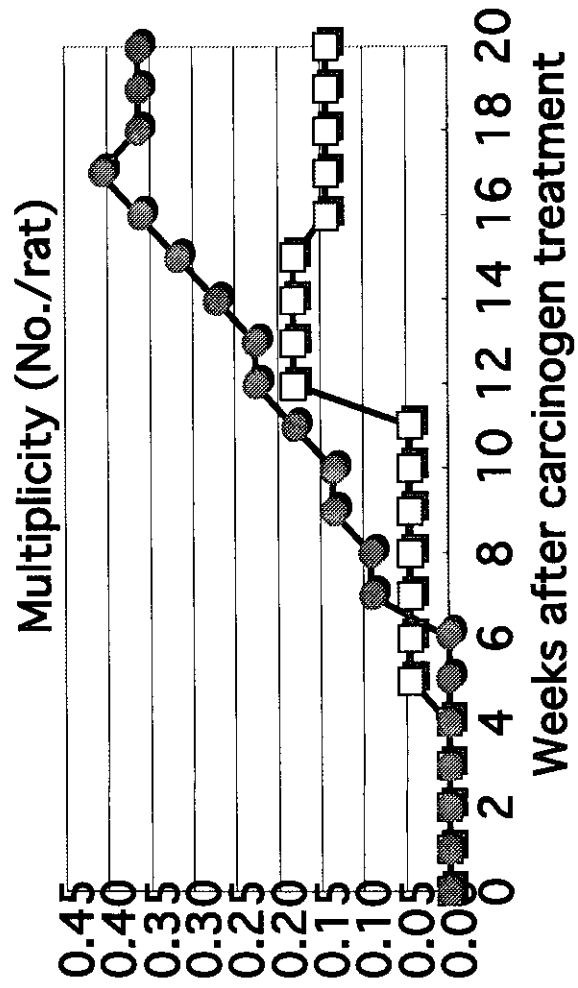
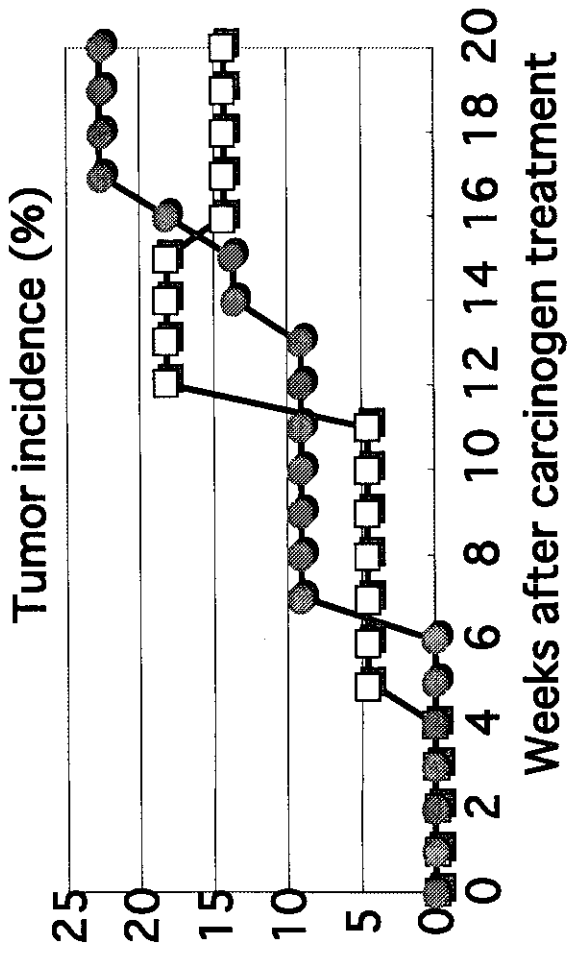


Fig. 2

2 1. 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

分担研究者 長村 義之

東海大学 医学部 基盤診療学系 病理診断学 副医学部長、教授

研究要旨 内分泌かく乱化学物質の乳腺に対する影響を把握し、腫瘍発現における作用機序を確認するため、我々はエストロゲン (E) を陽性対照物質としてラット正常乳腺に対する影響および 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) 投与によるラット乳腺発がんモデルの誘発腫瘍について検索してきた。本年は DMBA 誘発モデルで卵巣摘出後の E 用量の差が腫瘍発現に及ぼす影響について検討した。その結果 E はいずれの用量においても偽処置群に対して促進効果は見られず、むしろ高用量では抑制的に作用した。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の多くはエストロゲン作用を有することが広く知られている。我々はエストロゲンの乳腺腫瘍への発育増進に対する関与を精査する目的で、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) ラット乳腺発がんモデルに各種用量のエストロゲン処置を施し腫瘍発生への影響について検討した。また、この検索を通し内分泌かく乱物質の腫瘍化のメカニズムについても考察した。

B. 研究方法

代表的な乳腺発がんの実験モデルである DMBA ラット乳腺発がんモデルを用いて、エストラジオール(E2) 処置が用量の差により腫瘍発生に及ぼす影響について検索した。

7 週齢の雌性 SD 系ラットに DMBA 100 mg/kg を 1 回経口投与し、2 週間後に卵巣摘出術(OVX)を実施し使用した。2 週間後に E2 を 0、10、30、1000 μ g/kg/週の用量で 30 週間反復筋肉内投与した(順に 2~5 群)。対照として DMBA 投与後、偽処置(Sham) を実施した動物を用いた(1 群)。投与

後、乳腺腫瘍の発生率、発現期間、腫瘍個数および重量、病理組織学的検査を行った。また、免疫組織化学法、RT-PCR 法および Western blotting 法を用いて、エストロゲンレセプター(ER α 、ER β) および細胞増殖調節蛋白 Ki-67 の発現を解析した。

C. 研究結果

Table 1 に示すように 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(Table 2)。

D. 考察

我々は既知の試験系として確立されているDMBA誘発ラット乳腺腫瘍モデルを用いて、エストロゲンが乳腺発がんおよび影響が評価可能であるのかを検証した。

今回はエストロゲンの効果をより詳細に捉えるためDMBA処置後に卵巣摘出を施した後、30週間のE2反復投与を実施し、E2の各用量による誘発腫瘍の発生状況、組織形態像、ERの発現、細胞増殖への影響について精査した。

1. 腫瘍の発現状況およびE2投与用量による誘発腫瘍の形態について

本実験からは、いずれの用量においても、内因性エストロゲンを有するSham(1)群と比較し、腫瘍発生を促進する結果は得られなかった。特に最高用量(5群)では腫瘍発生は抑制され、E2投与用量に対する逆相関が認められた。また、病理組織学的検査では5群のみで形態的な差異が認められた。

2. ERの発現

免疫組織化学染色では、ER α は無処置正常乳腺組織(NT)に対し、各群の腫瘍組織で減弱し、特に5群で明らかであった。ER β は弱陽性を示す部位が5群で他群より広範に見られた。RT-PCRおよびWestern blottingでも同様に5群において、ER α の発現が弱まり、ER β はやや増強する傾向が見られた。このようにER発現は1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という高用量曝露にお

いて差が認められ、ER α の減弱とER β の増強という相補的な関連が示唆された。

3. 細胞増殖活性

Ki-67抗原は、比較的小型の腫瘍が主体である5群においては高い増殖活性を示していた。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。このことから腫瘍の細胞増殖活性を評価する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。

4. 今後の展望

DMBA誘発ラット乳腺腫瘍モデルでは、DMBAによる遺伝子変異とエストロゲンによる乳腺増殖刺激が腫瘍発現に関与していると考えられている。今回の検索では明らかな高用量として設定した5群のみに質的な差が見出された。しかし、それ以下の用量群では、Sham群と比較し明らかな差を見出すことは出来なかった。今後は、エストロゲンによる細胞増殖の調節機構に加え、エストロゲン単独でもたらされる遺伝子変異の発現にも着目し、微細な影響についても検出可能なマーカーの確立を目指す(注:エストロゲンは一般的にはプロモーターと考えられているが、その生体内代謝産物がDNA adductsを生じることから、イニシエーター活性を有する可能性を示唆する報告がなされている)。それにより低用量のエストロゲンやビスフェノールAなどの内分泌かく乱物質の乳腺に対する影響を明らかにしていく。また、現在、ヒト乳腺腫瘍の診断において有用なマーカーであるErbB-2 (HER-2)のラット乳腺における発現や、DNAのメチル化を指標

とした検討を進行中である。

E. 結論

内分泌かく乱物質の乳腺発がんに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 μ g/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 μ g/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 μ g/kg群のみでER α の減弱とER β の増強という相補的な関連が示唆された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

論文発表

1. S Umemura, H Itoh, M Ohta, Y Suzuki, M Kubota, Y Tokuda, T Tajima, RY Osamura : Immunohistochemical Evaluation of Hormone Receptor for Routine Practice of Breast Cancer: Highly Sensitive Procedures Significantly Contribute to the Correlation with Biochemical Assays, AIMM 11(1), 62-72, 2003

2. Y Sekido, S Umemura, S Takekoshi,

Y Suzuki, Y Tokuda, T Tajima, RY Osamura: Heterogeneous gene alterations in primary breast cancer contribute to discordance between primary and asynchronous metastatic/recurrent sites: HER2 gene amplification and p53 mutation, International Journal of Oncology 22, 1225-1232, 2003

3. S Umemura, Y Sekido, H Itoh, RY Osamura: Pathological Evaluation of HER2 Overexpression: For the Treatment of Metastatic Breast Cancers by Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody (Trastuzumab), Acta Histochem. Cytochem. 35(2), 77-81, 2002

4. S Umemura, T Iwasaka, RY Osamura : Expression of chromogranin / secretogranin mRNA in spontaneous mammary tumors in aging Fischer-344 rats, Pathology International 51, 667-670, 2001

5. S Umemura, T Iwasaka, K Kakimoto, A Takahashi, H Koizumi, Y Miyakawa, R Kurotani, RY Osamura: Expression of Prolactin Gene in Spontaneous Mammary Tumors in Aging Fischer 344 Rats, Endocrine Journal 48(5), 597-602, 2001

6. S Umemura, G Sakaamoto, H Sasano, H Tsuda, F Akiyama, M Kurosumi, Y Tokuda, T Watanabe, M Toi, T Hasegawa, RY Osamura: Evaluation of HER2 Status: For the Treatment of Metastatic Breast Cancers by Humanized Anti-HER2 Monoclonal

Antibody(Trastuzumab) (Pathological Committee for Optimal Use of Trastuzumab), Breast Cancer 8, 316-320, 2001

学会発表

環境ホルモン学会、第6回研究発表会、2003年12月2-3日(仙台国際センター：宮城県仙台市) 卵巣摘出およびエストロゲンの用量がDMBA誘発乳腺腫瘍に及ぼす影響
美谷島 克宏、柿本 恒知、竹腰 進、長村 義之

92nd USCAP(United States and Canadian Academy of Pathology), 2003年3月22-28日(Marriott Wardman Park Hotel, Washington

DC) Application of microarray for analysis of tumor characteristics: usefulness and limitation S Umemura, Y Sekido, N Kumaki, H Itoh, Y Tokuda, T Tajima, M Shirane K Mori, RY Osamura

内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム、2003年6月13-14日(湘南国際村センター：神奈川県葉山町) 内分泌攪乱化学物質と乳癌、長村 義之、梅村しのぶ、竹腰進、美谷島克宏、柿本恒知

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

参考データ:

Table 1. 腫瘍の発現状況および形態像

*群	発現頻度	発現時期	腫瘍個数	腫瘍重量	**病理組織 形態像
	% (N=12)	(週)	(1個体中)	(g)	
1. DMBA + Sham + Vehicle	83.3	7.0	4.7	17.5	DAC
2. DMBA + OVX + Vehicle	0.0	-	0.0	-	-
3. DMBA + OVX + E2 10μg/kg	66.7	7.5	6.3	15.8	DAC
4. DMBA + OVX + E2 30μg/kg	66.7	10.4	3.8	15.3	DAC
5. DMBA + OVX + E2 1000μg/kg	50.0	17.7	2.0	6.3	IDPC

*: OVX, ovariectomy; E2, estradiol.

** : DAC, Ductal adenoma/carcinoma; IDPC, intraductal papilloma/carcinoma.

Table 2. 腫瘍中のエストロゲンレセプター(ER) および Ki-67 の発現

群	免疫組織化学(染色性)			RT-PCR (*NTとの比較)		Western blotting (NTとの比較)	
	ERα	ERβ	Ki-67	ERα	ERβ	ERα	ERβ
1. DMBA + Sham + Vehicle	-~+	-~+/-	+~++	↑	→	→	→
2. DMBA + OVX + Vehicle	(Atrophic duct: +)	(Atrophic duct: +)	(Atrophic duct: -)	(↑)	(→)	(→)	(→)
3. DMBA + OVX + E2 10μg/kg	-~+	-~+/-	+~++	↑	→	→	→
4. DMBA + OVX + E2 30μg/kg	-~+	-~+/-	+~++	↑	→	→	→
5. DMBA + OVX + E2 1000μg/kg	-~+/-	-~+	+~++	→	↑	↓	↑

*NT: No treatment animal

2.2. 内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期曝露が 雌性生殖器に与える影響に関する研究

吉田 緑 財団法人 佐々木研究所病理部 研究員

研究要旨 前年度までの研究結果より、内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期大量曝露の雌性生殖器影響には性成熟前より出現する影響だけではなく、性成熟後に遅延型の影響が発現することから、その検出のために性成熟前だけでなく長期間の観察の必要性が明らかになった。この大量曝露で得られた検出指標を用いてヒト曝露相当量を含む低用量から高用量の nonylphenol (NP) のラット経胎盤・授乳曝露による雌性生殖器の発育・分化の影響を長期間に亘り検索した結果、これらの化合物はいずれも雌性生殖器に影響を与えないと考えられた。

A. 研究目的

前年度までの研究によってエストロゲン様内分泌かく乱化学物質のラット新生児期大量曝露は、視床下部・下垂体・性腺制御系を速やかに障害し性成熟前より雌性生殖器の発育・分化に対して重篤且つ不可逆的な障害を与えるが、投与期間の短縮すると性成熟前には明らかな異常を示さず性成熟後に生殖器系に異常が発現する遅延型の影響が認められ、いずれの曝露においても子宮発癌修飾作用が認められた。これらの大量曝露によって得られた観察項目を用いて bisphenol A (BPA) のラット経胎盤・授乳曝露による雌性生殖器への影響を検討した結果、投与による影響は認められなかった。

本年度はさらにヒト曝露量に近い低用量から高用量までの影響を確認する目的で、BPA と同様エストロゲン様作用を示す内分泌かく乱化学物質である nonylphenol (NP) を用いて胎生期・授乳期曝露による雌性生殖器への影響を BPA と同様の方法で検討した。

また、昨年度実施した卵巣への影響検索で実施した卵巣の形態学的検査結果を分子生物学的解析により補足する目的で、卵胞における増殖に関連する遺伝子の発現について追加検索した。

B. 研究方法

動物には約 4 ヶ月齢までは規則正しい性周期を示すものの、早期からのホルモンバランスの異常によりヒト子宮体部癌類似の子宮内膜腺癌が好発する Crj:Donryu ラットを用いた。

1. ヒト曝露相当量を含む低用量の内分泌かく乱化学物質曝露が雌性生殖器に及ぼす影響

前年度に実施した BPA と同様の方法で NP の胎生期・授乳期曝露がラット雌性生殖器に与える影響について検索した。NP の投与量として明らかなエストロゲン作用を示す量、多世代繁殖試験における無影響量、ヒトの一日摂取量の近似値であることから、100、10、0.1mg/kg を選択した。

NP とともに妊娠 2 日目から離乳前日まで母ラットに強制経口投与した。児ラットの雌性生殖器への影響の検出するために、OP の新生児期大量曝露実験で観察された各項目を指標として、性成熟までの発育・分化、性腺刺激ホルモンの測定 (FSH および卵巣からのインビボンについて) および長期に亘る性周期について検索した。ENNG 誘発子宮発癌への修飾作用についても 15 ヶ月齢まで観察し、子宮の

増殖性病変について形態学的に検索した。

また、母動物から児への移行は検索するために、母ラットの血清、母乳および児ラットの血清および肝臓中の NP 濃度を測定した。

2. 新生児期大量曝露を受けた卵巣における細胞増殖関連の遺伝子変化について

材料は前年度の実験で得られた卵巣を用いた。実験概略として生後 1 日齢より新生児雌ラットに p-tert-octylphenol (OP) 100mg/kg を 5 日齢 (PNDs1-5 群) または 15 日齢 (PNDs1-15 群) まで隔日皮下投与した。15 日齢投与は性成熟前から生殖器系に異常を示し、5 日齢は性成熟後に遅延型の影響を示す投与期間である。

前年度は 14 週齢にて正常性周期(発情期の午前中)および持続発情を示した動物の卵胞数・黄体数など卵巣の形態について検索したが、これらの卵巣についてさらに laser micro dissection 法により発育卵胞および閉鎖卵胞を構成する顆粒膜細胞を集めた。卵巣ごとに集積した RNA を用いて GAPDH の発現を確認後、細胞増殖に関連する Bcl-2、insulin growth factor receptor および cyclin D2 について RT-PCR 法により発現の有無を検索した。

本実験は「動物の保護及び管理に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」の主旨およびおおよび WHO(World Health Organization:世界保健機構)の医学研究顧問委員会の勧告に基づき CIOMS(The Council for International Organization of Medical Sciences:国際医科学関係組織協議会)が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に沿って実施した。

C. 研究結果

1. ヒト曝露相当量の低用量新生児期曝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 (Fig. 2)、腔開口時期などのいずれの項目にも異常は認められず (Table 1)、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 (Table 2)。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 (Table 3)。

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 (Table 4)。

2. 新生児期曝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 (Fig. 3)。

D. 考察

1. ヒト曝露相当量を含む低用量曝露が雌性生殖器に及ぼす影響

低用量から高用量の NP の胎生期・授乳期曝露の結果、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。したがって、ヒト曝露量の近似値を含む NP の曝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 はヒト曝露量と比較して高い用量において乳汁経由で新生児に曝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。

2. 新生児期曝露が卵巣に及ぼす影響

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曝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

ヒト曝露量近似値を含む NP を経胎盤・経授乳曝露したところ、ラットの雌性生殖器の発育・分化、性周期および子宮発癌などの大量曝露により影響が観察されたいずれの項目についても、異常は認められなかった。したがってこれらの用量の NP の胎生期・新生児期曝露はラットの雌性生殖器へ影響を及ぼさないと結論した。母動物から児への移行については NP の高用量曝露では乳汁を介して児が曝露されている可能性が考えられた。

また OP 投与により卵胞の異常が観察されなかったことから、OP 新生児期曝露は卵巣へ直接的作用を与えないと結論した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

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

2. Yoshida, M., Katsuda, S., Tanimoto T., Asai, A., Nakae, D. and Maekawa, A. Differential Enhancement by neonatal

exposure to p-tert-octylphenol of uterine carcinogenesis in Donryu rats depending on the administration period. *Toxicologic Pathology*, 31 (supplement): 141, 2003

3. Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A. Lack of effect for maternal exposure to low-doses of bisphenol A on development of the female reproductive tract and uterine carcinogenesis in rats. *Journal of Reproduction and Development*. 2004. In press.

4. Yoshida, M., Katsuda, S., Taminoto, T., Asai, S., Nakae, D., Kurokawa, Y., Taya, K., and Maekawa, A. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octylphenol for different periods. *Carcinogenesis*, 23, 1745-1750. 2002.

5. Yoshida, M., Kitani, T., Takenaka, A., Kudoh, K., Katsuda, S., Taya, K., Kurokawa, Y., and Maekawa, A. Lack of effects of oxolinic acid on spermatogenesis in young adult and aged Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 20, 1815-1825. 2002.

6. Jin, W., Herath, C.B., Yoshida, M., Arai, K.Y., Saita, E., Zhanquan, S., Ren L., Watanabe, G., Groome, N.P., and Taya, K. Inhibin B regulating follicle-stimulating hormone secretion during testicular recrudescence in the male golden hamster. *Journal of Andrology*, 23, 845-853. .2002.

7. Yoshida, M., Takenaka, A., Katsuda, S., Kurokawa, Y., and Maekawa, A. Neonatal exposure to *p*-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptor- α and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing Donryu rat uterus. *Toxicologic Pathology*, 30, 357-364. 2002.

8. Shimomoto, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Maekawa, A. Sebaceous gland metaplasia in a mammary fibroadenoma developing in a female Donryu rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 15, 73-77. 2002.

9. Katsuda, S., Yoshida, M., Kuroda, H., Takahashi, M., Kurokawa, Y., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A. Uterine adenocarcinoma in *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine -treated rats with high-dose exposure to *p*-tert octylphenol during adulthood. *Japanese Journal of Cancer Research*. 93, 117-124. 2002.

10. Yoshida, M., Katsuda, S., Takenaka, A., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A. Effects of neonatal exposure to a high-dose *p*-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicology Letters*, 121, 21-33. 2001.

11. Yoshida, M., Katsuda, S. and Maekawa, A. Effects of endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity on the female reproductive system in rats. *Journal of Toxicologic*

Pathology, 14, 83-86. 2001.

12. Herath, C. B., Watanabe, G., Katsuda, S., Yoshida, M., Suzuki, A. and Taya, K. Exposure of neonatal female rats to *p*-tert-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion and interferes with sexual receptive behavior in adulthood. *Biology of Reproduction*, 64, 1216-1224. 2001.

2. 学会発表

吉田緑、渡辺元、田谷一善、前川昭彦、中江大、新生仔期 *p*-ter-octylphenol 大量曝露が雌ラットの下垂体に与える経時的な影響。内分泌攪乱化学物質学会第 6 回研究発表会(仙台、2003)

Yoshida M., Ando, J., Uematsu, F., Takahashi, M., Watanabe, N., Igarashi, M, Maekawa, A. and Nakae, D. Promotive effects of dietary treatment of high dose indole-3-carbinol on endometrial carcinogenesis initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in female Donryu rats. The 3rd International Conference of Food Factors(Tokyo, 2003)

吉田緑、片嶋紗弓、前川昭彦、中江大。オクチルフェノールのラットへ新生仔期曝露が卵巣に与えるの影響。第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会(神奈川、2003)

片嶋紗弓、吉田 緑、前川昭彦、鎌田壽彦、渡辺 元、田谷一善、中江 大。内分泌攪乱化学物質オクチルフェノールのラットへの新生仔期曝露による卵巣への

影響。第 19 回日本毒性病理学会要旨集
(東京、2003)

下元貴澄、高橋正一、吉田 緑、植松史
行、前川昭彦、中江 大。Bisphenol
A(BPA)の妊娠期・授乳期曝露が仔マウス
子宮に与える影響について。第 19 回日

本毒性病理学会要旨集(東京、2003)

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

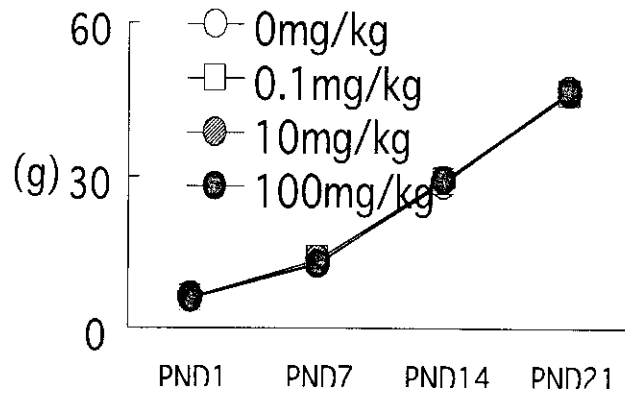


Fig.1 Body weights of females up to weaning

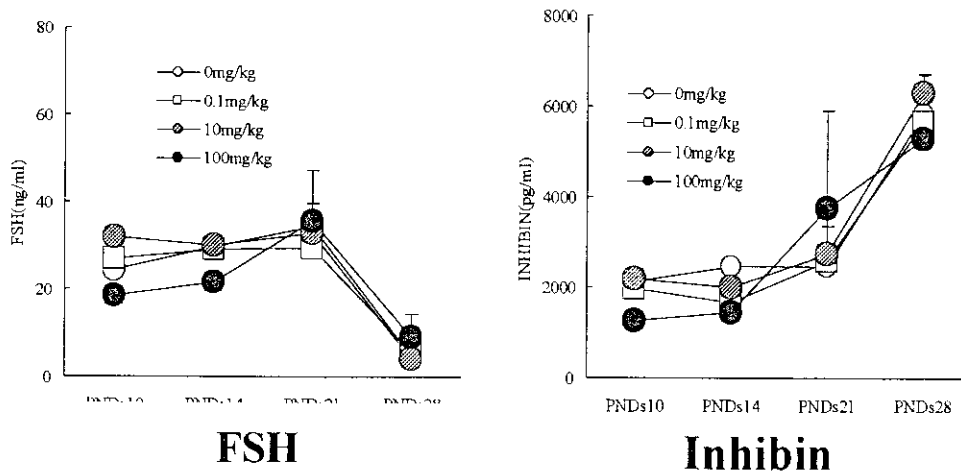


Fig.2 Hormonal profiles up to puberty

Table 1. Growth and development of the female reproductive organs in offspring

Time of examined	Group			
	0mg/kg	0.1mg/kg	10mg/kg	100mg/kg
<i>Number of rats examined</i>				
PNDs10	4	3	4	2
PNDs14	4	3	4	3
PNDs21	4	4	4	4
PNDs28	4	4	4	4
17wks*	4	4	4	4
<i>Uterine weights(mg)</i>				
PNDs14	26.8±6.0	28.3±5.0	32.3±4.3	21.0±1.0
PNDs21	42.3±5.6	41.0±7.2	38.3±7.7	46.3±3.8
PNDs28	141.6±34.2	187.3±137.4	242.3±145.2	290.8±134.6
17wks	712.3±117.7	653.3±76.8	653.3±76.8	720.8±113.1
<i>Uterine gland-genesis (Number of gland per cross section)</i>				
PNDs10	0	0	0	0
PNDs14	4.07±1.49	4.27±1.74	4.29±1.59	3.00±0.87
PNDs21	4.57±1.60	4.76±1.15	5.31±1.49	4.78±2.46
PNDs28	6.00±2.62	5.92±1.26	5.73±2.34	5.07±1.77
<i>The time of vaginal opening(days)</i>				
	29.6±1.8	30.1±1.3	29.8±1.1	29.0±1.4
Number of rats examined	34	34	34	34
<i>Ovulation (Number of ova in the oviduct in the morning of estrus at 17wks of age)</i>				
	11.3±1.5	11.3±1.5	11.5±1.0	12.3±0.6

*, Examined in the morning at estrus stage

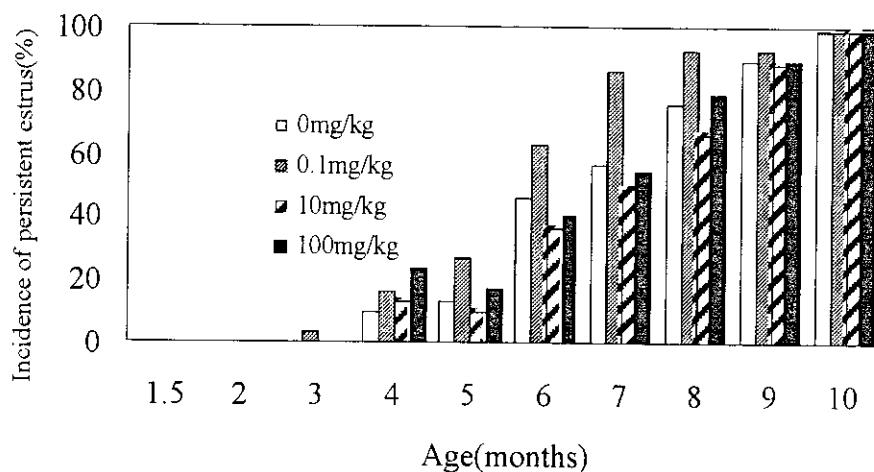


Fig.3 Sequential changes of incidence of persistent estrus by vaginal cytology

Table 2. Incidence of Uterine Proliferative Lesions

Group	No. of rats examined	No of rats without lesions	Hyperplasia			Adenocarcinoma
			Slight	Moderate	Severe	
0mg/kg	24	3(13)*	3(13)	8(33)	4(17)	6(25)
0.1mg/kg	24	2(8)	3(13)	9(38)	1(4)	9(38)
10mg/kg	23	1(4)	1(4)	10(43)	3(13)	8(35)
100mg/kg	22	1(5)	2(9)	5(23)	4(18)	10(45)

*(), Percentage