

200401248A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験
評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究

(H16-化学-一般-001)

平成16年度 (2004)

総括・分担研究報告書

<平成21年12月訂正版>

主任研究者 小野 宏

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

平成17 (2005) 年3月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験
評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究
(H16-化学-一般-001)

平成16年度 総括・分担研究報告書
＜平成21年12月訂正版＞

主任研究者 小野 宏

平成17 (2005) 年3月

目次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究	1
小野 宏	

II. 分担研究報告書

1. 総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション関連総括	27
Bisphenol A を用いた Cj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究)	
菅野 純	
【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】	
〈OECD Conceptual Frame Work Level 5 対応試験開発〉	
1) 神経・行動	
2. Bisphenol A をモデルとした妊娠期及び授乳期暴露による行動影響の評価とその機序解明	323
鈴木 勉	
3. マウスのオペラント条件付けを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価	325
宮川 宗之	
4. 内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究	347
今井 清	
2) 免疫	
5. 内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究	353
林 良夫	
6. Local lymphnode assay を指標とした内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価	361
武吉 正博	
3) 生殖器	
7. 内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響	367
長尾 哲二	
8. 内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生児期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究	375
吉田 緑	
9. 内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響	387
太田 亮	
〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉	
10. 確定試験に関わる発がん性検討：乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討	391
長村 義之	
11. 確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究	397
西川 淳一	
12. 確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の為の ES 細胞分化増殖影響解析研究	403
高木 篤也	
13. 確定試験に関わる生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析	405
松島 裕子	
14. 確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析	409

高木 篤也

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 3~4 対応試験開発〉

15. Pubertal assay の改良としての外来性エストロゲン刺激による卵巣機能等の修飾の高感度検出試験系開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 413
松島 裕子
16. 前立腺等雄性生殖系系におけるアンドロゲン系影響のエストロゲン等複合シグナルによる修飾の研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 417
吉村 慎介

【OECD 対応試験実施・調査研究】

17. 子宮肥大およびHershberger に関する試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 421
小野 宏
18. OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 431
井上 達
19. 反復投与毒性試験系 (TG407 を含む) への適用に関する調査研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 449
広瀬 明彦
20. 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・・・・・・ 453
永井 賢司
21. 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・・・・ 459
山崎 寛治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 477

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 487

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究

主任研究者 小野 宏 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 常務理事、研究顧問

研究要旨

内分泌かく乱化学物質(EDCs)の生体影響の研究は、これまでの第1期3年間の研究によって、種々のスクリーニング試験法の開発を基本的に終了し、第2期3年間により確度の高い、各国間協調の可能な「少数の個体レベルスクリーニング系の確立」を進めた。これらの研究成果は、厚生労働省「EDCs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(確定試験)」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。

本研究班では、第一に、【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】として、3年間で実用的な「確定試験」を構築することを目指した研究を強力に推し進める。スクリーニングに於いてみいだされた化学物質について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきたため、本申請班の前身となる第2期研究班において種々の調査研究を実施してきた。その結果、ここでは既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の受精、発生、発達、成熟、及び老化に亘る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指した。これは、経済協力開発機構(OECD)のConceptual Frame Work Level 5に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究、及び支援基盤研究の2要素から成る。即ち、確定試験開発研究の推進には、1) 神経・行動への有害影響の検討として、Bisphenol A(BPA)等をモデル物質として妊娠期・授乳期に暴露しドーパミン神経系に及ぼす影響をみること、経母体暴露し認知機能(学習・記憶・行動制御)に及ぼす影響をみること、妊娠期・新生児期に暴露しエストロゲン感受性の神経核、殊に青斑核の発達・分化過程をみること、を検討する。2) 免疫系への有害影響の検討として、シェーグレン症候群疾患モデルNFS/sldマウスの新生児にEDCsを暴露した際の自己免疫発症への影響を解析すること、既存のlocal lymph node assayを修飾し、胎生期・新生児期におけるEDCs暴露の影響を解析することにより、免疫反応や免疫異常状態に及ぼす影響を検討する。3) 生殖器系の発達・老化への影響の検討として、EDCsを周生期に低用量暴露し雄性生殖器の生殖・発生毒性学的変化を鋭敏に且つ早期に捉える試験系を開発すること、EDCsの周生期暴露による雌性生殖器の遅発性障害の発生機序を解明するため、低用量のDiethylstilbestrol(DES)をSDラット妊娠期あるいは新生児期に投与し、生涯に亘り雌雄の性成熟、性周期、産児数、次世代の生殖能力、性ホルモン量等の指標を観察する実験を実施する。

支援研究には、エストロゲン発がんの標的としての乳腺上皮を対象とした発がん性検討に関わる基礎研究、全ての核内受容体に対するEDCsの影響をスクリーニングするためのハイスループット型アッセイの開発を進め、確定試験の評価に対する判断材料を提供する基礎的研究、及び確定試験に於いて胎生期の初期暴露による影響が想定された場合のメカニズム情報の提供支援体制として、EDCsの解析の難しい発生初期に於ける影響を胚性幹細胞(ES細胞)を用いて、多分化能に対する影響解析を行った。これらに加えて、高精度遺伝子発現解析技術開発が完了した事を受けて、化学物質による生殖器の発達影響の複雑な作用点を明確にすること、あるいは、一般的に他臓器に比べ

て形態学的変化の観察が困難な神経系について、神経行動学的結果の分子生物学的裏付けを試みる研究が含まれ、これらにより確定試験の評価の精度、客観性の向上、及び評価プロセスの迅速化に貢献する。

本研究では、更に、【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】として、OECD 試験ガイドライン化を視野に入れた *in vivo* 内分泌かく乱性試験法の開発及び内分泌かく乱性の科学的評価やメカニズム研究への応用をも目指した（これは、OECD の Conceptual Frame Work Level 3~4 に対応する試験開発から成る）。さらに OECD などでも新たに取り上げる機運にある前立腺の性ホルモン反応性に関わる新しい問題の検討等を支援的に進めた。

また、これらと並行して、【OECD 対応試験実施・調査研究】として、国際的協調の継続として、OECD に代表される国際テストガイドラインに関わる調査研究を実施する。その概要は、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、反復投与毒性試験 (TG407 を含む) を実用段階とする上で最終的に残されている問題点の解決を図った。

本研究は、以上の如き試験系の開発の第3期研究を推進するものであり、「確定試験」として一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於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、多世代繁殖試験の指標に限定されない）を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行うと共に、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試験法 (*in vivo*) の開発、バリデーション、OECD で取り上げられている新たな内分泌かく乱性試験法の我が国としての評価を進展させ、内分泌かく乱性の試験評価に関する包括的なガイドラインの開発に的確に貢献するものである。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における
職名

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 部長

鈴木 勉・星薬科大学 薬品毒性学教室 教授

宮川 宗之・独立行政法人 労働安全衛生総合研究
所 産業医学総合研究所 企画調整部 研究企画
官

今井 清・財団法人 食品農医薬品安全性評価セン
ター 技術総括部 技術総括部長

林 良夫・徳島大大学院 ヘルスバイオサイエンス
研究部 口腔分子動態学分野 教授

武吉 正博・財団法人 化学物質評価研究機構 日
田事業所 試験第四課 課長

長尾 哲二・近畿大学 理工学部 生命科学科 発
生生物学研究室 教授

吉田 緑・財団法人 佐々木研究所病理部 主任研
究員

太田 亮・財団法人 食品薬品安全センター秦野研
究所 毒性部 毒性学研究室 研究員

長村 義之・東海大学医学総合診療学系病理診断学
部門 副医学部長、教授

西川 淳一・大阪大学大学院 薬学研究科 生命情
報環境科学専攻 微生物動態学分野 助教授

高木 篤也・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 室長

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

吉村 慎介・財団法人 食品薬品安全センター秦野
研究所 毒性部 毒性学研究室 室長

井上 達・国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物
試験研究センター センター長

広瀬 明彦・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 総合評価研究室 主任研究
官

永井 賢司・株式会社 三菱化学安全科学研究所

鹿島研究所 部長

山崎 寛治・財団法人 化学物質評価研究機構 日
田事業所 所長

A. 研究目的

本研究の目的は、ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する EDCs のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い方法体系を開発することにある。

ここ数年で、各国で急速に開発の機運が高まった試験法の樹立により、内分泌作用を持つ化学物質の試験管内あるいは個体レベルでのさまざまな試験法が開発された。その結果、ホルモン様作用を基礎とした *in vitro* スクリーニング試験法の開発はエストロゲン受容体系についてはほぼ終了したものの、内分泌かく乱性の如何が明らかにされないまま多くの化学物質が店晒し状態になり、社会的危惧に対し未解決の状態となっている。即ち、本研究の問題点は、内分泌影響を引き起こす化学物質と、内分泌かく乱を引き起こす化学物質の分界点となる方法論が十分に開発されないまま現状に至っている点にあり、EPA 及び OECD 各国機関が緊急の必要性に迫られていることは、現在それらを峻別する確定試験の樹立の可能性を探ることである。国内的にも、科学技術振興調整費（生活者ニーズ対応研究等）が環境影響を中心に、また新エネルギー開発機構（NEDO）等が発生源物質に焦点を当てて研究を進めてきた。しかし、それらの研究の中でヒトを念頭においた生物影響、特にそのヒトへの外挿可能な確定試験の開発研究は乏しく、焦眉の課題として本研究班はスタートした。過去の研究の結果、厚生労働省「試験スキーム」の設定に貢献し、その構成要素となる試験法の開発研究を推し進めてきた。

本研究は、こうした問題を解決するために、緊急な必要性と解決が期待されるところの関連試験系の総合的な確立、即ち「試験スキーム」の諸要素の確立にある。そのために、*in vivo* スクリーニング系である子宮肥大試験、Hershberger 試験の個体レベル実験系の各国間で協調可能な試験法として、殊に国際バリデーションに関わる残された諸問題の解決を引き続き目指し、早期ガイドライン化を視野に入れた内分泌かく乱性試験法 (*in*

vivo) の開発に的確に貢献するものである。一方、確定試験については、従来の毒性評価法に則ったこれまでの 1 世代、経世代生殖毒性試験を中心とする大規模なバイオアッセイでは、多くの陽性候補物質が陰性の結果に終始することが予測されるとの立場に立って、しかも、これらの従来からの試験法では、提起されてきている低用量問題への対応が実質的に困難であるとの判断に立って検討を重ねてきた。即ち、従来の 1 世代、多世代生殖毒性試験を視野に入れつつ、胎生期、新生児期、思春期暴露の成長後の、不可逆的影響を神経/行動・免疫・内分泌・発がんを対象とした「齧歯類一生涯（発生、発達、成熟、老化）試験法」の開発、並びに可能な限りの経世代試験の改良、あるいは必要に応じた新概念の導入を推進すること、併せて確定試験の開発に必要な残されている基盤研究を推進することが必要となっている。また、急速に有効性の明らかになりつつある遺伝子発現解析技術の技術開発の完成に伴い、試験スキームの精度向上と時間短縮に向けてのその技法の導入、並びにグローバルに推進する OECD のバリデーション試験についても、当研究を通じて問題解決を目指した対応研究を進めている。

これらを推進することにより、試験スキームの全貌が具体化することで、内分泌かく乱性の如何が明らかにされないままの化学物質の店晒し状態による社会的危惧に対する未解決状態の解消が現実的に可能になることが期待される。

B. 研究方法

内分泌かく乱性確定試験開発研究として、従来の多世代試験法の改良のみにとどまらず、一生涯を標的とした有害性評価試験系の構築にあたり、胎生期・新生児期の周産期に EDCs を暴露し、神経・行動、免疫、生殖器系への影響を検討する。支援基盤研究として、受容体応答機構、応答遺伝子群発現影響等を行う。国際的協調の継続として、OECD の国際的テストガイドラインの候補である子宮肥大試験、Hershberger 試験、反復投与毒性試験系を実用段階とする上で最終的に残されている問題点の解決を図る為、国内外の情報収集とデータ整理を行う。

各班員の研究方法を以下に記載する。

総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション

関連総括

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

(2) BPA を用いた Crj:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究)

菅野 純

EDCs 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、EDCs 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。ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する EDCs のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い方法体系を開発することに重点を置き、内分泌かく乱性確定試験開発詳細試験 (確定試験) としての「齧歯類一生涯試験法」を提案した。

ここでは既存の多世代試験法の改良のみに留まらず、一個体の受精、発生、発達、成熟、及び老化に渡る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指す。これは、経済協力開発機構 (OECD) の Conceptual Frame Work Level 5 に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究及び支援基盤研究の 2 要素から成る。

本分担研究者は齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を (1) 下記の如く調整する際の取り纏めを行うと共に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、(2) Bisphenol A (BPA) を雌性動物の周産期に低用量暴露した際の性ホルモン系に対する低用量影響に関する動物実験を実施した (委託研究: 委託先: 財団法人 化学物質評価研究機構)。

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

神経・行動

○BPA 妊娠期・授乳期暴露による行動影響の評価と機序

○マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価

○脳の性分化への影響

免疫

○免疫反応や免疫異常状態に及ぼす影響

内分泌 (生殖器発達・老化等)

○雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

○胎生期・新生児期暴露が雌性生殖器に与える影響

○生殖器系の老化に至る過程に対する影響

内分泌かく乱性確定試験開発・支援基礎研究

○確定試験に関わる発がん性検討: 乳腺上皮系

○確定試験に関わる核内受容体転写活性等迅速確認系構築

○多分化能修飾メカニズムとしての ES 細胞分化増殖影響解析

○生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点解析

○神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点

詳細試験 (確定試験)

○「齧歯類一生涯試験法」の開発の継続と完成

(2) BPA を用いた Crj:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究: 委託先: 財団法人 化学物質評価研究機構)

10 週齢の Crj:CD (SD) IGS ラット (日本チャールス・リバー株式会社) の雌雄を交配させ、妊娠ラットを各群 10 匹となるように振り分けた。BPA の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day (陽性対照群として ethynyl estradiol (EE) 0.05 mg/kg/day 群を設定) の用量を、妊娠 6 日から分娩後 20 日 (離乳前日) まで毎日強制経口投与した。

妊娠動物の全例を自然分娩させ、出生日 (0 日齢) に産児数、死産児数、出産生存児数、出産生存児性比、出産生存児外表 (口腔内を含む) の検査を行った。生後 4 日齢に生存する全出生児について肛門・生殖突起間距離 (Anogenital distance; AGD) を測定した。生存する雄離乳児全例について、35 日齢から陰茎亀頭型分類を実施した。生存する雌離乳児全例について、21 日齢から膈開口を観察した。

生後 4 日齢に同腹出生児数を 10 匹 (雌雄各々 5 匹) になるよう無作為抽出法を用いて個体数調整を行った。同腹出生児数が 10 匹に満たない場合には、調整を行わず、片性が 5 匹に満たない場合には合計の同腹新生児数が 10 匹となるように調整した。更に、同腹新生児のうち、雌雄各々番号の

若い動物から①性周期長期観察群(5匹中2匹)、②生殖能力検査群(5匹中2匹)、③10週齢解剖群(5匹中1匹)の順に振り分け、匹数が少ない場合の優先順位は①、②、③とした。

①性周期長期観察

児動物の雌について、3ヶ月齢以降7ヶ月齢まで膣スメアによる性周期観察を行った。膣スメアを14日間連続採取後、2週間休止のサイクルを7ヶ月齢まで繰り返し行い、発情前期、発情期、発情後期、休止期に区分した。

正常な性周期が認められた個体をnormal(N)、異常な性周期が認められた動物は、persistent diestrus(休止期が5~9日継続)、constant diestrus(休止期が10日以上継続)、persistent estrus(発情期が3~7日継続)、constant estrus(発情期が8日以上継続)及びirregular estrus(何れの分類にも当てはまらない不定期な性周期)に分類した。

②生殖能力検査

児動物の雌雄ラットは13週齢に達した時点で同用量群の雌雄ラットを1対1の割合で14日間を限度として交配させ、交尾所要日数、交尾数(率)、受精数(率)、受胎数(率)を観察した。

妊娠20日目にエーテル麻酔下で放血し、安楽致死させた後、帝王切開し、子宮は硫化アンモニウムに浸漬して着床痕数を算出した。更に、黄体数、着床数、胚・胎児死亡数(早期、後期吸収胚及び死亡胎児に分類)、生存胎児数、生存胎児性比、生存胎児体重、生存胎児胎盤重量及び生存胎児外表(口腔内を含む)を調べた。

③10週齢解剖

10週齢に達した動物を順次CO₂+O₂麻酔下で腹部大動脈より採血し、採取した血液から血清を分離した。その後、放血致死し安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。

外性器の形態計測学的検査として尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部距離、尿道開口部-膣開口部距離をデジタル式ノギスを用いて0.01mm単位で測定した。

【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 5 対応試験開発〉

1) 神経・行動

Bisphenol A をモデルとした妊娠期及び授乳期暴露による行動影響の評価とその機序解明

鈴木 勉

研究者らはこれまでに、BPAを妊娠期および授乳期に曝露したddY系マウスでは、依存性薬物に対する反応性が著しく亢進することを見出している。

BPAの胎児期および授乳期曝露による次世代の中枢神経系に及ぼす影響を検討し、依存性薬物に対する感受性亢進の分子機構を明らかにすることを試みた。更に、神経細胞の保護作用だけでなく、神経細胞に対して積極的な機能制御を行っているグリア細胞にも着目し、その変化を形態学的に解析することで、神経-グリア細胞間の相互作用に及ぼすBPA慢性曝露の影響についても合わせて検討する。

BPAあるいはE₂慢性暴露マウスを作成し、morphineに対する反応性を条件づけ場所嗜好性試験法及び自発運動測定法に従い検討した。さらに、初代培養アストロサイト及び神経/グリア共培養細胞にBPA及びE₂を処置し、その形態変化及び機能変化を検討した。なお、本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行なった。

マウスのオペラント条件付けを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機響の評価

宮川 宗之

個体発生初期におけるEDCs暴露が、神経系高次機能(認知機能=学習・記憶・注意)に及ぼす影響をマウスのスケジュール制御オペラント行動(SCOB: Schedule-Controlled Operant Behavior)を用いて検証・評価するためのプロトコール確立と、BPAの影響評価への適用を目的とし、実施した。学習習得、短期記憶の保持、状況に応じた行動の適切な制御に及ぼす化学物質の影響評価をラットを被験動物として行うことを前提に考案した「タイムアウト付交替型混合FR DROスケジュール」を使用する。本年度は、ラットのデータに基づき、マウス(C57BL/6J)でのSCOB測定条件を設定するための基礎的な検討を行うとともにFR10スケジュールまでの訓練を実施した。

内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関

する研究

今井 清

性ホルモン様物質を、胎児期あるいは新生児期に暴露すると、性分化に関わる神経核に作用し、性成熟に達した後に性機能に異常を来たすことが知られているが、その機序は十分に解明されていない。今回、新生児期における性機能に関与する神経発達の経過を明らかにする目的で、ドーパミン作動性神経の指標であるチロシンヒドロキシラーゼおよびエストロゲン受容体 α (ER α)の免疫組織化学染色を行った。

生後1、3、5、7、10日目のSDラット新生児雌雄各4匹の脳の連続切片を作製し、ドーパミン神経の指標としてチロシンヒドロキシラーゼを免疫組織学的手法(ABC法)により染色して、視床下部の主要神経核における陽性細胞数を計測した。さらに、エストロゲンとSDN-POAとの関係を明らかにするための第一段階として、中枢神経系におけるER α の免疫組織学的手法による検出方法の検討を行った。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

林 良夫

NFS/sldマウスは、舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントマウスとして樹立されている。雌NFS/sldマウスは、生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施することにより4週目以降、涙腺・唾液腺に限局する自己免疫病変を発症しヒト・シェーグレン症候群類似の病態を呈することから、EDCsにより3d-TXを施すこと無く免疫異常の誘発が可能か否かについて検討した。

新生児期NFS/sldマウスにBPA、E₂、及びデキサメサゾン(Dex)を腹腔内投与後、2週、4週、8週後に全身諸臓器の重量測定し、病理組織学的検査を行うと共に、胸腺及び脾臓をホモジナイズし、各種抗体(Thy1.2、CD4、CD8、B220、CD44、CD45RB、Mel-14、Pharmingen)と反応させ、フローサイトメトリーで解析した。

Local lymph node assayを指標とした内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価

武吉 正博

EDCsが動物の免疫系に対する影響評価法として、マウス局所リンパ節増殖試験(Local Lymph

Node Assay, LLNA)の有用性を検討する。

CBA/JN C₁jマウスにEE 10及び50 μ g/kg/dayを経胎盤、経授乳暴露した。妊娠動物は自然分娩させ出産率、妊娠期間、産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、性別の検査を行った。母動物及び仔動物は分娩後21日目に麻酔下で安楽死させた後、剖検を行った。解剖時には母動物の子宮を摘出後切開して硫酸アンモニウムに浸漬後着床痕数計測した。また、母仔動物とも胸腺及び脾臓重量を測定し、更に、胸腺はFlowcytometerを用いて細胞表面のCD4及びCD8の発現状態を計測した。

3) 生殖器

内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

長尾 哲二

EDCsの低用量暴露による生殖・発生毒性学的変化を、鋭敏に且つ早期に捉えることができる試験系を確立するための毒性指標を検討した。そのために、分担研究者らのこれまでの生殖・発生毒性研究からその毒性指標としての鋭敏性・確実性が認められたものについて、一生涯試験法のなかでの有効性を確認するため、まず以下の実験を行った。

①EDCsに対するマウス系統の感受性の差異を検討した。E₂に対して高感受性系統であるC57BL/6マウスと低感受性系統であるICRマウスを用いて、低用量BPA、GEN、E₂を妊娠9~13日に暴露し、生後の精巣発達に及ぼす影響の有無を重量を指標に調べた。

②マウスの生殖巣発生期(妊娠10~13日)に、DES、E₂、EE、Estradiol benzoate (EB)、Tamoxifen (TAM)、Clomiphene (CLOM)、Atrazine (ATZ)、BPAを皮下投与し、最終暴露24時間後の生殖巣の病理組織学的変化を電子顕微鏡にて確認し、次いで妊娠17日の胎児及び出生児については、発達期精巣精細管のアポトーシスを観察した。同時に精細管中の生殖細胞構成testis cellular compositionについても観察した。

③EDCsの外生殖器の形成過程に及ぼす影響について、妊娠15及び16日に上記EDCs及び陽性対照として抗アンドロゲン剤のFlutamide (Flu)を皮下注射し、妊娠17、18日に帝王切開により胎児を摘出して、妊娠17日摘出胎児については外生殖器の細胞外マトリックス増生の有無を病理組織学的に観察し、次いで同部位における間葉細胞群の

ヒドロキシプロリン (HP) 量を細胞外マトリック
ス量としてその定量を試みた。妊娠 18 日摘出胎児
については生殖突起から肛門までの距離
(Anogenital distance: AGD) を測定した。

④先天性生殖器奇形 (尿道下裂 hypospadias、停
留精巣 cryptorchidism 等) の誘発については、妊
娠 15~17 日に上記 EDCs を連続投与し、妊娠末期
に帝王切開により胎児を摘出して観察した。

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。

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

吉田 緑

1) ラット及びマウスを用いた遅延型影響検索の
ための陽性対照動物の作製

(1) Donryu ラットを用いた遅延型影響検索のた
めの陽性対照動物の作製。

新生児期暴露の陽性対照として、生後 1~5 日齢
の Donryu 雌ラットに EE の 1 あるいは 2 mg/kg を
反復皮下投与し、DES は生後 24 時間以内に 0.1~
10 μ g/rat を単回皮下投与し、遅延型影響の発現の
有無を観察した。遅延型影響発現の判定には、性
周期における検索を指標とした。また、仔の発育
の指標として体重を定期的に測定した。

(2) C57BL/6N マウスを用いた遅延型影響検索の
ための陽性対照動物の作製

生後 1~3 日の C57BL/6N 雌マウスに、DES の
0.02~2 μ g/mouse を反復皮下投与し、遅延型影響
の発現の有無を観察した。遅延型影響発現の判定
には、性周期における検索を指標とした。また、
体重測定をおこなった。

2) 肝臓のホルモン代謝変調が成熟動物の生殖器
へ及ぼす影響とその発現機序について検討

Indole-3-carbinol (I3C) は肝臓の cytochrome P450
酵素を誘導し、肝臓におけるエストロゲン代謝に
影響を与えると報告されており、一方で I3C の発
がん促進あるいは抑制作用の双方が報告されてい
る。

今回の実験では、まず、I3C の子宮に対するエ
ストロゲンあるいは抗エストロゲン作用を確認す
るために、卵巣摘出ラットを用いて子宮肥大試験
を行なった。

続いて、I3C の子宮癌に与える影響を検討する
ために、子宮内膜腺癌好発系の Donryu 雌ラットを

用い、11 週齢で N-ethyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine
を子宮腔内に投与した後、I3C を 500 及び 2000 ppm
混餌投与し、E₂ あるいはその代謝物 4-hydroxy-
estadiol (4HE) を週 2 回皮下に投与し、15 ヶ月齢ま
で経時的に観察した。

内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過
程に対する影響

太田 亮

EDCs の影響が、生殖器系のみならず、神経系
や免疫系にも及ぶことを考慮し、さらに生殖器系
の老化に至る過程に対する影響についても対応可
能な試験として、一生涯試験のガイドライン案を
作成した。このガイドライン案で最も重要な問題
点は、被験物質の投与 (暴露) 期間である。ヒト
暴露のモデルとして一生涯試験を考えた場合、妊
娠期、授乳期、離乳後の一連の暴露が適切と思わ
れるが、一方では、継続的な被験物質暴露が、逆
に異常 (影響) 検出の妨げになると言う懸念もあ
る。また、一生涯試験の位置づけを、あくまでス
クリーニングの最高位と考えた場合、むしろ感受
性の高い周産期にのみ暴露して、白黒はっきりさ
せる方が良いと言う考えもある。

そこで、本研究では、新生児期暴露を選択し、
別途に実施される予定の経胎盤・経授乳暴露試験
と比較し、暴露期間に関する問題を解決すること
を主目的として、プロトコールを作成した。以下
に、プロトコールの概略を示す。

使用動物: Cj:CD-IGS ラット及び C57BL/6J マウ
ス

群数: 4 群 (生児出産雌として各群 10 腹以上)

飼料: 固型 CE-2 (日本クレア)

飲料水: 水道水 (秦野市水道局給水)

投与物質: DES

媒体: コーン油 (和光)

投与経路: 強制経口

投与量: 0 (コーン油)、0.05、0.5 及び 5 μ g/kg/day

投与量設定理由: 子宮肥大試験において、子宮重
量の増加を来たす 5 μ g/kg を最高用量に設定し、
子宮重量の増加が起らない 0.5 μ g/kg を中用量、
0.05 μ g/kg を低用量に設定。

投与期間: 生後 1 日~生後 5 日

観察項目: 生存率、体重推移、性成熟 (腔開口、
陰茎包皮分離)、性周期 (8 週齢から 2 週間毎に
剖検まで)、交配 (12、23、34、45、56 週齢~)、
交尾率及び受胎率、産児数、行動試験 (24 及び 48

週齢)、剖検(26、52及び104週齢)、器官重量、精子検査(26、52週齢)、免疫学的検査(26週齢)、排卵検査(52週齢)等を実施する。

(内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究)

確定試験に関わる発がん性検討: 乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討

長村 義之

BPA及びDESのラット周産期暴露が乳腺の発達や細胞増殖の調節機構に及ぼす影響についての検索に着手した。BPA 25、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、DES 10、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を器官形成期(妊娠12日目)から離乳時(生後3週齢時)まで暴露した仔ラットに対し、7週齢時に7,12-Dimethylbenz(a)anthracene(DMBA)処置を施し、その後4週ないし13週間後に乳腺を採材した。現在、本試験はDMBA投与4週間後の採材までが終了している。

採材した乳腺は、Terminal end bud(TEB)を主体とした乳腺上皮細胞の形態を病理組織学的に検討した。さらにTEBを中心に乳腺上皮細胞の細胞周期(ki-67の免疫組織化学染色)及びアポトーシス(TUNEL法)について検索した。この検討と並行し乳腺の凍結切片上からLaser Capture Microdissection(LCM)によりTEBの上皮細胞を採取し、細胞増殖因子を中心にRT-PCRによる解析を進めている。

また、新たな腫瘍化及び腫瘍促進に関連する因子検出の試みとして、既存のヒトマーカーであるHER2/neu及びその他の因子としてvascular endothelial growth factor(VEGF)の発現についても追加検討を進めている。

確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

西川 淳一

化学物質の核内受容体への作用を迅速に検出できるシステムを構築し、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した。

核内受容体リガンド検出系(CoA-BAPシステム)

40種類の化学物質について、16種類のヒト由来核内受容体への影響をCoA-BAPシステムを用いて検証した。ヒト核内受容体のリガンド結合領域をGSTとの融合タンパク質として、大腸菌を用い

て大量に発現させ、精製した。これを96穴ポリスチレンプレートに固定化し、ここに化学物質とともにコアクチベーターTIF2を加えた。もし、化学物質にアゴニスト様活性があれば、核内受容体の構造変化を誘起し、コアクチベーターが結合する。コアクチベーターは、あらかじめアルカリフォスファターゼと融合させてあるので、この酵素活性を指標に、化学物質のアゴニスト活性を評価した。

レポーター遺伝子試験

CoA-BAPシステムの結果を検証するためほ乳動物細胞を用いたレポーター遺伝子試験を行った。RXR発現用ベクターとして、ヒト由来RXRのリガンド結合領域をGAL4DNA結合領域(GAL4DBD)につないだGAL4DBD-hRXR α を、PPAR γ 発現用ベクターとして、ヒト由来PPAR γ のリガンド結合領域をGAL4DBDにつないだGAL4DBD-hPPAR γ を用いた。レポーター遺伝子としては、4つのGAL4結合配列をtkプロモーター上流につないだp4xUAS-tk-lucを用いた。GAL4DBD-hRXR α 及びGAL4DBD-hPPAR γ をp4xUAS-tk-lucとともに、F9細胞及びNIH3T3細胞にリポフェクシン法で遺伝子導入し、化学物質添加後のルシフェラーゼ活性の誘導を調べた。

脂肪細胞分化誘導試験

有機スズ化合物の生理的な作用を検証する為、PPAR γ /RXRが主な役割を演じている脂肪細胞分化へのTBT及びTPTの影響を検討した。

マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞を、コンフルエントに達するまで培養し、さらに24時間培養後、試験化合物を含む分化誘導培地に交換した。更に、誘導開始60時間後、分化促進培地に交換した。分化誘導開始6日後、脂肪滴の蓄積をOil Red O染色で、脂肪細胞に特異的に発現するap2遺伝子の発現をノーザンブロット法で調べた。

確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の為のES細胞分化増殖影響解析研究

高木 篤也

ES細胞は*in vitro*で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、内分泌かく乱化学物質の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用であると思われる。そこで、エストロゲン等の種々のホルモンのES細胞分化への

影響を形態及び遺伝子レベルで明らかにし、ES細胞の *in vitro* 試験系としての有用性を確認し、リスク予測に役立てることを目的に下記の実験を行った。

1) マウス ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIF を除いた ES 培地 (従来使用した血清入り) で、4 日間浮遊培養した。その間に、ES 細胞培養系における神経分化誘導物質として知られている all-trans retinoic acid (ATRA)、または、種々の濃度の BPA を添加し、4 日後に胚様体 (EB) を採取し、細胞数を計測した。

2) ES 細胞培養用の培地血清中に存在する各種ホルモンの影響ならびにエストロゲン様作用を有する Phenol-red の影響を除外するため、新規に無血清培地を作製した。

3) マウス ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIF を除いた上記無血清 ES 培地に ATRA あるいは BPA を添加し、4 日間浮遊培養した。更に、化合物を除いた無血清培地で浮遊培養、あるいはゼラチンコート dish 上で培養し、形態を観察した。

確定試験に関わる生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析

松島 裕子

内分泌かく乱化学物質の生殖器制御系に対する作用を検討する確定試験系を構築するための基盤支援研究を行う。そのために本研究では生殖器制御メカニズムに関する分子レベルでの解析を行い、基盤情報として整理し、本研究班に貢献する。本年度は、マウス成獣雌について性周期変化に伴う 5 種類の臓器 (視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣) の遺伝子発現値を網羅的に得、データベース化した。

<各性周期の臓器採取>

9 週齢の C57BL/6 雌マウスを 100 匹購入し、2 週間の馴化期間を経た後に、視床下部領域、下垂体、卵巣、子宮、膣の臓器に加わえ、血清を採取した。マウスを屠殺後に膣スミアを採り、性周期を判定した。

<マウス組織からの RNA の分離精製>

組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬した。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、Spike RNA

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。

<Genechip 解析>

Genechip は MOE430 を用いた。全 RNA 4~5 μ g をアフィメトリクス社のプロトコルに従い、ハイブリダイゼーション、PE ラベルストレプトアビジン染色を施し、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、さらにはコピー数に変換した値を用い解析を行った。データ解析に用いたソフトウェアは当部にて開発したものを主に用いた。

確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析 高木 篤也

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質の神経系形成・発達に対する作用を明らかにするための基盤支援研究を行うことである。内分泌かく乱化学物質は神経系、特に行動に対して影響を及ぼすことが報告されており、本研究班でも特に重視されている。一方で、内分泌かく乱化学物質が細胞、分子レベルでいかなる作用を及ぼして神経系形成・発達をかく乱し、行動に影響を及ぼすかについての研究は十分とは言えず、行動影響につながる作用メカニズムを分子レベルで説明することは困難な状況にある。そこで本研究テーマでは、神経系形成・発達において中心的な役割を果たす神経幹細胞を標的に据えた解析を行い、暴露により引き起こされる作用に関する分子レベルの情報を収集し、確定試験開発の基盤研究として役立てる。本年度は、神経幹細胞に対する影響の具体的な試験系として、影響を定量的に検討する系として、1) 神経幹細胞の自己複製能に対する影響の定量系、2) 神経幹細胞の分化能に対する影響の定量系、の開発を行い、1) の系に関し E₂、DES、BPA、NP 等、エストロゲン様作用が報告されている物質の影響を検討した。2) の系に関しては、神経幹細胞の試験管内培養法 (ニューロスフェア法) と神経系分化細胞のマーカータンパク質に対する免疫染色法を組み合わせた分化影響定量系の開発に成功し、次年度以降の化学物質影響解析に備えた。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開

発に関する総合研究】

【OECD Conceptual Frame Work Level 3~4 対応試験開発】

Pubertal assay の改良としての外来性エストロゲン刺激による卵巣機能等の修飾の高感度検出試験系開発

松島 裕子

本研究は、低用量 EDCs の雌性齧歯類周産期暴露による生殖器への遅発性影響を検討する試験系の開発を目的とする。

今回我々は、Newbold ら (Repro. Tox 18, 2004, pp. 399-406) の追試を下記の方法で行った。

CD-1 マウス PND (postnatal day) 1~5 に DES を 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 反復皮下投与した。更に、PND18~20 に DES を 0, 1 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 反復皮下投与し、最終投与 24 時間後 (PND21) に頸椎脱臼にて屠殺し、体重、子宮重量を測定した。卵巣、子宮、膣を中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

前立腺等雄性生殖器系におけるアンドロゲン系影響のエストロゲン等複合シグナルによる修飾の研究

吉村 慎介

EE は *in vitro* でアンドロゲン受容体アンタゴニストであることが示されていることから、Hershberger 試験を実施し、更に、EE の有するエストロゲン作用を遮断することを目的に TAM を併用投与する Hershberger 試験を実施した。

1) EE の Hershberger 試験

精巣及び精巣上体を摘出した SD ラットを用い、EE の 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 及び 10 mg/kg + 各々 0.2 mg/kg の Testosterone propionate (TP) を 10 日間反復投与した。最終投与 24 時間後に、麻酔下放血屠殺して剖検し、前立腺腹葉、精囊+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋、亀頭、尿道球腺の重量を 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定後に測定した。

2) TAM 併用投与による EE の Hershberger 試験

前述の EE の Hershberger 試験における毎日の投与に先立ち、1 及び 3 mg/kg の TAM を強制経口投与、あるいは 3 mg/kg の TAM を皮下投与した。1 mg/kg の TAM 経口投与では EE の投与量は 0, 1 及び 10 mg/kg とし、3 mg/kg の TAM 経口投与では

EE の投与量は 0, 10 及び 100 mg/kg とした。また、3 mg/kg の TAM 皮下投与試験では 0, 0.1, 1, 10 及び 30 mg/kg とした。溶媒対照群及び陽性対照群は設けなかったが、TAM 及び EE を投与しない群 (溶媒を投与)、TAM の併用投与をしない EE 30 mg/kg 群を設け、その他は 1) の Hershberger 試験と同様の方法で実施した。

【OECD 対応試験実施・調査研究】

子宮肥大試験及び Hershberger 試験

小野 宏

OECD が中心となり推進してきた EDCs の試験法の開発/改良に共同研究で参加し、国際協調のもと基盤と成る資料を提供する。OECD バリデーションプロトコールに従い、エストロゲン様作用の疑われる 2,2'-dihydrobenzophenone について、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。

Hershberger 試験に関しては、OECD バリデーション作業のフェーズ 3 に参加し、コード化された化学物質を精巣摘出ラットに投与して、Hershberger 試験を実施した。また、Hershberger 試験の陽性対照として経口投与で用いられている Flutamide について、皮下投与による抗アンドロゲン効果を追試した。

1. 卵巣摘出 C57BL/6J マウスによる子宮肥大試験を用い、2,2'-dihydrobenzophenone (DHBP) のエストロゲン活性あるいは抗エストロゲン活性を検証した。エストロゲン活性を検出する試験系では、DHBP の 30~1000 mg/kg を 7 日間投与し、最終投与 24 時間後の子宮重量を測定した。抗エストロゲン活性を検出する試験系では、DHBP の 30~1000 mg/kg と EE の 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 7 日間併用投与し、最終投与の 24 時間後の子宮重量を測定した。

2. 卵巣摘出 C57BL/6J マウスによる子宮肥大試験を用い、octylphenol (OP) のエストロゲン活性あるいは抗エストロゲン活性を調べ、ラットとの試験結果と比較した。エストロゲン活性を検出する試験系では、OP の 3~100 mg/kg を 7 日間投与し、最終投与 24 時間後の子宮重量を測定した。抗エストロゲン活性を検出する試験系では、OP の 3~100 mg/kg と EE の 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 7 日間併用投与し、最終投与の 24 時間後の子宮重量を測定した。

3. Hershberger 試験 ; バリデーション試験の被験物

質には、OECD から提供されたコード化された化学物質を使用し、動物は、精巣摘出した SD 系ラットを使用した。コード化された化学物質は、いずれも添付された資料に従ってコーン油に溶解または懸濁し、強制的に経口投与した。アンタゴニスト活性を検出する試験系では、テストステロンプロピオネイト (TP) を 0.2 mg/kg の用量で併用皮下投与した。投与期間は OECD のプロトコル案に準じて 10 日間とし、最終投与の 24 時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、前立腺腹葉、精囊 (凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、亀頭、尿道球腺及び肝臓の重量を測定した。

4. 経口投与で抗アンドロゲン作用を示すことが知られている Flutamide を、精巣摘出した SD 系ラットに 1 及び 3 mg/kg の用量で皮下投与し、更に TP を 0.4 mg/kg の用量で併用投与した。10 日間投与し、最終投与の 4 時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、前立腺腹葉、精囊 (凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、亀頭及び尿道球腺の重量を測定した。

OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括 井上 達

国内外の会議及び学会へ出席し、それらの専門家との意見交換及び情報収集を行い、得られた成果の研究発表、雑誌による報告を通して、最新の情報を紹介している。

(当班に関連する主な出張先)

- ①環境毒性及び化学会 (SETAC) の主催する第 14 回年欧州部会に出席した。平成 16 年 4 月 17 日～23 日、チェコ・プラハ。
- ②第 31 回日本トキシコロジー学会、理事・監事会に出席した。平成 16 年 7 月 5 日～8 日、大阪市。
- ③第 5 回タイ王立チュラボン研究所主催国際科学会議に出席した。平成 16 年 8 月 15 日～21 日
- ④第 63 回日本癌学会学術総会に出席した。平成 16 年 9 月 28 日～10 月 1 日、福岡市
- ⑤Toxicogenomics 国際フォーラム 2004 に出席した。平成 16 年 10 月 11 日～15 日、京都市。
- ⑥第 27 回日本分子生物学会年會に出席した。平成 16 年 12 月 7 日～10 日、神戸。
- ⑦第 7 回環境ホルモン学会研究集會に出席した。平成 16 年 12 月 13 日～15 日、名古屋市。

⑧欧州連合 (EU) 欧州委員会 (EC) 主催による内分泌かく乱に関する国際会議主催の会議へ専門家として出席した。平成 17 年 1 月 24～26 日、ベルギー・ブリュッセル。

⑨経済協力開発機構 (OECD) 主催の内分泌かく乱試験及びアセスメントタスクフォース実務者会議に出席した。平成 17 年 1 月 27 日～29、フランス・パリ。

反復投与毒性試験系 (TG407 を含む) への適用に関する調査研究

広瀬 明彦

OECD においては化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニングの効率化、あるいは調和の目的の一つとして子宮肥大試験及び Hershberger 試験のバリエーションと共に、Enhanced OECD407 試験のバリエーションを行い、Step2 が終了しているが、未だ最終的なとりまとめは公表されていない。

一方、生殖発生毒性試験系も内分泌かく乱作用を検出する意味においては重要なツールではあるが、現状の試験法に対してはより鋭敏で内分泌かく乱作用に特異的な検出法への改善が必要である。OECD では 2004 年 10 月に “GUIDANCE DOCUMENT ON REPRODUCTIVE TOXICITY TESTING” のファーストドラフトの回覧を行った。このガイダンスは OECD のテストガイドライン 414、415、416、426 及び 421 や 422 における試験法や定義等の捕捉も目的として作成されている。また、現在、発生神経毒性試験法である TG426 の改訂作業も進行中であり、2005 年の 5 月には、我が国での Expert Meeting も予定されている。そこで、本年度は、今後の内分泌かく乱作用検出法としてのガイドラインのあり方に対する研究としてこれら OECD の動きを受けて、発生神経毒性の検出における現状の試験法の問題点抽出と TG 426 改訂及びドラフトガイダンスに対する我が国のコメントを調査した。

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

永井 賢司

子宮肥大試験については、これまで膨大な報告がなされているが試験に用いる動物種、週齢、投与経路等、試験条件が様々である。しかし、OECD Validation Study で用いられた protocol はこれらの

報告等を詳細に検討して作成されており、過去に実施された試験データは OECD Validation Study の protocol に十分反映されていると考えられる。平成 14 年及び 15 年度の調査研究では、本 protocol を検証した phase 1 及び phase 2 の validation の結果を中心に整理することにより、本試験法の問題点を抽出し、その解決策を検討した。本年度は、本法を実用化する上で残された問題点について Validation Study の後に得られたデータを中心に収集し、考察することとした。

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

山崎 寛治

国内では phase 3 の進捗状況について各機関（食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構）間で情報交換を行った。

海外の状況については、OECD の試験開発で中心的な役割を担っているドイツの企業等を訪問し、本試験の OECD ガイドライン化の動向、さらには試験自体の問題点を調査した。なお、調査は以下の点を中心に実施した。

- 1) Hershberger assay における Phase 3 への対応状況 (BASF, Bayer)
- 2) Phase 3 の幼若動物を使用する方法についての考え方 (BASF, Bayer)
- 3) 今後の OECD ガイドライン化への動き (BASF, Bayer)
- 4) Hershberger assay での甲状腺機能障害の検索検討への可能性 (Bayer, Universi. Berlin ; ただし Universi. Berlin は急用不在のため面会が出来なかった)

一方、公表化されている論文について文献調査を実施し、ガイドラインに関連するかどうかを中心に調査した。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用しないしは、頸椎脱臼法などの苦痛の少ない方法を用いるといった、各研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、特に、国立衛研はそのモデル施設となっている。本研究を構成する分担研究者には、米国において AAALAC の GLP 承認国立研究機関における研究歴を有する経験者を複数名含んでおり、実験における倫理

面での配慮に明るい。

C. 研究結果

内分泌かく乱性確定試験開発研究では、神経・行動においてマウスの依存性薬物に対する反応の亢進が確認され、認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響をマウスで検討する条件の設定、脳の性分化への影響を形態学的に観察した。免疫系は、自己免疫疾患モデル系を用い T 細胞系の異常が確認された。生殖器系では、雄の肛門～生殖突起間の組織に変化が見られ、雌では早発閉経がみられた。支援研究では、従来の肉眼的・病理組織学的検査のほか、マイクロアレイ等遺伝子発現情報を駆使する手法も取り入れ、技術基盤の導入に成功した。国際テストガイドラインに関わる調査研究では、反復投与毒性試験は発生神経毒性の検出に焦点を当て、神経毒性と筋毒性の識別の必要性、検査に絡むストレス負荷の影響が問題点として浮上した。子宮肥大試験では、antagonist に関連したデータ、飼料、用量、群構成について考察した。

各班員の研究結果の概要を以下に記載する。

総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション関連総括

- (1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応
- (2) BPA を用いた C₇₁:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究)

菅野 純

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目の取り纏めを行うと共に、OECD 哺乳動物バリデーション運営委員会 (VMG-mammalian) において、げっ歯類一生涯試験プロトコールを提案し、OECD 議事概要 (ENV/JM/TG/EDT/RD (2003) 11: 25-apr-2003) がまとめられた。

(2) BPA を用いた C₇₁:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究)

【概要】 Bisphenol A (BPA) 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day (陽性対照群として ethynyl estradiol (EE) 0.05 mg/kg 群を設定) を SD (IGS) ラットの

妊娠6日から分娩後20日まで母ラットに経口投与し、BPA 低用量域及び高用量域暴露時の出生児における cleft phallus の誘導、生後4日目の肛門・生殖突起間距離の測定、生後21日目以降の膣開口の観察、生後35日目以降の陰茎亀頭型の観察、10週齢時の雌外性器の形態計測学的検査、13週齢時の生殖能力検査、10週齢及び7ヶ月齢時の器官重量測定、さらに3ヶ月齢から7ヶ月齢時における性周期観察を行った。その結果、いずれのBPA投与群においても cleft phallus の出現はみられず、種々の検査においても異常はみられなかったが、性周期異常を示す動物数は、BPA 0.005 mg/kg 群では7ヶ月齢に、BPA 400 mg/kg 群では5ヶ月齢と7ヶ月齢において統計学的に有意に増加した。

現在、7ヶ月齢の剖検で採取した児動物雌の下垂体、卵巣、子宮、膣及び肉眼的病変部について、病理組織学的検査を実施中である。

詳細については、分担研究者 菅野 純の分担報告書を参照。

母動物；

一般状態及び体重の推移

媒体対照群の1例(No.3)が不妊であった。この他の母動物については、妊娠期間中、一般状態に異常はみられなかった。

母動物の体重推移は、媒体対照と比較し BPA 400 mg/kg 群及びEE群において妊娠14日目〜哺育期間を通じて有意に低値であった。

哺育拒否及び哺育拒否動物の剖検所見

媒体対照群の1例(No.5)は雄6匹、雌9匹(うち雌1匹は死産)を分娩したが、生後2日目までに全腹児の死亡が確認された。剖検の結果、乳腺の発達不良及び胸腺の萎縮が認められた。

BPA 400 mg/kg 群の1例(No.47)は雌雄各7匹を分娩したが、哺育拒否により生後3日目に雌雄各1匹、4日目までに全腹児の死亡が確認された。剖検所見にて、乳腺の発達不良、胸腺の萎縮、前胃の境界縁の隆起、及び盲腸の拡張が認められた。

その他の母動物には、分娩及び哺育に異常を認めなかった。

剖検所見

媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40 mg/kg 群、EE群には異常所見はみられなかった。BPA 400 mg/kg

群では、前胃の境界縁の隆起が9/9例に、盲腸の拡張が8/9例にみられた。

出生児；

性周期検査

3ヶ月齢時においては、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々0/16、2/20、2/19、3/24、3/18例が性周期異常を示した(媒体対照群では異常はみられなかった)。4ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々6/16、3/20、2/19、5/24、5/18例が性周期異常を示した。5ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々3/16、8/19、4/19、7/24、12/17例が性周期異常を示した。6ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々6/16、10/19、7/19、7/24、8/17例が性周期異常を示した。7ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々4/16、13/19、9/19、13/24、12/17例が性周期異常を示した。なお、性周期異常を示す動物数は、BPA 0.005 mg/kg 群では7ヶ月齢に、BPA 400 mg/kg 群では5ヶ月齢と7ヶ月齢において統計学的に有意に増加した。

EE群では、3ヶ月齢時に8/22例が性周期異常を呈し、5ヶ月齢以降には有意な増加を示した。

【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 5 対応試験開発〉

1) 神経・行動

Bisphenol A をモデルとした妊娠期及び授乳期暴露による行動影響の評価とその機序解明

鈴木 勉

BPA を妊娠期及び授乳期に暴露した C57BL/6J マウスでは morphine に対する精神依存形成及び自発運動量の亢進が認められたが、E₂ の処置では変化が認められなかった。また、初代培養アストロサイト及び神経/グリア共培養細胞に BPA を処置したところ、極めて低濃度でアストロサイトの形態変化ならびに dopamine に対する反応性の亢進が認められた。

マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価

宮川 宗之

マウスの個体発生初期における EDCs が、神経

系高次機能（認知機能＝学習・記憶・注意）に及ぼす影響をスケジュール制御オペラント行動（SCOB: Schedule-Controlled Operant Behavior）を用いて検証・評価するためのプロトコルの確立、測定条件の設定の基礎的な検討、及び FR10 スケジュールまでの訓練を実施した。

内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

今井 清

新生児期の性機能に関与する神経発達の経過を明らかにする目的で、ドーパミン作動性神経の指標であるチロシンヒドロキシラーゼ及び ER α を免疫組織化学染色でみた結果、チロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞の数は視床下部性的二型核において雌雄差はなく、ER α 陽性細胞は雌に多数観察された。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

林 良夫

NFS/sld マウスは生後 3 日目の胸腺摘出(3d-Tx) を施すことにより自己免疫病態を呈することから、EDCs 投与によって 3d-Tx を施すことなく免疫異常の誘導が可能か否かについて検討を加えた。新生児期に EDCs を投与した結果、投与後 2 週目に胸腺萎縮、T 細胞分画、B 細胞分画の異常が認められた。

Local lymph node assay を指標とした内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価

武吉 正博

CBA/JN マウスに EE を経胎盤・経乳汁暴露した結果、50 μ g/kg 投与群では産子は得られず、10 μ g/kg 投与群においても産子数は減少し、着床痕数は用量依存的に減少した。離乳時に親動物及び仔動物の胸腺を採取し、胸腺細胞の Subpopulation について Flow-cytometer を用いて解析した結果、親動物及び仔動物ともに対照群との明白な変化はみられなかった。

3) 生殖器

内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

長尾 哲二

EDCs に暴露された雄胎児の肛門－生殖突起周辺組織における細胞外マトリックス増生及びヒドロキシプロリン量は抑制される傾向がみられたことから、肛門－生殖突起間距離と同様、鋭敏な指標になると思われた。

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

吉田 緑

陽性対照物質としては DES が適切であると考えた。C57BL/6N マウスは繁殖・哺育成績が良好でないため環境等に十分な配慮が必要であると結論した。肝薬物代謝酵素誘導剤 indole-3-carbinol 投与により肝臓中 cytochrome P450 酵素の誘導がエストロゲン代謝変調を介してラットの子宮癌発生を促進することが明らかとなった。

内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響

太田 亮

EDCs 確定試験としての齧歯類を用いる一生涯試験の確立を目的とする。ラットあるいはマウスを用いた一生涯試験のガイドライン案を作成及びその検証を目的として、現在、陽性対照物質の DES を用いて、生殖器系の発達から老化に至るまでの経緯を性成熟、性周期、産児数、交尾能力及び性ホルモン分泌量等を指標として詳細に観察中である。

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

確定試験に関わる発がん性検討：乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討

長村 義之

EDCs の乳腺に対する影響を確認するため、母動物を介し周生期に BPA や DES を暴露されたラットの DMBA 乳腺発がん系に対する反応を精査した。DMBA 投与 4 週間後では、Terminal end bud における変化として、ki-67 による細胞増殖活性が BPA 低用量群でやや高い傾向にあった。

確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

西川 淳一

内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した結

果、有機スズ化合物が低濃度で RXR (Retinoid X Receptor) 及び PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) γ に作用することが明らかとなった。更に、TBT (Tributyltin) 及 TPT (Triphenyltin) は PPAR γ と RXR と共同して遺伝子発現を制御し、顕著に前駆脂肪細胞株 3T3-L1 の脂肪細胞への分化を誘導した。

確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の 為の ES 細胞分化増殖影響解析研究

高木 篤也

ES 細胞から形成される胚様体 (EB) を用いて BPA の影響を解析したところ、細胞数の増加が見られることを確認した。更に、EDCs の研究に適した ES 細胞培養用の無血清培地を新規に作製し、レチノイン酸及び BPA の影響を検索した結果、それぞれ、EB のサイズの増加、ならびに細胞分化に影響がみられ、この培地が有用であることが示唆された。

確定試験に関わる生殖器制御メカニズムに基づいた 内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析

松島 裕子

マウスを用い、発達期と成熟期に分けて研究を進め、生殖器発達に伴う遺伝子発現変化の解析を行う事とした。雌成熟期における性周期変化に伴う生殖器遺伝子発現変化の解析として、マウス成獣雌の性周期変化に伴う 5 種類の臓器 (視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膈) の遺伝子発現値を網羅的に得、データベース化した。

確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに 基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析

高木 篤也

神経系形成・発達において中心的な役割を果たす神経幹細胞を標的に据えた解析を行い、暴露により引き起こされる作用に関する分子レベルの情報を収集し、確定試験開発の基盤研究として役立つ。本年度は、神経幹細胞に対する影響の具体的な試験系として、影響を定量的に検討する系として、1) 神経幹細胞の自己複製能に対する影響の定量系、2) 神経幹細胞の分化能に対する影響の定量系、の開発を行い、1) の系に関し、 E_2 に加え DES、BPA、NP 等、エストロゲン様作用が報告されている物質の影響を検討した結果、神経幹細胞に対する化学物質の影響を定量的に検討す

る実験系の開発に成功した。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 3~4 対応 試験開発〉

Pubertal assay の改良としての外来性エストロゲン刺激による卵巣機能等の修飾の高感度検出試験系開発

松島 裕子

CD-1 マウス PND (postnatal day) 1~5 に DES を 0.001~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与し、更に PND18~20 に DES を 1、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与した結果、PND1~5 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) + PND18~20 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で、子宮肥大反応への影響が観測された。病理組織学的検査では、PND1~5 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の影響としての多卵性卵胞、PND1~5 と PND18~20 における暴露の複合影響としての子宮内膜上皮の reserve cell hyperplasia 等の変化がみられた。

前立腺等雄性生殖器系におけるアンドロゲン系影響の エストロゲン等複合シグナルによる修飾の研究

吉村 慎介

EE は *in vitro* でアンドロゲン受容体アンタゴニストであることが示されている。しかし、Hershberger 試験を実施したところ、明らかな抗アンドロゲン作用は認められなかった。そこで、EE の有するエストロゲン作用を遮断することを目的に TAM を併用投与する Hershberger 試験を実施したが、明らかな抗アンドロゲン作用は見出せなかった。

【OECD 対応試験実施・調査研究】

子宮肥大及び Hershberger 試験に関する研究

小野 宏

OECD バリデーションプロトコールに従い、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験、Hershberger 試験を実施した。また、Hershberger 試験の陽性対照として経口投与で用いられている Flutamide は、皮下投与でも有効であることを確認した。

OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括

井上 達

国内外の会議及び学会へ出席し、それらの専門家との意見交換及び情報収集を行い、得られた成

果の研究発表、雑誌による報告を通じて最新の情報を提供している。

反復投与毒性試験系への適用に関する調査研究 広瀬 明彦

本年度は、発生神経毒性の検出における現状の試験法の問題点の抽出と OECD での発生神経毒性試験法 TG426 改訂及びドラフトガイダンスに対する我が国のコメントについて調査を行った。

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

永井 賢司

子宮肥大試験をガイドライン化する上で残された問題点の一つとして、*estrogen antagonist* への適用がある。本年度は子宮肥大試験における *antagonist* 評価に関連したデータを収集し考察した。その他、ガイドライン化する上での留意点についても考察した。

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

山崎 寛治

国内における Hershberger 試験に関しては、ガイドライン化の最終的な試験となる OECD Validation phase3 が3機関(食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構)で実施が終了し、日本としてのデータの取り纏め、OECD への提出の手順で進むものと考えられる。一方、海外での動向については今回試験開発の中心であるドイツでの情報収集を行った。しかし、ガイドライン化の最大の問題は OECD における *in vivo* 試験の担当者が不在であることである。

D. 考察

各班員の考察を以下に記載した。

総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション 関連総括

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

(2) BPA を用いた Cj:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究)

菅野 純

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

本研究班では、高次行動異常を当面の焦点に、胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響の確認実験系の導入を進める。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル(人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル)、あるいは IV 型免疫応答のモデルである Local Lymph Node Assay の改良形を用いて、化学物質による自己免疫及び獲得免疫機能の修飾の影響を当面の対象として解析する。内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、早発閉経等のモデルの一つとしての成熟後の機能異常の発生を中心とした解析をさらに推進する。

(2) BPA を用いた Cj:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究:委託先:財団法人 化学物質評価研究機構)

母動物の妊娠期間から哺育期間において、媒体対照群で 1 例、BPA 400 mg/kg 群で 1 例、哺育拒否または哺育不良のため全腹児が死亡した。この 2 例の母動物の剖検所見において、胸腺の萎縮が共通して観察されていることから、何らかのストレス下にあったことが想像される。また、2 例共に乳腺発達不良が認められており、その原因については不明であるが、産児の直接的な死亡原因は十分な授乳が行われなかった事であると考えられる。その他の群には異常は認められなかった。

性周期を中心に考察する。本実験でみられた性周期異常が BPA 投与に起因するか否かを考察するため *persistent estrus* 及び *constant estrus* を呈した動物の発現状況に注目した。

3、4、5 及び 6 ヶ月齢では媒体対照群と BPA 群との間に *persistent estrus* 及び *constant estrus* の発生数に有意な差は認められず、EE 群にも差は認められなかった。7 ヶ月齢においては *persistent estrus* を示す動物が媒体対照群、BPA 0.005 mg/kg、BPA 0.05 mg/kg、BPA 40 mg/kg、BPA 400 mg/kg 及び EE 群においてそれぞれ 0/16、7/19、2/19、2/24、7/17 及び 8/22 例であり、統計学的に全 BPA 群及び EE 群で有意に増加した。他方、*constant estrus* を呈する動物は媒体対照群、BPA 0.005 mg/kg、BPA 0.05 mg/kg、BPA 40 mg/kg、BPA 400 mg/kg 及び EE 群においてそれぞれ 1/16、1/19、